

GOETHE



UNIVERSITÄT
FRANKFURT AM MAIN

**Entwicklung eines innovativen Testsystems
für die Detektion, Spezifikation und Depletion
von erythrozytären, thrombozytären, granulozytären
und therapeutischen Antikörpern**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 15
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von

Elisabeth Ehrend
aus Wittingen

Frankfurt am Main 2022

(D30)

vom Fachbereich 15 der

Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:

Prof. Dr. Sven Klimpel

Gutachter:

Dr. Elke Schleucher und Prof. Dr. Paul W. Dierkes

sowie Prof. Dr. Halvard B. Bönig

Datum der Disputation:

26.06.2023

Inhaltsverzeichnis

Summary	1
Zusammenfassung	2
1. Einleitung	4
1.1 Erythrozytäre Blutgruppensysteme und Blutgruppenserologie.....	5
1.1.1 Das Rh Blutgruppensystem	7
1.1.2 Antikörpersuchtest und –differenzierung.....	9
1.1.2.1 Direkter und Indirekter Anti-Humanglobulin-Test	10
1.1.2.2 Grenzen in der aktuellen Antikörperdiagnostik.....	12
1.1.2.3 Innovativer Lösungsansatz: Xenogene Testzellen zum Nachweis irregulärer Antikörper gegen humane Blutgruppenantigene.....	13
1.1.3 Alternative Anwendung der xenogenen Testzellen: spezifische Antikörperdepletion	16
1.1.3.1 Alternative Anwendung der xenogenen Testzellen: spezifische Antikörperdepletion	16
1.2 Blutgruppenantigene auf humanen Granulozyten	19
1.2.1 Das HNA-1 Blutgruppensystem	20
1.3 Blutgruppenantigene auf humanen Thrombozyten.....	22
1.3.1 Fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT).....	24
1.4 Ziel der Arbeit	26
2. Material und Methoden	27
2.1 Materialien	27
2.1.1 Reagenzien und Chemikalien	27
2.1.2 Antikörper	29
2.1.3 Anti-Seren	30
2.1.4 Größenstandard	30
2.1.5 Kits	30
2.1.6 Geräte	31
2.1.7 Software	33
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	34
2.2.1 mRNA-Isolierung	34

2.2.2	cDNA-Synthese	34
2.2.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	35
2.2.4	Mutagenese-PCR	36
2.2.5	Agarose-Gelelektrophorese	37
2.2.6	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	38
2.2.7	Bestimmung der DNA-/RNA-Konzentration	38
2.2.8	Herstellung von Vektoren.....	38
2.2.8.1	Restriktion	38
2.2.8.2	Ligation.....	38
2.2.8.3	Sequenz- und Ligations-unabhängige Klonierung.....	38
2.2.9	Transformation von Bakterien	43
2.2.10	Kultivierung von Bakterien	44
2.2.11	Plasmid-Präparation	45
2.2.12	DNA-Sequenzierung.....	45
2.3	Zellbiologische Methoden	46
2.3.1	Kultivierung und Lagerung von Zelllinien	46
2.3.1.1	Kultivierung von A0.01	47
2.3.1.2	Kultivierung von MEL-745A cl. DS19	47
2.3.1.3	Kultivierung von HEK293T/17	47
2.3.2	Transfektion zur Herstellung lentiviraler Partikel	48
2.3.3	Transduktion muriner Suspensionszellen	49
2.3.4	Einzelzell-Klonierung	49
2.4	Immunhämatologische Methoden	50
2.4.1	Durchflusszytometrie	50
2.4.1.1	Detektion und Spezifikation humaner Antikörper	50
2.4.1.2	Antigendichtebestimmung.....	52
2.4.2	Stabilisierung zellulärer Antigene.....	53
2.4.3	Indirekter Anti-Humanglobulin-Test in der Gelkarte.....	53
2.4.4	Bestimmung des Antikörper-Titers.....	54
2.4.5	Herstellung DTT-behandelter Test-RBCs	54
2.4.6	Prä-analytische Depletion von anti-CD38 Antikörpern	54
3.	Ergebnisse	55
3.1	Expression komplexer erythrozytärer Antigene.....	55
3.2	Expression granulozytärer Antigene	61
3.3	Expression thrombozytärer Antigene auf Integrin-Heterodimeren	63

3.4	Prä-analytische Depletion von therapeutischen Antikörpern aus Patientenplasma für immunhämatologische Untersuchungen.....	73
3.4.1	Depletion monoklonaler anti-CD38 Antikörper durch <i>Darasorb</i> Zellen	74
3.4.2	Depletion monoklonaler anti-CD47 Antikörper durch <i>Magrosorb</i> Zellen.....	84
4.	Diskussion	88
4.1	Alleinstellungsmerkmale xenogener Testzellen gegenüber primären humanen Testzellen	89
4.2	Eignung des Testsystems zum Nachweis von Antikörpern gegen erythrozytäre Antigene.....	91
4.3	Eignung des Testsystems zum Nachweis von Antikörpern gegen HNAs	94
4.4	Eignung des Testsystems zum Nachweis von Antikörpern gegen HPAs	96
4.5	Alternative Anwendung der xenogenen Testzellen: Selektive Depletion panagglutinierender Antikörper	100
4.6	Ausblick	103
5.	Literaturverzeichnis	105
6.	Abkürzungsverzeichnis	119
7.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	123
7.1	Abbildungsverzeichnis	123
7.2	Tabellenverzeichnis	125
8.	Publikationen und Präsentationen	126
8.1	Publikationen	126
8.2	Präsentationen	126
8.3	Poster	128
	Danksagung	129
	Eidesstattliche Erklärung	131

Summary

Several hundred polymorphic, unlinked inherited blood group antigens are expressed on the surface of erythrocytes, platelets and neutrophils. Accordingly, every blood transfusion carries the risk of immunization against non-self blood group characteristics. Alloantibodies can also be induced in pregnancy due to paternally inherited antigens. Therefore, it is necessary to test the blood for the presence of irregular erythrocytic antibodies prior to any transfusion or during pregnancy. Current diagnostic methods rely on primary, stabilized test erythrocytes from blood donors whose relevant blood group antigens are well known. Antibody specificities can be attributed to one or more antigens based on agglutination reactions of the test cells with patient plasma. However, if an antibody is directed against a common, a high-frequency or a non-polymorphic, ubiquitous antigen, adequate diagnosis cannot be ensured because of insufficient antigen-negative test cells, which means that compatibility of the transfusion cannot be ascertained. The use of therapeutic antibodies targeting antigens that are also expressed on erythrocytes provides a novel challenge for the immunohematology laboratory. Granulocytic antibody assays have shortcomings in terms of robustness, resolution, time consumption and costs. Antibodies against human platelet antigens are particularly important in pregnancy; they can cause thrombocytopenic hemorrhage including brain hemorrhage in fetuses and neonates, which can lead to severe developmental disorders. However, to date, standardized prenatal screening tests for anti-platelet blood group antibodies are not available. In this work, a novel method for the identification and differentiation of irregular blood group antibodies was established, based on genetically engineered xenogeneic test cells presenting single defined human blood group antigens on their cell surface. The non-human cells co-express fluorochromes that can be used to distinguish antibody-labeled test cells by flow cytometry. Furthermore, the generated test cells can be used to deplete antibodies from poly- or panagglutinating plasmas while preserving the other antibody specificities. This technology could facilitate conventional diagnostics and also offers the possibility to specifically remove therapeutic antibodies (such as anti-CD38, anti-CD47, etc.) from patient plasma, as they frequently interfere with routine diagnostics.

Zusammenfassung

Auf der Oberfläche von Erythrozyten, Thrombozyten und Neutrophilen befinden sich mehrere hundert verschiedene polymorphe, ungekoppelt vererbte Blutgruppenantigene. Dementsprechend birgt jede Bluttransfusion das Risiko einer Immunisierung gegen fremde Blutgruppenmerkmale. Auch während der Schwangerschaft können aufgrund väterlich vererbter Antigene Alloantikörper induziert werden. Deshalb muss das Blut vor jeder Transfusion oder während einer Schwangerschaft auf das Vorhandensein irregulärer erythrozytärer Antikörper untersucht werden. Dabei greifen die aktuellen diagnostischen Verfahren auf primäre, stabilisierte Testerythrozyten von Blutspendern zurück, deren relevante Blutgruppenantigene bekannt sind. Antikörperspezifitäten können anhand von Agglutinationsreaktionen der Testzellen mit dem zu untersuchenden Patientenplasma auf ein oder mehrere Antigene zurückgeführt werden. Ist jedoch ein Antikörper gegen ein häufiges, ein hochfrequentes oder ein nicht-polymorphes, ubiquitäres Antigen gerichtet, kann in Ermangelung Antigen-negativer Testzellen keine adäquate Diagnostik gewährleistet, die Verträglichkeit der Transfusion also nicht definitiv sichergestellt werden. Auch der medizinische Einsatz therapeutischer Antikörper, welche Antigene adressieren, die auch auf Erythrozyten exprimiert werden, führt zunehmend zu Problemen. Tests auf granulozytäre Antikörper sind mangelhaft bezüglich ihrer Robustheit, besitzen eine unzureichende Auflösung und sind zudem meist zeitaufwändig und daher teuer. Antikörper gegen humane Plättchenantigene spielen insbesondere in der Schwangerschaft eine Rolle; sie vermögen bei Neugeborenen thrombozytopenische Blutungen bis hin zu massiven Hirnblutungen zu verursachen, die zu schweren Entwicklungsstörungen führen können. Bisher erfolgt jedoch mangels geeigneter Reagenzien keine standardisierte pränatale Untersuchung auf thrombozytäre Antikörper. In dieser Arbeit wurde ein neuartiges Verfahren für die Identifikation und Differenzierung irregulärer Blutgruppenantikörper etabliert, welches auf gentechnisch hergestellten, xenogenen Testzellen basiert, die einzelne definierte humane Blutgruppenantigene auf ihrer Oberfläche präsentieren. Die nicht-humanen Zellen co-exprimieren Fluorochrome, anhand derer Antikörper-markierte Testzellen durchflusszytometrisch voneinander unterscheidbar sind. Weiterhin können die generierten Testzellen zur Depletion von Antikörpern aus polyagglutinierenden Plasmen unter Erhalt der anderen Antikörperspezifitäten verwendet werden. Diese Technologie könnte die konventionelle Diagnostik erheblich erleichtern und bietet zudem die Möglichkeit, therapeutische Antikörper (wie z. B. anti-CD38, anti-CD47, etc.), die häufig

zu Interferenzen mit der Routinediagnostik führen, spezifisch prädiagnostisch aus Patientenproben zu entfernen.

1. Einleitung

Im Jahr 2021 wurden in Deutschland laut Gesundheitsberichterstattung des Bundes 3.305.631 Millionen Erythrozytenkonzentrate (EKs), 511.936 Thrombozytenkonzentrate (TKs) und 630.897 gefrorene Frischplasmen (GFPs) transfundiert¹. Bei der Übertragung von Blutkomponenten kommt der Empfänger der Transfusion in Kontakt mit körperfremden Zellen, die auf ihrer Oberfläche polymorphe Merkmale tragen, welche bei Personen, die dieses Merkmal selbst nicht besitzen, antigenisch wirken und eine humorale Immunreaktion induzieren können. Diese polymorphen Strukturen auf den Blutzellen werden als Blutgruppenantigene bezeichnet. Voraussetzung für die Anerkennung eines Merkmals als Blutgruppenantigen ist dessen genetische Definition sowie die Fähigkeit, in Antigen-negativen Empfängern spezifische Antikörper zu induzieren. Theoretisch sind alle Blutgruppenantigene in der Lage, bei Antigen-negativen Personen eine Alloimmunisierung auszulösen. Die Wahrscheinlichkeit, mit der bei einer Sensibilisierung tatsächlich Antikörper gebildet werden, ist jedoch sehr variabel. Die immunhämatologische Relevanz ist dabei abhängig von der Immunogenität der jeweiligen Antigene und der ethnischen Antigenverteilung in der Bevölkerung. Einige hochfrequente Blutgruppenantigene sind regional beispielsweise bei über 99 % der Population vorhanden², wohingegen Antigene von inhärent großer Seltenheit, die als niedrigfrequent bezeichnet werden, nur mit einer Häufigkeit von unter 1 % vorkommen³. Häufig liegen den verschiedenen Blutgruppenmerkmalen einfache, meist singuläre *Missense*-Mutationen zugrunde, die mit dem Austausch einzelner Aminosäuren (AS) einhergehen. Die Immunogenität solcher Polymorphismen liegt meist im niedrigen, maximal einstelligen Prozentbereich. Stärkere Antigenität besitzen Blutgruppenmerkmale, deren antithetische Blutgruppeneigenschaft die Deletion eines Gens ist, insbesondere das Merkmal D aus dem Rhesus (Rh) Blutgruppensystem, welches durch das Vorhandensein („Rh-positiv“) oder komplettes Fehlen des RhD Proteins, alias „Rh-negativ“, gekennzeichnet ist. Zur Vermeidung von Transfusionsreaktionen muss deshalb vor der Verabreichung von Blutpräparaten immunhämatologisch untersucht werden, ob die Blutgruppenmerkmale von Blutspender und Empfänger kompatibel sind und überprüft werden, ob der Empfänger bereits gegen fremde Blutgruppenmerkmale sensibilisiert ist. Dabei sind irreguläre Antikörper *per se* nicht schädlich, solange man ab diesem Zeitpunkt nur noch mit Blut in Kontakt kommt, welches die entsprechenden Blutgruppenmerkmale nicht aufweist. Liegen im Plasma des Empfängers Alloantikörper

gegen Antigene von transfundierten Blutprodukten vor, kann dies zu Transfusionsreaktionen führen, die durchaus lebensbedrohlich sein können. Welche spezifischen Blutgruppenmerkmale vor einer Transfusion untersucht werden müssen, ist streng geregelt und in der Richtlinie zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Richtlinie Hämotherapie)⁴ festgelegt. Die funktionell typischerweise irrelevanten Polymorphismen der Blutgruppenantigene sind außer vor Transfusionen auch in der Schwangerschaft von Bedeutung, denn väterlich vererbte Blutgruppenmerkmale eines Fötus können eine Alloimmunisierung der Mutter verursachen. Deshalb müssen auch Schwangere auf das Vorhandensein von irregulären, erythrozytären Alloantikörpern getestet werden.

1.1 Erythrozytäre Blutgruppensysteme und Blutgruppenserologie

Erythrozyten (engl. *Red blood cells*; RBCs) tragen hunderte verschiedener Blutgruppenmerkmale auf ihrer Oberfläche. Derzeit existieren laut der *International Society of Blood Transfusion* (ISBT) 43 verschiedene erythrozytäre Blutgruppensysteme mit mehr als 400 beschriebenen Antigenen⁵. Nicht zuletzt aufgrund der sehr viel höheren Transfusionsfrequenz von EKs, der langen Verweildauer von Erythrozyten in der Blutbahn und der hohen Anzahl von übertragenen Antigenträgern (ca. $2,5 \times 10^{12}$ Erythrozyten pro Präparat) kommt es sehr viel häufiger zur Sensibilisierung gegen erythrozytäre als gegen granulozytäre oder thrombozytäre Antigene. Abbildung 1 zeigt eine schematische Übersicht wichtiger erythrozytärer Blutgruppensysteme, wobei die Richtlinien-relevanten Systeme schwarz markiert sind. Die entsprechenden Antigene können von einem oder mehreren Genen codiert werden und beeinflussen unter anderem die Form oder Stabilität der Erythrozytenmembran.

Das wohl bekannteste Blutgruppenmerkmal ist das AB0-Blutgruppensystem, dessen Antigene durch bestimmte Oligosaccharid-Muster auf der Erythrozytenmembran definiert werden. Genetisch ist die AB0-Blutgruppe über das Vorhandensein verschiedener Glykosyltransferasen festgelegt. Diese beeinflussen den Aufbau der heterogenetischen Substanz (H-Substanz), die sich als Ausgangsmolekül auf Erythrozyten der Blutgruppe 0 befindet. Das Blutgruppenmerkmal A entsteht durch die 3- α -N-Acetylgalaktosaminyltransferase, mittels welcher der H-Substanz ein zusätzliches N-Acetylgalaktosamin übertragen wird. Beim Merkmal B, welches genetisch durch die 3- α -Galaktosyltransferase codiert ist, befindet sich ein zusätzliches Galaktose-Molekül

an der H-Substanz. Das Besondere an diesem Blutgruppensystem ist, dass aufgrund des Auftretens analoger Polysaccharide auf Darmbakterien regelhaft Antikörper gegen die Antigene gebildet werden, die nicht auf den eigenen Erythrozyten vorhanden sind. Aufgrund des obligaten Vorkommens dieser sogenannten Isoagglutinine muss AB0-identisch oder zumindest AB0-kompatibel transfundiert werden, da AB0-Major-disparate Bluttransfusionen massive intravasale Hämolysen auslösen können, die unmittelbar tödlich verlaufen können.

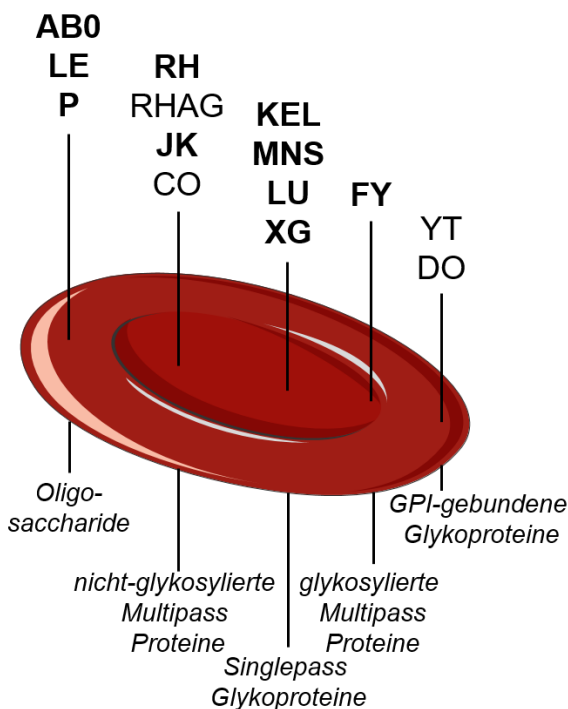


Abbildung 1: Schematische Darstellung relevanter Blutgruppensystemen auf der Membran humaner Erythrozyten. Neben den Richtlinien-relevanten Antigenen der Blutgruppensysteme AB0, Rhesus (RH), Kell (KEL), Duffy (FY), Kidd (JK), Lewis (LE), P1PK (P), MNS, Lutheran (LU) und Xg sind auch das Rhesus-assoziierte Glykoprotein (RhAG) sowie die Systeme Colton (CO), Dombrock (DO) und Cartwright (YT) aufgeführt, die von klinischer Relevanz sein können. Die resultierenden polymorphen Antigene sind Teil der erythrozytären Membran und können als Oligosaccharide, integrale *Single-* oder *Multipass-*Proteine in glykosylierter oder nicht-glykosylierter Form oder auch als GPI-verankerte Glykoproteine vorliegen. Dabei dienen diese Strukturen nicht nur der Membranintegrität, sondern fungieren auch als Membrantransporter, Adhäsionsmoleküle oder Rezeptoren für Chemokine⁶.

1.1.1 Das Rh Blutgruppensystem

Eines der komplexesten und gleichzeitig klinisch relevantesten Blutgruppensysteme ist das Rhesus (Rh) System. Es besteht aus insgesamt 52 verschiedenen polymorphen Antigenen, die durch die homologen Gene *RHD* und *RHCE* codiert werden⁷⁻⁹. Entwicklungsbiologisch entstand das *RhD* durch eine Duplikation des *RhCE* Gens weshalb die meisten Säugetiere, im Gegensatz zu Menschen, kein RhD Antigen besitzen. Im Laufe der menschlichen Evolution kam es jedoch zu einer *RhD* Deletion, welche, ohne erkennbaren Selektionsvorteil zu besitzen, in der zentraleuropäischen Bevölkerung eine substantielle Häufigkeit erlangte¹⁰. In Mitteleuropa besitzen ca. 15 % der Bevölkerung homozygot kein *RhD* Gen und werden als Rh-negativ bezeichnet. In anderen Populationen, in Asien beispielsweise, ist dieser Phänotyp äußerst selten und kommt lediglich bei 1 % der Bevölkerung vor¹¹. Durch die An- oder Abwesenheit des gesamten RhD Proteins wird der RhD Phänotyp zu einem Blutgruppenmerkmal mit extrem hoher Immunogenität für RhD-negative Individuen. Zusätzlich existieren unterschiedliche Ausprägungsformen des RhD Merkmals, die sich aufgrund der häufigen Heterozygotie am RhD Locus qualitativ oder quantitativ antigenisch auswirken können: Kann das Protein beispielsweise aufgrund bestimmter Mutationen nicht effektiv in die Zellmembran eingebaut werden, wird der Phänotyp als *weak D* bezeichnet¹². Kommt es zu reziproken Austausch homologer, aber nicht-identischer Genabschnitte zwischen RhD und RhCE, wird von einem partial D gesprochen¹³. Während *weak D* Phänotypen nur in seltenen Fällen gegen RhD sensibilisierbar sind, können betroffene partial D Individuen durchaus anti-D Antikörper bilden, weshalb hier besondere Vorsicht bei Bluttransfusionen geboten ist. Antikörper, die gegen das Merkmal RhD gerichtet sind, können nicht nur durch inkompatible Transfusionen, sondern auch durch eine Rh-inkompatible Schwangerschaft induziert werden. Erwartet eine RhD-negative Mutter ein Kind, welches für das Merkmal RhD positiv ist, kann der Kontakt mit dem fetalen Blut während der Schwangerschaft oder bei der Geburt zur Alloimmunisierung der Mutter führen. Die plazentagängigen anti-RhD IgG Antikörper der Mutter werden in den fetalen Blutkreislauf übertragen, was zur Hämolyse kindlicher Erythrozyten führen kann. Bei einer weiteren Schwangerschaft mit Rhesusinkompatibilität werden die anti-RhD Antikörper durch die erneute Exposition mit dem fetalen Blut geboostert, wodurch ein *Morbus haemolyticus neonatorum* (MHN) verursacht und schlimmstenfalls ein *Hydrops fetalis* ausgelöst werden kann.

Wie in Abbildung 2A dargestellt, liegen die Gene *RHD* und *RHCE* in entgegengesetzter Orientierung zueinander und sind an der chromosomalen Position 1p36.11 lokalisiert¹⁴. Die aus den Rh Genen resultierenden Polypeptide RhD und RhCE bestehen aus jeweils 417 Aminosäuren und unterscheiden sich je nach Haplotyp lediglich in 32 bis 35 Aminosäurepositionen voneinander¹⁵. Wie in Abbildung 2B schematisch illustriert, sind die Rh Antigene aus 12 Transmembrandomänen und 6 extrazellulären Bereichen aufgebaut, die auf der Erythrozyten-Membran präsentiert werden^{16–18}. Auf dem antithetischen RhCE Antigen befinden sich die transfusionsrelevanten Polymorphismen C/c an Aminosäureposition 103 und E/e an Position 226¹⁴.

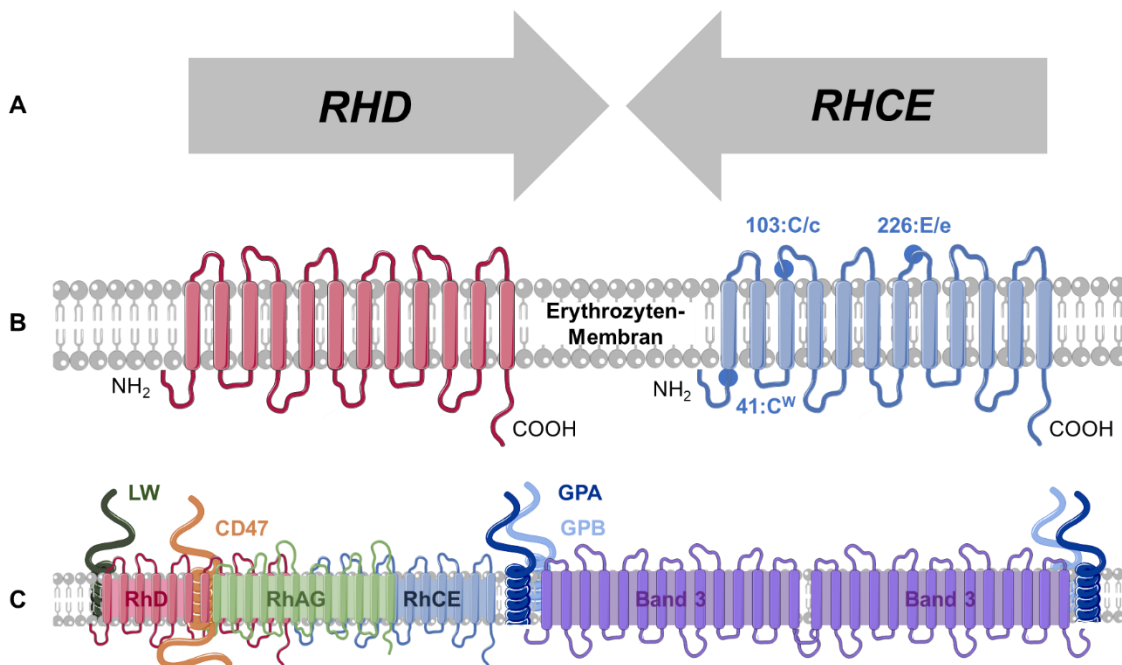


Abbildung 2: Das Rh Blutgruppensystem als Teil eines Makroproteinkomplexes in der Erythrozyten-Membran. **A:** Das Rh Blutgruppensystem beinhaltet die Gene *RHD* und *RHCE*, die sich in entgegengesetzter Orientierung auf dem Chromosom 1 befinden. Individuen, bei denen das *RHD* Gen vollständig deletiert ist, werden als Rh-negativ definiert. **B:** Vorhergesagte RhD und RhCE Proteinstruktur in der Erythrozyten-Membran. Die Rh Proteine liegen in der erythrozytären Membran als nicht-glykosylierte, acetylierte *Multipass*-Proteine vor und sind aus jeweils 12 Transmembrandomänen aufgebaut. Die Proteine RhD und RhCE unterscheiden sich je nach vorliegendem Haplotyp in 32 bis 35 Aminosäuren voneinander. Die Aminosäurepositionen, an denen sich die immunologisch relevanten Polymorphismen C^w (AS-Position 41), C/c (AS-Position 103) und E/e (AS-Position 226) befinden, sind in dem RhCE Antigen durch Kreise gekennzeichnet. **C:** Schematische Darstellung der Rh Proteine in einem Band 3-assoziierten Kernkomplex. In der RBC-Membran kommt es zu einer Assemblierung der Rh Proteine mit dem Rhesus-assoziierten Glykoprotein (RhAG), dessen Co-Expression essentiell für die Rh Antigene ist. Neben der Assoziation des Rh Tetramers mit dem Band 3 Tetramer über Glykophorin A und B (GPA und GPB) bestehen Interaktionen mit dem Integrin-assoziierten CD47 Antigen und dem *Singlepass* Typ I Glykoprotein LW. Modifiziert nach Bruce *et al.* (2003)¹⁹ und Westhoff (2007)⁷.

Das Antigen C besitzt an Aminosäureposition 103 ein Serin und ist bei 68 % der kaukasischen Bevölkerung vorhanden. Bei dem komplementären c Antigen, das bei etwa 80 % in dieser Population mindestens heterozygot vorkommt, befindet sich Prolin an Position 103¹¹. Die Variante E, bei der sich ein Prolin an Aminosäureposition 226 befindet, tritt mit 29 % deutlich seltener auf, als das mit 98 % vorherrschende Antigen e, bei dem an Position 226 Alanin vorliegt¹¹. Ein weiteres Richtlinien-relevantes Rh Antigen ist das C^W Antigen, bei dem an Position 41 ein Aminosäureaustausch von Glutamin zu Arginin stattgefunden hat. Dieser Polymorphismus kommt bei etwa 2 % der kaukasischen Bevölkerung vor und ist in den meisten Fällen mit dem C Phänotyp assoziiert²⁰. Die Rh Antigene werden exklusiv auf Erythrozyten exprimiert und sind, wie in Abbildung 2C schematisch dargestellt, Teil eines Makroproteinkomplexes, der einen spezifischen molekularen Kontext einschließlich der Co-Expression des Rh-assoziierten Glykoproteins (RhAG) erfordert. Der Kernkomplex, bestehend aus den Rh Antigenen, RhAG, CD47 und dem LW Glykoprotein, ist mit dem Band 3 Komplex assoziiert, der über Ankyrin und Protein 4.2 die Verbindung zum erythrozytären Zytoskelett darstellt²¹.

1.1.2 Antikörpersuchtest und –differenzierung

Um die blutgruppenserologische Verträglichkeit zu gewährleisten, muss vor jeder Transfusion die Kompatibilität von Spender- und Empfängerblut durch eine Kreuzprobe verifiziert werden. Außerdem muss ein Antikörpersuchtest (AKS) und gegebenenfalls eine Differenzierung vorhandener Antikörper, also eine Zuordnung eines anti-erythrozytären Antikörpers zu einem oder mehreren bestimmten Antigenen, durchgeführt werden. Die derzeitigen diagnostischen Verfahren zum Nachweis und zur Identifikation irregulärer erythrozytärer Antikörper verwenden Panels mit primären Erythrozyten von Blutspendern der Blutgruppe 0 mit hochaufgelösten Antigenmustern. Die Test-Erythrozyten (Test-RBCs) verschiedener Spender werden zu Panels kombiniert, die sicherstellen, dass alle klinisch relevanten Antigene auf mindestens einer der Testzellen vorhanden sind. Dabei müssen laut der Richtlinie Hämotherapie die folgenden Merkmale auf den Testzellen charakterisiert und hoch (vorzugsweise homozygot) exprimiert sein:

C, C^W, c, D, E, e, K, k, Fy^a, Fy^b, Jk^a, Jk^b, S, s, M, N, P¹, Le^a, Le^b.

1.1.2.1 Direkter und Indirekter Anti-Humanglobulin-Test

Für die Identifikation und Spezifikation irregulärer Antikörper wird ein Agglutinationstest durchgeführt, bei dem das Plasma des Patienten mit Test-RBCs inkubiert wird. Während IgM Antikörper die Erythrozyten direkt und schon bei Raumtemperatur agglutinieren können, sind IgG Antikörper lediglich in der Lage, Erythrozyten zu opsonieren. Ein zweites Reagens, ein xenogenes Anti-Humanglobulin (Anti-IgG), auch als Coombs-Reagenz bekannt, kann *in vivo* opsonierte Patienten-Erythrozyten (direkter Coombstest) oder *ex vivo* durch Patientenplasma opsonierte Test-Erythrozyten (indirekter Coombstest) agglutinieren^{22,23}. Beim direkten Anti-Humanglobulin-Test (DAT) werden die Erythrozyten des Patienten auf gebundene IgG Antikörper untersucht. Der indirekte Anti-Humanglobulin-Test (IAT) hingegen wird durchgeführt, um freie, irreguläre, inkomplette Antikörper im Plasma des Patienten zu identifizieren. Sind in dem Plasma Antikörper gegen ein erythrozytäres Merkmal vorhanden, bindet der Antikörper an das entsprechende Antigen auf den Test-RBCs. Durch die Zugabe des Anti-IgGs kommt es zur Vernetzung der Erythrozyten. Diese Agglutinationsreaktion kann mit Hilfe verschiedener Methoden, beispielsweise durch einen Gel-Agglutinationstest, Polyethylenglykol-Test oder Festphasen-Anti-Humanglobulin-Test genauer analysiert und bewertet werden. Abbildung 3 zeigt das Prinzip des IAT in einem konventionellen Gelkarten-Agglutinationstest. Dabei werden 25 µl Patientenplasma zu 50 µl Test-Erythrozyten-Suspension in den Reaktionsraum einer Gelkarte gegeben und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die Karte zentrifugiert, wobei die Erythrozyten eine Gelmatrix passieren, welche Anti-IgG Antikörper und Antikörper, die gegen das finale Degradationsprodukt der dritten Komplementkomponente (C3d) gerichtet sind, enthält. Während Erythrozyten, die keine IgG Antikörper gebunden haben, durch die Gelmatrix an den Boden des Reaktionsgefäßes gelangen, werden die mit IgG Antikörpern beladenen Erythrozyten durch das Coombs-Reagenz vernetzt und bleiben durch die Agglutination in der Gelmatrix hängen.

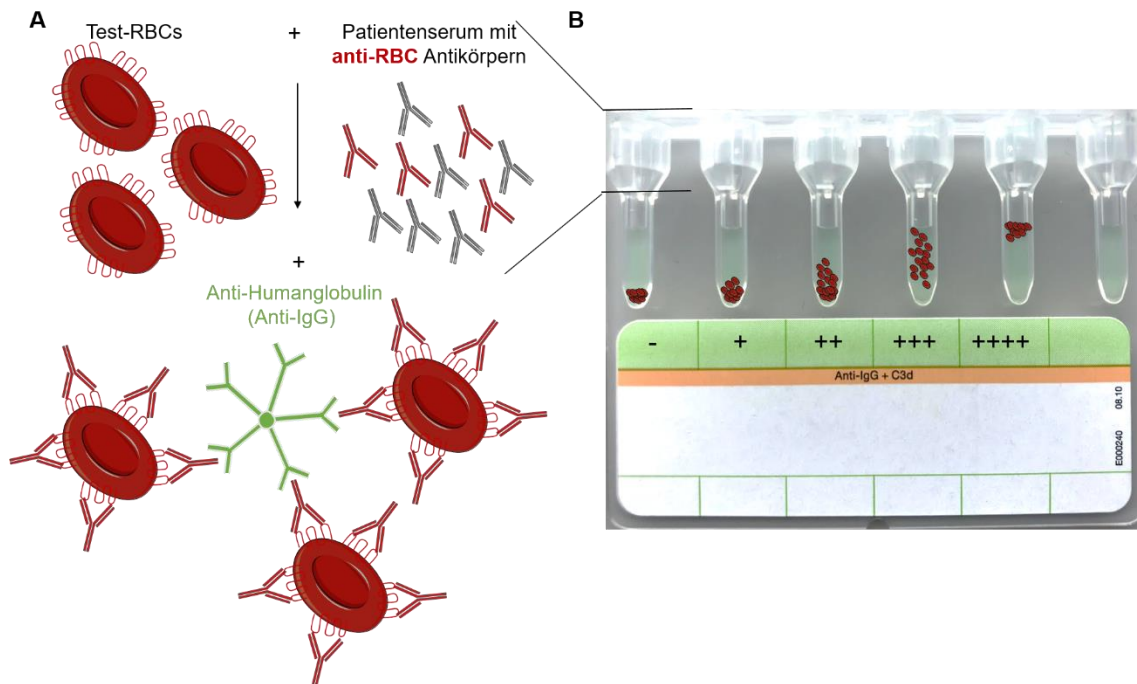


Abbildung 3: Schematisches Prinzip des indirekten Anti-Humanglobulin-Tests zum Nachweis erythrozytärer Antikörper mit der Gelkarten-Technik und Bewertung des Schweregrades der Agglutinationsreaktion. **A:** Zum Nachweis erythrozytärer Antikörper werden Test-RBCs mit bekannten Blutgruppenmerkmalen mit dem zu untersuchenden Patientenplasma inkubiert. Sind in der Probe anti-RBC Antikörper (rot) vorhanden, binden diese an das entsprechende Antigen auf den Erythrozyten. Durch Zugabe eines Anti-Humanglobulins (Anti-IgG), auch bekannt als Coombs-Reagenz, kommt es zu einer Vernetzung zwischen den mit Antikörpern beladenen Erythrozyten. **B:** Gezeigt ist eine Bio-Rad ID LISS/Coombs Gelkarte mit sechs Mikrotubes, in deren Reaktionsraum das Patientenplasma mit den Test-RBCs inkubiert wird. Die Tubes sind mit einer Gelmatrix befüllt, die ein Anti-Humanglobulin, bestehend aus Anti-IgG und Anti-C3d, enthält. Nach der Inkubation wird die Karte zentrifugiert, wobei einzeln vorliegende Erythrozyten, die keinen Antikörper gebunden haben, die Gelmatrix passieren können. Befindet sich das gesamte Erythrozyten-Pellet am Boden des Mikrotubes, wird die Reaktion als negativ (-) bewertet. Ist ein Antikörper gegen ein auf den Test-RBCs vertretenes Merkmal vorhanden, findet eine Agglutination durch das Anti-Humanglobulin statt und die Erythrozyten bleiben in der Gelmatrix hängen. Die Agglutinationsstärke kann in die Stufen leicht (+), mittel (++) , stark (+++) und sehr stark (++++) unterschieden werden.

1.1.2.2 Grenzen in der aktuellen Antikörper-Diagnostik

Die auf den Test-Erythrozyten basierenden Analysen sind sehr robust und in den meisten Fällen in der Lage, die irregulären Antikörper in einem Patientenplasma zuverlässig zu spezifizieren. Allerdings geraten die Tests an ihre Grenzen, sobald die Erythrozyten spontan oder unspezifisch aggregieren. Ursache dafür kann beispielsweise eine Polysensibilisierung oder ein Antikörper gegen hochfrequente oder nicht-polymorphe, ubiquitäre erythrozytäre Oberflächenantigene sein, was dann als Poly- oder Panagglutination imponiert. Da primäre Erythrozyten als Antigenträger verwendet werden und die Antikörperspezifitäten durch eine negative Reaktion mit Test-RBCs ausgeschlossen werden müssen, ist die Auflösung des Testverfahrens von der ethnischen Antigenverteilung abhängig. Ungewöhnliche Antigenkonstellationen, die in der lokalen Bevölkerung nur selten vorkommen, sind in den kommerziell erhältlichen Testpanels unterrepräsentiert. Besitzt ein Patient Antikörper gegen häufige Antigene, wie beispielsweise ein anti-e aus dem Rh- oder anti-k aus dem Kell-Blutgruppensystem, oder gar Antikörper gegen hochfrequente Antigene, wie z.B. Yt^a oder Vel, ist die Diagnostik mit derzeitigen Technologien bereits kaum möglich, da nur wenige oder gar keine negativ-reagierenden Testzellen für den Antigenausschluss zur Verfügung stehen. Befinden sich mehrere Polymorphismen auf einem Blutgruppenantigen kann es zudem vorkommen, dass eine Differenzierung der vorliegenden Antikörper nicht möglich ist. So kann beispielsweise zusätzlich zu einem anti-C ein anti-C^W Antikörper vorliegen, der in Ermangelung einer C-negativen, C^W-positiven Testzelle nicht erkannt werden kann. Auch Antikörper, welche gegen Antigene gerichtet sind, die auf Erythrozyten nur sehr schwach exprimiert werden, oder sehr niedrigtitrige Antikörper, könnten von den herkömmlichen Tests übersehen werden. Zudem können Artefakte, die auf eine nicht Antikörper-vermittelte RBC-Aggregation zurückzuführen sind, wie z. B. die Bildung von Rouleaux, zu Pseudo-Agglutinationen führen, die nur schwer von einer Aggregation durch panagglutinierende Antikörper unterschieden werden können. Eine weitere hochaktuelle Herausforderung für die Immunhämatologie sind therapeutische Antikörper, wie anti-CD38 oder anti-CD47, die nicht-polymorphe Erythrozytenantigene erkennen, also panagglutinierend sind und so zu starken Interferenzen mit IAT-basierten Testverfahren führen.

1.1.2.3 Innovativer Lösungsansatz: Xenogene Testzellen zum Nachweis irregulärer Antikörper gegen humane Blutgruppenantigene

Einen neuen, innovativen Ansatz für die immunhämatologische Diagnostik könnten xenogene Testzellen darstellen, die einzelne humane Blutgruppenantigene exprimieren. Eine Testzelle nicht-humanen Ursprungs bietet den Vorteil, dass ein eindeutiger Rückschluss auf ein bestimmtes humanes Antigen möglich ist. Zudem wären diese Zellen weniger anfällig für immunhämatologische Störungen durch klinisch irrelevante Antikörper. Ein solches Testsystem wäre außerdem unabhängig von der natürlich vorkommenden Häufigkeitsverteilung und genetischen Kopplung von Blutgruppenantigenen. Das Expressionsniveau der humanen Antigene kann kontrolliert und angepasst werden, um die Empfindlichkeit des Testsystems zu steigern. Zusätzlich könnten auch nicht-natürliche Antigenvarianten hergestellt werden, bei denen vereinzelte polymorphe Stellen zu immunologisch neutralen Aminosäuren mutiert sind, wenn mehr als ein Polymorphismus auf einem Blutgruppenantigen vorhanden ist. Das konzeptionelle Testprinzip ist in Abbildung 4A dargestellt und beruht auf einer durchflusszytometrischen Analyse der Testzellen. Dazu wird in jeder nicht-humanen Testzelllinie ein humanes Blutgruppenantigen mit einem Fluorochrom co-exprimiert, um eine Differenzierung der Zellpopulationen im Durchflusszytometer zu ermöglichen. Die Zellen können dadurch zu Testpanels kombiniert werden, mit denen die Antikörperspezifität eines Plasmas gleichzeitig gegen verschiedene Blutgruppenantigene getestet werden kann. Genau wie bei den konventionellen Testverfahren werden die Testzellen mit dem Patientenplasma inkubiert. Sind Antikörper gegen eine im Panel vertretene Antigenspezies vorhanden, binden diese an die entsprechende Testzelle. Nach einem Waschschrift werden die Zellen mit einem Fluorochrom-markierten Detektionsantikörper inkubiert, der wahlweise gegen humane IgG oder auch IgM Antikörper gerichtet ist. Über die Intensitätszunahme der Sekundärfluoreszenz der Testzell-Populationen in einem Histogramm können an die Zellen gebundene Antikörper nachgewiesen werden. Ein Überschuss an parentalen Testzellen, die keine humanen Blutgruppenantigene exprimieren, dient als Referenz, mit der eine spezifische Fluoreszenzverschiebung verglichen werden kann und fungiert gleichzeitig als Quencher für nicht spezifisch bindende Plasmakomponenten. Zur allgemeinen Überprüfung der beschriebenen Hypothese wurden, wie in Abbildung 4B zu sehen ist, Testzellen erzeugt, welche die antithetischen Antigene Fy^a oder Fy^b des Duffy Blutgruppensystems exprimieren. Die dem FY System zugrundeliegende Gensequenz codiert den Duffy-Antigen-Rezeptor für Chemokine (DARC)²⁴. Die resultierenden, codominant vererbten Antigene Fy^a und Fy^b

unterscheiden sich durch einen einzelnen Nukleotidaustausch an Position 125, was zu einer *Missense*-Mutation führt. Das Fy^a Antigen codiert dadurch an Aminosäureposition 42 Glycin, wohingegen bei Fy^b Asparaginsäure vorliegt²⁵⁻²⁷. Das resultierende Transmembranprotein dient nicht nur als Chemokin-Rezeptor, er fungiert auch pathophysiologisch als Rezeptor der Malaria-Erreger *Plasmodium vivax* und *Plasmodium knowlesi*²⁸. Der besonders in der afrikanischen Bevölkerung verbreitete Null-Phänotyp $Fy^{(a-b)}$ bietet somit einen natürlichen Schutz vor einer Malaria-Infektion und stellt ein hervorragendes Beispiel für die evolutionäre Anpassung dar^{29,30}. Im Mitteleuropäischen Raum ist die Ausprägung mit 0,06 % nur sehr selten zu finden. Hierzulande ist der $Fy^{(a+b)}$ Phänotyp mit ca. 18 % seltener als der $Fy^{(a-b)}$ Phänotyp mit 33,0 %. Knapp die Hälfte der Bevölkerung (47,4 %) trägt beide Allele¹¹. Während Antikörper gegen das Merkmal Fy^b seltener vorkommen, sind irreguläre anti- Fy^a Antikörper der Klasse IgG relativ häufig, nicht selten auch hochtitrig, zu finden und können zu hämolytischen Transfusionsreaktionen führen. Wie in Abbildung 4B zu sehen ist, wurde ein Panel zur Spezifikation von irregulären Antikörpern gegen die Merkmale Fy^a und Fy^b generiert. Hierzu wurden Fy^a Testzellen, die zusätzlich das Fluorochrom *DsRed* besitzen, und *ZsGreen*-exprimierende Fy^b Testzellen mit parentalen Zellen gemischt und mit Patientenplasma bekannter Spezifität inkubiert. Nach dem Waschen erfolgte die Inkubation mit einem APC-gekoppelten Anti-human-IgG Detektionsantikörper. Während die Zellpopulationen ohne spezifischen Antikörper im APC-Kanal deckungsgleich übereinanderliegen, kann nach Inkubation mit einem anti- Fy^a Plasma eine Rechtsverschiebung der roten Fy^a Zellen im APC-Kanal festgestellt werden. Nach Inkubation mit einem Plasma, welches anti- Fy^b Antikörper enthält, wurde eine erhöhte APC-Fluoreszenzintensität der Fy^b Testzellen im Vergleich zu den Fy^a -exprimierenden und den parentalen Zellen beobachtet.

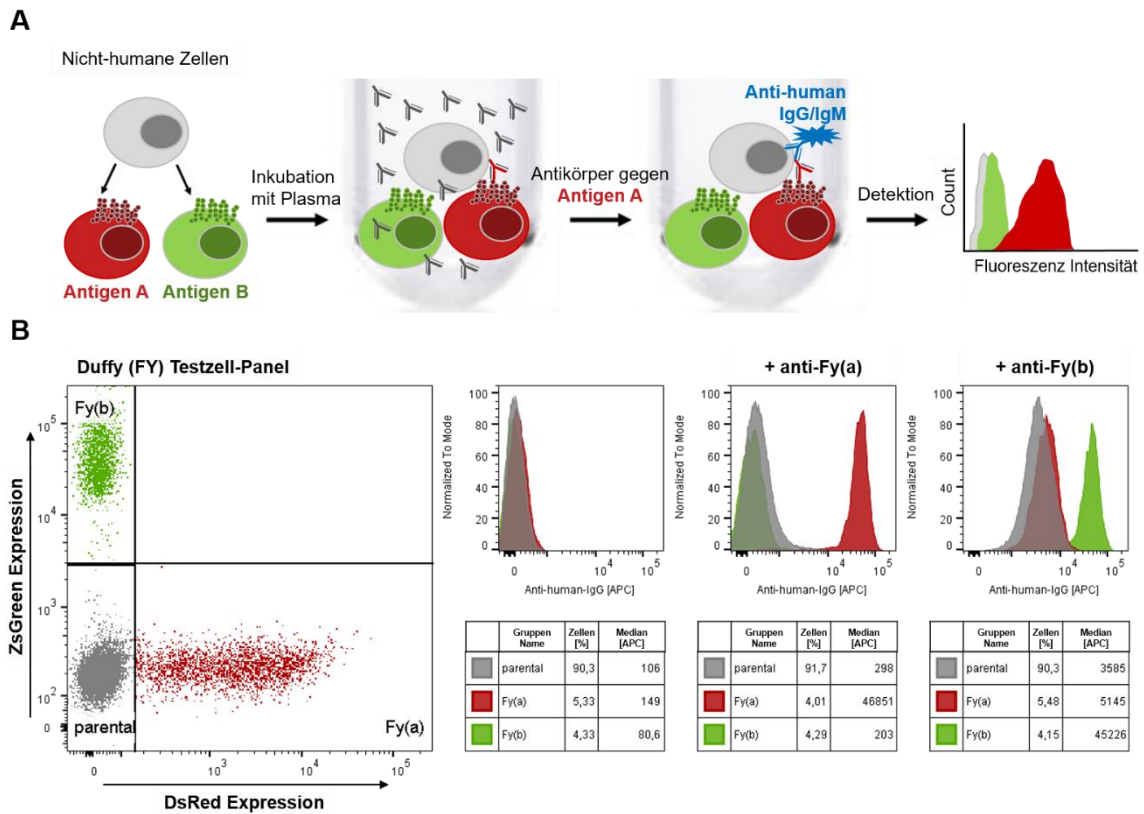


Abbildung 4: Schematische Darstellung des neuen immunhämatologischen Testsystems und Nachweis des Prinzips am Beispiel des Duffy (FY) Blutgruppensystems. A: In einer nicht-humanen Zelllinie wird ein humanes Antigen zusammen mit einem Fluorochrom exprimiert. Die rote Zelle trägt das Antigen A auf der Zelloberfläche, die grüne Zelle exprimiert Antigen B. Aus diesen Zellen werden Zellpools generiert und mit Patientenplasma inkubiert. Befindet sich in der Probe ein Antikörper gegen eine der Testzellen, bindet dieser an die entsprechende Zelle. Nach dem Waschen wird ein gegen humane IgG/IgM Antikörper gerichteter, Fluorochrom-gekoppelter Sekundärantikörper hinzugefügt. Über die Verschiebung der Fluoreszenzintensität der entsprechenden Zellpopulation kann im Durchflusszytometer die Bindung eines Antikörpers festgestellt werden. **B:** Abgebildet ist ein Testzell-Panel aus Testzellen, die das Blutgruppenantigen Fy(a) (in rot) oder Fy(b) (in grün) tragen. Die parentalen Zellen (in grau) sind im Überschuss vorhanden und können als Referenzwert für das Assay verwendet werden. Befindet sich kein Antikörper im Patientenplasma, überlagert sich die Sekundärfluoreszenz der drei Zellpopulationen im APC-Kanal. Bei Vorliegen eines anti-Fy(a) Antikörpers kann eine Verschiebung der roten Population festgestellt werden, während die grüne und die graue Population kongruent bleiben. Mit einem anti-Fy(b) Antikörper verschiebt sich die grüne Population im Vergleich zur grauen und roten Population.

1.1.3 Alternative Anwendung der xenogenen Testzellen: spezifische Antikörperdepletion

Die beschriebenen xenogenen Testzellen könnten zusätzlich als Absorptionsreagenz zur prä-analytischen Abreicherung von störenden Antikörpern, wie z. B. therapeutischen Antikörpern und - Kenntnis ihrer Spezifität vorausgesetzt - pan- oder poly-agglutinierenden Immunantikörpern verwendet werden. In Abbildung 5 ist schematisch ein Patientenplasma mit einem polyagglutinierenden Antikörper (anti-A), der die Diagnostik behindert, dargestellt. Dieses Patientenplasma könnte mit xenogenen Testzellen, die das korrespondierende Antigen in hoher Dichte auf ihrer Oberfläche exprimieren, inkubiert werden. Der Antikörper bindet spezifisch an die Zellen, welche anschließend mittels Zentrifugation wieder vom Plasma abgetrennt werden können. Das depletierte Plasma kann im Anschluss für die konventionelle Diagnostik eingesetzt werden.

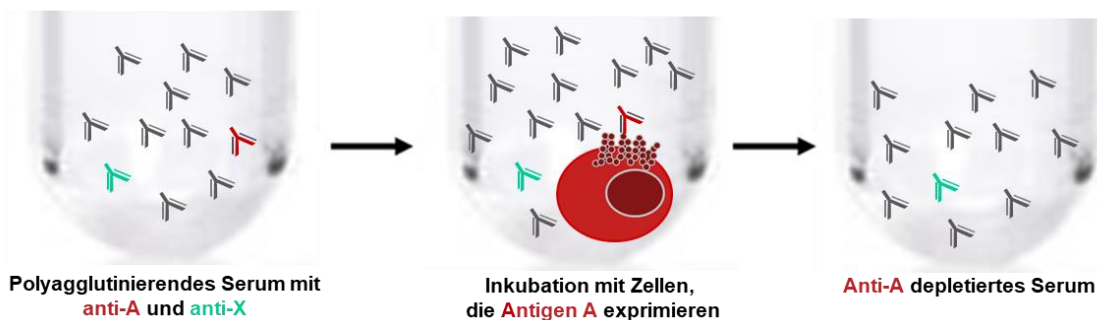


Abbildung 5: Alternative Verwendung der xenogenen Zellen zur spezifischen Depletion von Antikörpern. In einem polyagglutinierenden Plasma eines Patienten können Antikörper, die gegen häufige oder hochfrequente Blutgruppenantigene oder ein nicht-polymorphes Oberflächenantigen gerichtet sind, die konventionelle Diagnostik stören. Das Plasma wird mit xenogenen Zellen inkubiert, die das entsprechende Antigen in hoher Dichte auf der Oberfläche exprimieren. Die Testzelle, die das Antigen A exprimiert, ist rot dargestellt, ebenso wie der dazugehörige anti-A Antikörper. Die xenogenen Zellen werden mit dem Patientenplasma inkubiert, wobei anti-A an die Zellen bindet, andere Antikörper (anti-X) jedoch nicht. Über Zentrifugation werden die Zellen anschließend pelletiert und entfernt. In dem abgenommenen Plasma bleiben die anti-X Antikörper quantitativ erhalten. Das anti-A depletierte Plasma kann für die konventionelle Antikörperdiagnostik verwendet werden. In diesem Beispiel steht „A“ für ein beliebiges erythrozytäres Proteinantigen, nicht zu verwechseln mit dem Polysaccharidantigen „A“ aus dem AB0 Blutgruppensystem.

1.1.3.1 Interferenz therapeutischer Antikörper mit der immunhämatologischen Diagnostik

Die derzeitigen serologischen Screening-Technologien, die natürliche humane Erythrozyten als Antigenmatrix und Indikator zum Nachweis und zur Identifikation erythrozytärer Antikörper verwenden, können durch bestimmte Medikamente beeinflusst werden. Therapeutische monoklonale Antikörper können zu starken Interferenzen im IAT oder auch in der Kreuzprobe führen^{31,32}. Anti-CD38 und anti-CD47 sind die ersten klinisch relevanten Beispiele für monoklonale Antikörper, die auf breit exprimierte Antigene abzielen, welche auch auf Erythrozyten vorkommen. Dadurch führen die therapeutischen Antikörper zu einer Panagglutination der Test-RBCs und stören die meisten derzeit verwendeten Antikörperscreening- und Identifizierungs-Technologien. Bislang sind nur monoklonale anti-CD38 Antikörper (Daratumumab³³, Isatuximab³⁴) für die Behandlung des Multiplen Myeloms zugelassen und somit routinemäßig klinisch verfügbar. Das CD38 Antigen ist eine geeignete Zielstruktur für die Therapie, da es auf Myelomzellen hoch exprimiert wird^{35,36}. Es kommt jedoch in geringer Expressionsstärke auch auf anderen Zellen, wie beispielsweise den Erythrozyten, vor³⁷⁻³⁹. Wie in Abbildung 6A zu sehen ist, verursachen auch sehr geringe Mengen von 2 µg/ml Daratumumab im Plasma eines Patienten eine Panagglutination der Test-RBCs. Die Behandlung mit Daratumumab kann sich, wie in dem Schema der Monotherapie in Abbildung 6B dargestellt ist, über mehrere Monate erstrecken. Dabei werden Daratumumab-Spitzenpiegel von mehr als 1000 µg/ml erreicht, wobei der durchschnittliche Serumspiegel bei etwa 315 µg/ml liegt⁴⁰. Interferenzen mit den herkömmlichen IAT-basierten Antikörpersuchtests können noch bis zu 6 Monate nach dem Absetzen des Medikaments festgestellt werden³². Da Patienten mit Multiplem Myelom häufig transfusionsbedürftig sind⁴¹, stellt die Panagglutination im IAT ein relevantes klinisches Problem dar. Um dieses zu umgehen, werden die Test-Erythrozyten mit dem Disulfidbrückenzerstörenden Reagenz Dithiothreitol (DTT)³¹ inkubiert. Dadurch wird jedoch nicht nur die Struktur des CD38 zerstört, sondern auch mehrere andere transfusionsrelevante polymorphe Blutgruppenantigene, insbesondere KEL1 (K) und KEL2 (k), alle anderen Antigene des Kell-Blutgruppensystems, sowie Dombrock (DO), John Milton Hagen (JMH), Lutheran (LU), Indian (IN) und Cartwright (YT)⁴². Daher basiert die Transfusion auf einem präemptiven *Matching* für die relevanten KEL Antigene, während das statistisch geringe Risiko einer Transfusion gegen Antikörper gegen andere DTT-empfindliche Antigene, wie DO, JMH, LU, IN oder YT in Kauf genommen wird⁴³. Allerdings wird eine erweiterte Phäno- oder Genotypisierung des Patienten empfohlen,

um das Immunisierungsrisiko zu verringern^{31,32,44}. Außerdem führt die Behandlung der Test-RBCs mit DTT dazu, dass die Testzellen außerhalb ihrer validierten Spezifikation liegen und der Registrierungsstatus des Testsystems herabgestuft wird. Diese Vorgehensweise lässt sich nicht auf Festphasen-Testformate übertragen. Zusätzlich ist die DTT-Methode für andere vielversprechende Zielantigene von Immuntherapien, wie beispielsweise CD47, ungeeignet⁴⁵.

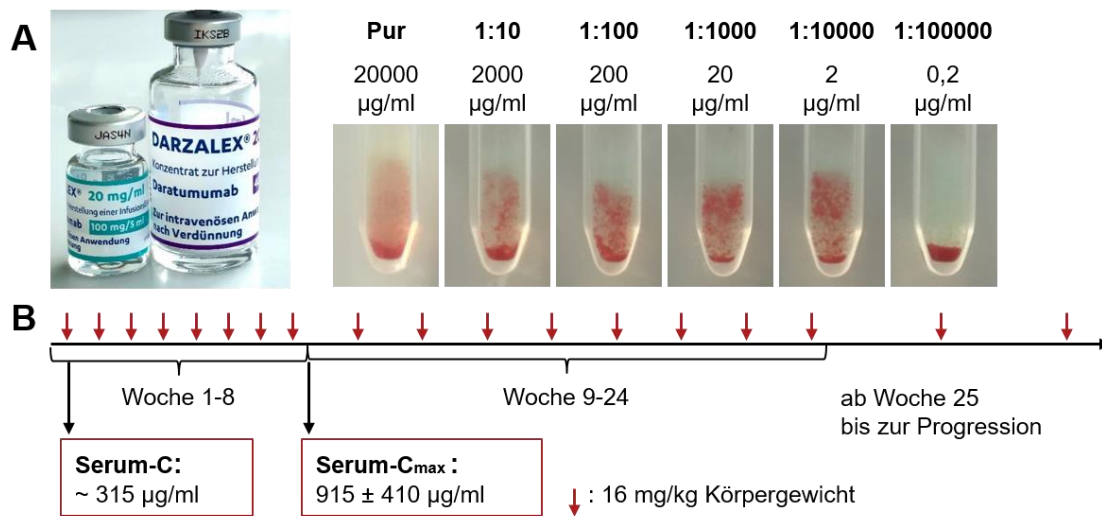


Abbildung 6: Interferenz monoklonaler anti-CD38 Antikörper im indirekten Anti-Human-globulin-Test und therapeutisches Behandlungsschema des Medikaments. A: Dargestellt ist das zur Behandlung des Multiplen Myeloms zugelassene Medikament DARZALEX® (Daratumumab) von der Firma Janssen und dessen Reaktivität im indirekten Anti-Human-globulin-Test. Der therapeutische Antikörper verursacht eine Panagglutination der Test-RBCs, da das targetierte CD38 Antigen auch auf Erythrozyten vorhanden ist. Selbst bei 10.000-facher Verdünnung des Medikaments von 20 mg/ml auf 2 µg/ml fällt die Reaktion positiv aus. **B:** Dosierungsschema für DARZALEX als Monotherapie im 4-Wochen-Zyklus⁴⁰. Bei diesem Behandlungsregime wird das Medikament in Kombination mit Lenalidomid und Dexamethason verabreicht. In den ersten zwei Monaten wird den Patienten dabei eine wöchentliche Dosis von 16 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Die durchschnittliche Serumkonzentration (Serum-C) liegt in diesem Zeitraum bei etwa 315 µg/ml und erreicht am Ende der wöchentlichen Gabe Maximalwerte (Serum-C_{max}) von 915 ± 410 µg/ml. Ab der neunten Woche schreitet die Behandlung mit einer Injektion alle zwei Wochen bis zur 24. Woche fort. Ab Woche 25 erfolgt die vierwöchige Applikation des Medikaments bis zum Progress der Krankheit.

1.2 Blutgruppenantigene auf humanen Granulozyten

Auch auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten werden spezifische Glykoproteine exprimiert, die bei Exposition als Alloantigene fungieren können und sich bei disponierten Personen als immunogen erwiesen haben⁴⁶. Derzeit sind 14 verschiedene humane Neutrophilenantigen- (HNA-) Epitope serologisch nachgewiesen, die basierend auf ihren assoziierten Allelen in die fünf polymorphen, codominant vererbten Systeme HNA-1 bis HNA-5 unterteilt werden^{47,48}. Die Antigene HNA-1 und HNA-2 werden exklusiv auf Granulozyten exprimiert, wohingegen HNA-3 beispielsweise auch auf endotheliale Gewebe oder Thrombozyten zu finden ist⁴⁹. Der Nachweis spezifischer granulozytärer Antigene kann sowohl serologisch als auch molekulargenetisch erfolgen. Während eine serologische Diagnostik verhältnismäßig aufwändig ist, sind molekulare Methoden zur Bestimmung des Genotyps, wie die quantitative *real time* (qRT) PCR oder eine PCR mit sequenzspezifischen Primern (SSP), auch in Hochdurchsatz- oder Multiplex-Verfahren durchführbar. Die Detektion granulozytärer Antikörper gestaltet sich hingegen zeitkritisch und –intensiv. Die laut Internationalem Workshop für Granulozytenimmunologie empfohlenen Standardmethoden, der Granulozyten-Agglutinationstests (GAT) in Kombination mit einem Granulozyten-Immunfluoreszenztest (GIFT) zum Nachweis von an Granulozyten gebundenen Antikörpern, basieren auf frisch isolierten Granulozyten⁵⁰. Dabei beschränkt sich die Haltbarkeit der primären Testzellen auf etwa 24h nach Entnahme. Als Weiterentwicklung gilt der Flow-GIFT, bei dem durch Automatisierung des Verfahrens und eine durchflusszytometrische Analyse Granulozyten-assoziierte Antikörper detektiert werden können⁵¹. Als Goldstandard für die Spezifizierung von anti-HNA Antikörpern wird ein Glykoprotein-spezifischer Assay, der sogenannte MAIGA (Monoklonale Antikörper-Immobilisierung von Granulozytenantigenen) durchgeführt⁵². Auch das SASGA (Simultane Analyse von spezifischen Granulozytenantikörpern) Verfahren ist zur gezielten Analyse granulozytärer IgM und IgG Antikörpern mittels Durchflusszytometer etabliert⁵³. Fast alle granulozytären Antikörper lassen sich, unter der Voraussetzung, dass entsprechende Testzellen vorhanden sind, mit den aufgeführten Methoden nachweisen. Dennoch erschweren niedrige Antikörper-Titer und geringe Bindungsaffinitäten die Diagnostik. Zudem können Spontanaggregationen oder HLA Antikörper zu falsch-positiven Testergebnissen führen⁵⁴. Auch wenn Antikörper gegen humane Neutrophilenantigene im Vergleich zu erythrozytären Antikörpern relativ selten vorkommen, können sie eine Vielzahl klinischer Komplikationen auslösen. Neben primären und sekundären Autoimmunneutropenien^{55,56}, die vermehrt bei Kindern unter 4 Jahren auftreten⁵⁷, können anti-HNA Antikörper auch neonatale Immunneutropenien

(NIN) verursachen. Diese zwar seltene⁵⁸, aber dennoch potentiell schwerwiegende Erkrankung kann durch den transplazentaren Übertritt mütterlicher anti-HNA Antikörper, die gegen ein väterlich vererbtes HNA-Merkmal des Fötus gerichtet sind, ausgelöst werden^{59,60}. Ursache dafür sind häufig Alloantikörper gegen die Antigene HNA-1a, HNA-1b oder HNA2. Eine weitere schwerwiegende Folge einer Granulozyteninkompatibilität ist die transfusions-assoziierte akute Lungeninsuffizienz (TRALI), bei der innerhalb weniger Stunden nach der Transfusion plasmahaltiger, anti-HNA Antikörper enthaltender Blutprodukte, selten auch Transfusion von Granulozyten in entsprechend sensibilisierte Empfänger, ein oftmals tödlich verlaufendes akutes Atemnotsyndrom mit interstitiellem Lungenödem auftreten kann⁶¹. Auch bei Stammzelltransplantationen spielen die Neutrophilenantigene eine Rolle. So zeigte sich bei inkompatibler Transplantation gegen präformierte Antikörper ein schlechteres oder verzögertes Engraftment⁶². Da Granulozyten einen essenziellen Bestandteil der angeborenen Immunantwort darstellen, erhöht eine Neutropenie zudem das Risiko von bakteriellen oder mykotischen Infektionen.

1.2.1 Das HNA-1 Blutgruppensystem

Das klinisch relevanteste granulozytäre Antigenensystem ist HNA-1 mit seinen vier bisher beschriebenen Polymorphismen HNA-1a, -1b, -1c und dem extrem seltenen -1d⁶³⁻⁶⁵, die genetisch auf die Substitution fünf verschiedener Nukleotide innerhalb des FCGR3B Gens in unterschiedlicher Kombination zurückzuführen sind^{66,67}. Das resultierende Protein ist der stark glykosylierte Fc γ -Rezeptor IIIB (CD16b), der über einen Glykosylphosphatidylinositol- (GPI-) Anker mit der Granulozytenmembran verbunden ist. Während die Bindung von IgG Antikörpern im proximalen Bereich des Fc-Rezeptors stattfindet, sind die immunogenen Polymorphismen in der distalen Domäne lokalisiert und funktionell daher neutral. Wie in Abbildung 7 dargestellt ist, führen die Punktmutationen zum Austausch von Aminosäuren an den Positionen 36, 65, 78, 82 und 106. Das HNA-1a Antigen, welches durch das Allel FCGR3B*01 definiert wird, unterscheidet sich in vier Positionen zum Allel FCGR3B*02, welches HNA-1b und -1d exprimiert. Träger des FCGR3B*03 Allels exprimieren HNA-1b und -1c. HNA-1c unterscheidet sich lediglich durch den zusätzlichen Austausch von Alanin zu Asparaginsäure an Position 78 von HNA-1b und -1d. Bisher wurde in zwei Fällen ein anti-HNA-1b Antikörper beschrieben, der mit dem Allel FCGR3B*02 reagiert, nicht aber mit FCGR3B*03-positiven Neutrophilen. Offenbar sind nur Menschen, die homozygot

das Allel FCRG3B*03 tragen, gegen das HNA-1d Merkmal sensibilisierbar, die klinische Relevanz ist daher außerordentlich gering^{63,68}.

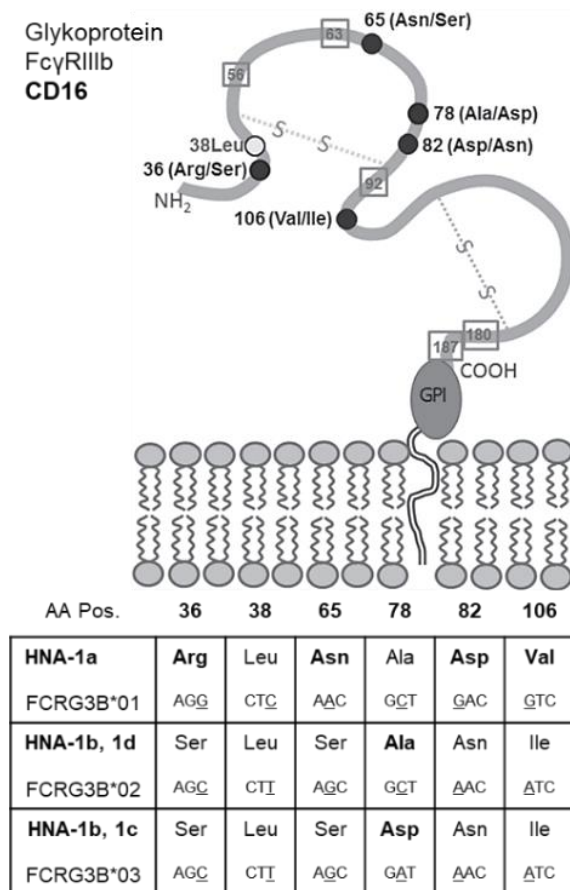


Abbildung 7: Schematische Darstellung des HNA-1 Glykoproteins in der Membran neutrophiler Granulozyten. Der transmembrane Fc-Gamma Rezeptor IIIb (FcγRIIIb) ist über einen GPI-Anker mit der granulozytären Membran verbunden. Der HNA-1 Polymorphismus basiert auf der wechselseitig kombinierten Substitution von 5 Nukleotiden (unterstrichen). Die dadurch beeinflussten Aminosäuren, die zum HNA-1-Polymorphismus beitragen, sind in dem Schema als schwarze Kreise dargestellt und darunter tabellarisch aufgeführt. Die erste alternative Aminosäure gibt dabei die Lage von HNA-1a an. Die Epitope HNA-1a und HNA-1b unterscheiden sich in den Aminosäurepositionen 36, 65, 82 und 106. Das HNA-1c Epitop weicht an der Position 78 von der Sequenz des HNA-1b Epitops ab. Da die Kombination der polymorphen Aminosäuren auf den beiden Allelen variieren können, kann ein HNA-1 Glykoprotein mehr als ein HNA-1 Epitop aufweisen. Weiterhin besitzt das HNA-1a Antigen vier potenzielle N-gebundene Glykosylierungsstellen an den Positionen 56, 63, 92, 180 und 187 (Quadrate). Adaptiert von Fleisch & Reil, (2018)⁶⁹.

1.3 Blutgruppenantigene auf humanen Thrombozyten

Genau wie auf Erythrozyten und neutrophilen Granulozyten sind auch auf der Oberfläche von Thrombozyten spezifische, polymorphe Antigenstrukturen vorhanden, welche Alloantikörper induzieren können. Die humanen Plättchenantigene (HPAs) können anhand ihrer zugrundeliegenden codierenden Gene in sechs biallelische Systeme (HPA-1, HPA-2, HPA-3, HPA-4, HPA-5 und HPA-15) unterteilt werden, wobei das häufiger vorkommende Major-Antigen als „a“ und die niedrigfrequente Variante als „b“ gekennzeichnet ist^{70,71}. Zusätzlich zu den 12 biallelischen Antigen-Epitopen, die molekulargenetisch auf SNPs (engl. *single nucleotide polymorphisms*) zurückzuführen sind, wurden bisher 23 weitere assoziierte Antigene beschrieben⁷². Wichtige Zielstrukturen in der thrombozytären Membran, die zur Bildung von anti-HPA Alloantikörpern führen können, sind in Abbildung 8A dargestellt. Neben dem von-Willebrand-Faktor- (vWF-) Rezeptor sind vor allem der Fibrinogen-Rezeptor, welcher sich aus den Glykoproteinen (GP) IIb und IIIa zusammensetzt, und der Kollagen-Rezeptor, aufgebaut aus GP Ia und IIa, von Bedeutung. Wie in Abbildung 8B schematisch zu sehen ist, befindet sich auf dem Integrin $\beta 3$ (CD61) des GP IIb/IIIa Komplexes der immunogene HPA-1a/b Polymorphismus. Zusätzlich ist das polymorphe Merkmal HPA-3 auf dem Integrin α IIb (CD41) lokalisiert. Während GP IIb explizit auf Thrombozyten exprimiert wird, kommt das Integrin $\beta 3$ auch auf endotheliale Gewebe vor, wo es als Heterodimer-Komplex mit Integrin α V den Vitronektin-Rezeptor bildet. Ein weiterer relevanter Polymorphismus ist HPA-5a/b auf dem Integrin α 2 (CD49b) des Ia/IIa-GP Komplexes. Bislang werden Antikörper, die gegen humane Plättchenantigene gerichtet sind, nicht routinemäßig untersucht, da sie erheblich seltener vorkommen als erythrozytäre Antikörper und außerhalb der Geburtshilfe nur von eingeschränkter klinischer Relevanz sind. Dennoch können thrombozytäre Antikörper verschiedene klinische Krankheitsbilder, beispielsweise Immunthrombozytopenien (ITP), Refraktärzustände nach Multi-Thrombozytentransfusion⁷³, Posttransfusionelle Purpura (PTP)⁷⁴ vor allem aber Fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenien (FNAIT)⁷⁵ auslösen. Die FNAIT wird im Wesentlichen durch anti-HPA-1a oder anti-HPA-5b Antikörper verursacht (Abbildung 8C). Aktuelle Erkenntnisse deuten darauf hin, dass insbesondere anti-HPA-1a Antikörper, die mit dem endothelialen α V/ β 3 Integrin-Heterodimer kreuzreagieren, kausal an der FNAIT mit zerebralen Blutungen beteiligt sind.

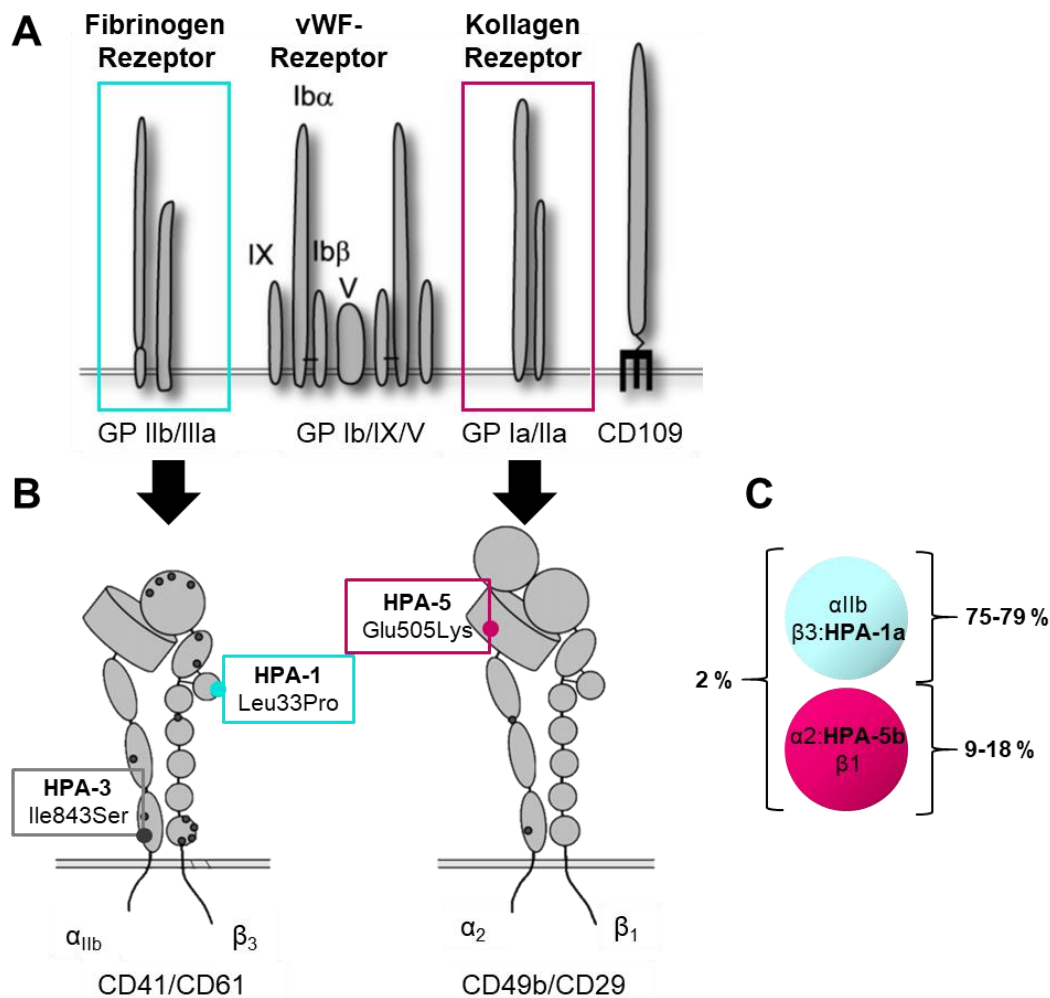


Abbildung 8: Alloantigene auf humanen Thrombozyten. **A:** Glykoprotein-Komplexe auf der thrombozytären Membran. Neben dem Fibrinogen-Rezeptor (blaues Kästchen), der sich aus dem Glykoprotein (GP) IIb und IIa zusammensetzt, stellt auch der Kollagen-Rezeptor (GP Ia/IIa; pinkes Kästchen) eine wichtige Zielstruktur für die Bildung von Antikörpern, die gegen humane Plättchenantigene (HPAs) gerichtet sind, dar. Aber auch auf dem Glykoprotein Ib α , welches Teil des von-Willebrand-Faktor- (vWF-) Rezeptors ist, oder den Glykoproteinen IV und V, sind polymorphe Aminosäuren lokalisiert, welche die Bildung von anti-thrombozytären Antikörpern auslösen können. **B:** Domänenstruktur der Glykoprotein-Komplexe IIb/IIIa und Ia/IIa. Der Glykoprotein-Komplexe IIb/IIIa ist ein Heterodimer, bestehend aus dem Integrin α_{IIb} (CD41) und dem β_3 -Integrin (CD61). Auf der β -Kette des Komplexes befindet sich an Aminosäureposition 33 der immunogene HPA-1 Polymorphismus (blaues Kästchen). Auf der α -Kette des Komplexes ist außerdem der HPA-3 Polymorphismus lokalisiert. Als weitere wichtige Zielstruktur für anti-HPA Antikörper ist der Ia/IIa-Glykoprotein-Komplex aufgeführt. Dieser setzt sich aus dem Integrin α_2 (CD49b), auf dem sich der HPA-5 Polymorphismus befindetet, und dem Integrin β_1 (CD29) zusammen. **C:** Ursächliche anti-HPA Antikörper bei fetaler/neonataler Alloimmunthrombozytopenie. Aus Analysen ging hervor, dass 75-79 % der FNAIT-verursachenden Antikörper gegen das Antigen HPA-1a und 9-18 % gegen das HPA-5b Antigen gerichtet sind, wobei bei etwa 2 % der Untersuchungen sowohl anti-HPA-1a als auch anti-HPA-5b Antikörper vorlagen⁷⁵⁻⁷⁷. Modifiziert nach Curtis & Mcfarland (2014)⁷⁸ sowie *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie* (2011)⁷⁹.

1.3.1 Fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT)

Die Inkompatibilität humaner Plättchenantigene kann bereits ab der ersten Schwangerschaft zu schwerwiegenden Komplikationen führen⁸⁰. Wird dem Fötus ein väterliches Thrombozytenantigen vererbt, für welches die Mutter negativ ist, kann es zu einer Alloimmunisierung der Mutter kommen. Wie in Abbildung 9 dargestellt, kann durch den transplazentaren Übertritt maternalen IgG Antikörper in den fetalen Kreislauf eine fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie verursacht werden⁸¹. Die FNAIT tritt schätzungsweise bei 1/800 bis 1/1000 Geburten auf⁸² und kann schwerwiegende Folgen für das Neugeborene haben.

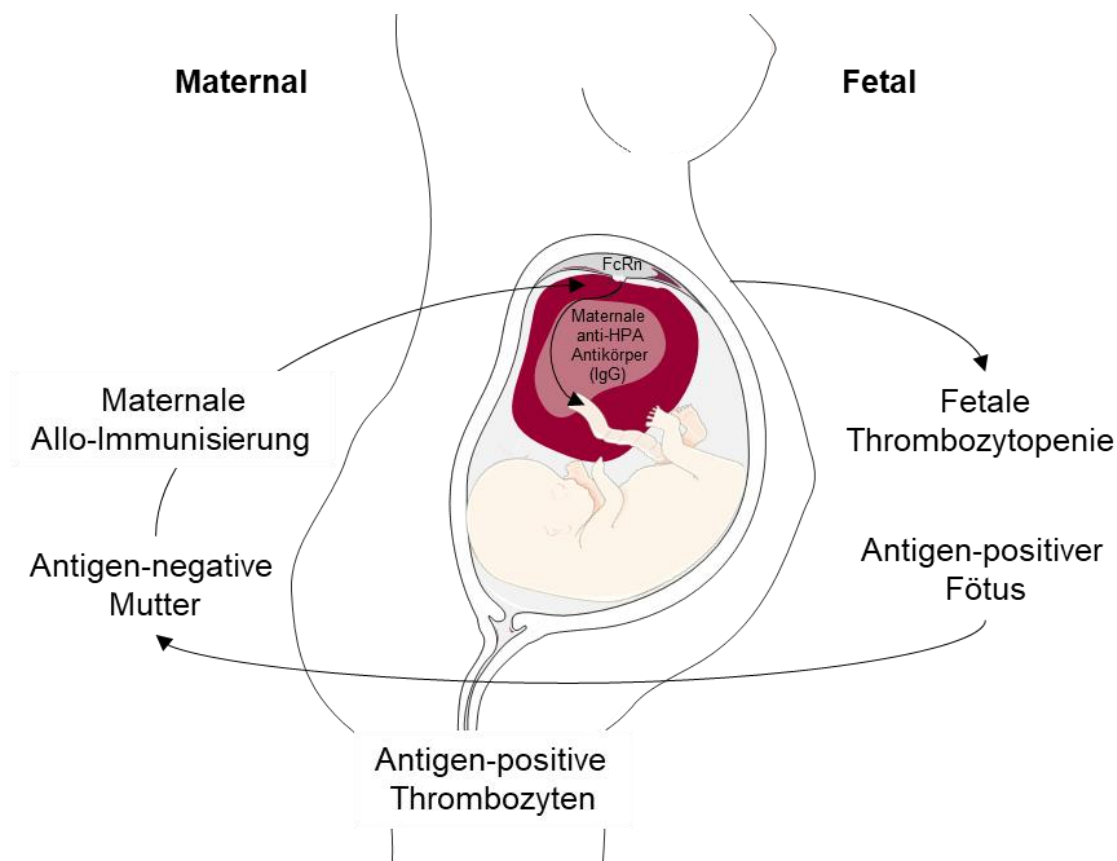


Abbildung 9: Entstehung einer fetalen/neonatalen Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT). In einer Schwangerschaft, bei der der Fötus ein väterlich vererbtes, humanes Plättchenantigen auf seinen Thrombozyten trägt (=Antigen-positiv), welches die Mutter nicht besitzt (=Antigen-negativ), kann es durch den Übertritt fetaler Blutplättchen in den maternalen Kreislauf zu einer Alloimmunisierung der Mutter kommen. Die maternalen anti-HPA Antikörper der Klasse IgG können über den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) durch die Plazenta in den fetalen Kreislauf gelangen und eine Thrombozytopenie auslösen. Modifiziert nach Vadasz. *et al.* (2015)⁸³, Blanchette, Johnson & Rand (2000)⁸⁴ und Chen *et al.* (2010)⁸⁵.

In Folgeschwangerschaften muss beachtet werden, dass der Schweregrad der Thrombozytopenie zunehmen kann⁸⁶. Im Gegensatz zur RhD-Prophylaxe, die vorbeugend bei Rh-inkompatiblen Schwangerschaften zur Vermeidung eines *Morbus haemolyticus neonatorum* verabreicht werden kann, ist derzeit für die FNAIT keine vorgeburtliche Präventionstherapie verfügbar. Anzeichen für das Vorliegen einer Alloimmunthrombozytopenie bei Neugeborenen sind beispielsweise Petechien, Hämatome oder gastrointestinale oder retinale Blutungen^{75,81,87}. Klinisch wird die Diagnose über den Nachweis von anti-HPA Antikörpern im Plasma der Mutter bestätigt. Das Testverfahren basiert auf dem monoklonalen Antikörper-spezifischen Immobilisationstest für Plättchen-spezifische Antigene (MAIPA), bei dem frische, immobilisierte Spender-Thrombozyten mit bekanntem Phänotyp als Antigen-Matrix dienen⁸⁸. Bei etwa 10 % der Fälle kann es im Verlauf der FNAIT zu schwerwiegenden Komplikationen kommen⁸⁰. Es besteht die Gefahr einer vital bedrohlichen intrauterinen oder postnatalen intrakraniellen Blutung mit Residualsyndrom, zum Teil mit schweren spastischen Bewegungsstörungen oder Tetraparesen^{87,89}. Auch weitere schwere neurologische Schäden können auftreten. Um das Risiko blutungsbedingter Folgeschäden gering zu halten, ist neben einer schnellen Diagnose vor allem eine zügige Versorgung mit kompatiblen Thrombozytenkonzentraten von höchster Priorität. In der kaukasischen Bevölkerung sind die zugrundeliegenden Antikörper im Wesentlichen gegen die Polymorphismen HPA-1a oder HPA-5b gerichtet, weshalb in großen Blutbanken HPA-1a- bzw. HPA-5b-negative Thrombozytenkonzentrate für die Versorgung der Neugeborenen regelhaft bereitgehalten werden sollten. Es wird allerdings diskutiert, ob das Krankheitsbild des FNAIT mit zerebralen Blutungen nur bedingt auf die zum Teil sehr schwere Thrombozytopenie, sondern vielmehr auf die antikörpervermittelte Endotheldysfunktion infolge mit dem Vitronektin-Rezeptor kreuzreagierender anti-HPA-1a Antikörper zurückzuführen sein könnte⁹⁰⁻⁹². Diese sehr aktuelle Diskussion ist für etwaige prophylaktische Interventionen relevant, mindert jedoch nicht die potenzielle Nützlichkeit von Hochdurchsatz-fähigen Tests zur Detektion von anti-HPA-1a und -5b Antikörpern.

1.4 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die die Prüfung der Hypothese, dass xenogene Testzellen, die humane Blutgruppenantigene exprimieren, für die immunhämatologische Diagnostik eingesetzt werden können. Es soll jeweils ein Beispielpanel für erythrozytäre, granulozytäre und thrombozytäre Blutgruppenantigene, sowie eine Zelllinie zur Depletion therapeutischer Antikörper generiert und verifiziert werden, um für das theoretisch erdachte System Evidenz zu generieren. Hierfür musste zunächst eine geeignete Zelllinie gefunden werden, die in der Lage ist, die humanen Blutgruppenantigene auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Die Expression komplexer Blutgruppenantigene erfordert einen spezifischen molekularen Kontext, wie beispielsweise die Co-Expression bestimmter Strukturproteine. Durch die Verwendung einer murinen Zelllinie soll die Kreuzreaktivität mit humanen Plasmaproben verhindert werden. Etwaige homologe Proteine, die mit den humanen Blutgruppenantigenen um Bindungsstellen in den Makromolekülkomplexen kompetieren könnten, sollen mittels CRISPR/Cas9 Technologie exemplarisch aus dem Genom der Testzelllinie deletiert werden. Auch wenn Antikörper gegen Rh Blutgruppenantigene selten eine diagnostische Herausforderung darstellen, wurde dieses komplexe Blutgruppensystem exemplarisch zum Nachweis anti-erythrozytärer Antikörpern ausgewählt. Um die Eignung der murinen Zellen für die Expression humaner granulozytärer Antigene zu untersuchen, sollte ein Testpanel zur Detektion von HNA-1 Antikörpern entwickelt werden. In Bereich der HPA Antikörper Diagnostik wäre ein Testzell-Panel zum Nachweis und zur Spezifikation von anti-HPA-1a und anti-HPA-5b Antikörpern, das bei thrombozytopenischen Neugeborenen mit Verdacht auf fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie eingesetzt werden kann, von klinischem Interesse. Neben der Funktionalität und Spezifität der generierten Testzellen soll auch überprüft werden, ob die Blutgruppenantigene genetisch modifizierbar sind. Für Situationen, in denen sich mehr als ein Polymorphismus auf einem Antigen befindet, sollen nicht-natürliche, antigenisch "neutrale" Mutanten erzeugt werden. Eine alternative Verwendung der Testzellen stellt die spezifische Depletion von Antikörpern aus Patientenplasma dar. Basierend auf dem beschriebenen Prinzip sollte eine Zelllinie zur prä-analytischen Depletion monoklonaler anti-CD38 Antikörper generiert werden.

2. Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die verwendeten Materialien und Geräte inklusive der entsprechenden Hersteller aufgeführt und alle in der Arbeit angewandten Methoden detailliert beschrieben.

2.1 Materialien

Im nachfolgenden Absatz werden die genutzten Reagenzien und Chemikalien sowie die verwendeten Antikörper, Anti-Seren, Größenstandards und Kits unter Angabe des jeweiligen Herstellers aufgelistet. Weiterhin sind die für die Durchführung notwendigen Geräte und die für die Bearbeitung und Auswertung verwendete Software aufgeführt.

2.1.1 Reagenzien und Chemikalien

Alle verwendeten Reagenzien und Chemikalien sind in Tabelle 1 aufgelistet, ihr Anwendungszweck wird im weiteren Verlauf erläutert.

Tabelle 1: Übersicht aller verwendeten Reagenzien und Chemikalien.

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ampicillin-Natriumsalz (Amp)	AppliChem GmbH, Frankfurt, GER
Bovines Serumalbumin (BSA)	VWR International, Radnor, USA
Chloroquin-Diphosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach, GER
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium (DMEM), GlutaMAX™	Gibco, Carlsbad, USA
Dulbecco's phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS)	Lonza, Basel, CH

Material und Methoden

Bezeichnung	Hersteller
Essigsäure (99,8 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol (96 %)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Isopropanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
LB-Agar, Lennox	MP Biomedicals, Santa Ana, USA
LB-Medium, Lennox	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
Natriumchlorid Lösung (0,9 %)	B. Braun, Melsungen, GER
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco, Carlsbad, USA
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Protaminsulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Puromycin Dihydrochlorid (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI) 1640 Medium; GlutaMAX™	Gibco, Carlsbad, USA
TRIS-HCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Gibco, Carlsbad, USA

2.1.2 Antikörper

In Tabelle 2 sind alle Antikörper aufgeführt, die für den durchflusszytometrischen Nachweis humaner Antigene sowie zur Detektion gebundener, humaner Antikörper genutzt wurden. Neben dem jeweiligen Hersteller gibt die Tabelle Auskunft über den verwendeten Klon und ggf. das Fluorochrom, welches an den Antikörper gekoppelt ist.

Tabelle 2: Übersicht aller verwendeten Antikörper.

Bezeichnung	Klon	Fluorochrom	Hersteller
Anti-human CD16	3G8	PE	BioLegend, San Diego, USA
Anti-human CD29	TS2/16	PE	BioLegend, San Diego, USA
Anti-human CD38	HIT2	PE, APC	BioLegend, San Diego, USA
Anti-human CD41	HIP8	APC	BioLegend, San Diego, USA
Anti-human CD41/CD61	A2A9/6	PE	BioLegend, San Diego, USA
Anti-human CD47	CC2C6	PE	BioLegend, San Diego, USA
Anti-human CD49b	NKI- SAM-1	PE, APC	BioLegend, San Diego, USA
Anti-human CD51/61	23C6	PE	BioLegend, San Diego, USA
Anti-human CD61	VI-PL2	PE, APC	BioLegend, San Diego, USA
Anti-human CD240DCE	REA327	APC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, GER
Anti-human IgG Fc	HP6017	APC, Biotin	BioLegend, San Diego, USA
Anti-human IgM	MHM-88	Biotin	BioLegend, San Diego, USA
Streptavidin	0.2 mg/ml	APC	BioLegend, San Diego, USA

2.1.3 Anti-Seren

In der folgenden Tabelle werden alle kommerziellen Testseren aufgeführt, die für die Testung der generierten Zelllinien verwendet wurden. „Human polyklonal“ impliziert, dass es sich um aus Plasma sensibilisierter Patienten aufgereinigte Antikörper handelt.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten kommerziellen Anti-Seren.

Bezeichnung	Spezies	Klon	Hersteller
Anti-Lu ^a	human	polyklonal	Medion Grifols Diagnostics AG, Düdingen, CHE
Anti-Lu ^b	human	polyklonal	CE-Immundiagnostika GmbH, Neckargemünd, GER
Anti-k	human	polyklonal	CE-Immundiagnostika GmbH, Neckargemünd, GER
Anti-Kp ^a	human	polyklonal	CE-Immundiagnostika GmbH, Neckargemünd, GER
Anti-Kp ^b	human	polyklonal	CE-Immundiagnostika GmbH, Neckargemünd, GER

2.1.4 Größenstandard

Für die Analyse von DNA-Fragmenten wurde der *GeneRuler 1kb Plus DNA ladder* von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) verwendet.

2.1.5 Kits

Die in Tabelle 4 beschriebenen Kits wurden nach den jeweiligen Herstellerangaben verwendet.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Kits.

Bezeichnung	Hersteller
BD Quantibrite™ Beads	BD Biosciences, San Jose, USA
PrimeScript RT	Takara Bio, Kyoto, JPN
QIAamp® RNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden, GER
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen,

Bezeichnung	Hersteller
	Hilden, GER
QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
ZR Plasmid Miniprep - Classic	Zymo Research, Irvine, USA
ZymoPURE™ II Plasmid Maxiprep Kit	Zymo Research, Irvine, USA

2.1.6 Geräte

Tabelle 5 enthält Informationen über Modell und Hersteller aller Messinstrumente und Geräte, die für die Experimente verwendet wurden, die jeweilige Anwendung wird im Weiteren beschrieben.

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Geräte.

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Autoklav	Varioklav H+P	HP Medizintechnik, Oberschleißheim, GER
Automatisches Hämazytometer	Hemavet Multi-Cell 3 /LV	Drew Scientific, Miami Lakes, USA
Bakterienschüttler	MaxQ 4000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Brutschrank	IN30	Memmert GmbH, Schwabach, GER
Durchflusszytometer	LSR Fortessa II	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
	FACS Aria II	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Fluoreszenzmikroskop	IX71	Olympus, Shinjuku, JPN
Gefrierschrank	MDF-53V (-80 °C)	Sanyo Osaka, JPN
	ÖkoArctis (-20 °C)	AEG, Frankfurt am Main, GER
Gelelektrophoresekammer	Compact XS/S	Biometra, Göttingen, GER

Material und Methoden

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Heizblock	Thermomixer R	Eppendorf AG, Hamburg, GER
Inkubator	Steri Cycle CO ₂ Incubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kühlschrank	Profi-Line	Liebherr, Bulle FR, CH
Lichtmikroskop	CKX41	Olympus, Shinjuku, JPN
Magnetrührer	FB15001	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
pH Meter	HI 2211 pH/ORP Meter	Hanna Instruments, Vöhringen, GER
Spannungsquelle	PowerPac Basic	BioRad, Hercules, USA
Spektrophotometer	NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sterilwerkbank	Holten Safe 2010 1.2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermo-Cycler	Biometra Tone	Analytik Jena, Jena, GER
Transilluminator	Gel Doc™ XR+	BioRad, Hercules, USA
UV Licht Tisch	FL 117/2 Fluorescent tables	Renner GmbH, Dannstadt, GER
Vortexer	TopMix 15024	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Waage	MC1	Sartorius, Göttingen, GER
Wasserbad	WNE7	Memmert GmbH, Schwabach, GER
Zählkammer	Neubauer improved	OPTIK-Labor, Friedrichsdorf, GER
Zentrifuge	MIKRO 120 tabletop	HettichZentrifugen, Tuttlingen, GER
	Rotina 420R	HettichZentrifugen, Tuttlingen, GER
	DiaMed ID- Centrifuge 24S	DiaMed, Cressier, CH

2.1.7 Software

Die Software, die für die Erhebung und Auswertung der Daten notwendig war, ist in Tabelle 6 aufgeführt, die jeweilige Anwendung wird im Verlauf beschrieben.

Tabelle 6: Übersicht der verwendete Software.

Bezeichnung	Hersteller
Chromas Lite 2	Technelysium Pty Ltd., Helensvale, AUS
Clone Manager 9	Sci Ed Software LLC., Westminster, USA
FACSDiva 7	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
FlowJo™ Software 10.7.1	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Image Studio 2	Li-Cor, Lincoln, USA
Microsoft Office Standard 2016	Microsoft, Redmond, USA
Servier Medical Art	Servier, <i>Creative Commons Attribution 3.0 unported license</i>
SYNTHEGO Knockout Guide Designer	Synthego Corporation, Menlo Park, USA

2.2 Molekularbiologische Methoden

In diesem Kapitel werden alle elementaren Schritte, die zur Klonierung von Plasmiden erforderlich waren, aufgeführt und in ihrer Durchführung beschrieben. Nachdem zunächst mRNA aus humanen Zellen isoliert und in komplementäre DNA (engl. *complementary DNA*, cDNA) umgeschrieben werden musste, konnten von diesem Template ausgehend die gewünschten Gensequenzen humaner Blutgruppenantigene amplifiziert und aufgereinigt werden. Diese DNA-Sequenzen wurden in lentivirale Vektoren integriert und anschließend in kompetente Bakterien transformiert, um daraus die Plasmide präparieren zu können. Diese wurden durch eine analytische Restriktion und DNA-Sequenzierung überprüft.

2.2.1 mRNA-Isolierung

Zur Isolierung von mRNA aus humanem Knochenmark oder aus Stammzellapheresaten wurde das QIAamp® RNA Blood Mini Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Hierzu wurde zunächst eine Knochenmarkprobe am automatischen Hämazytometer gemessen, um die Leukozytenkonzentration zu bestimmen. Ausgehend davon wurde eine Konzentration von 4000 bis maximal 7000 Leukozyten pro Mikroliter eingestellt. Nach einer Erythrozyten-Lyse wurden die Leukozyten pelletiert und anschließend aufgeschlossen und homogenisiert. Über eine Biopolymer-Säule wurde zunächst die DNA aus dem Lysat entfernt, woraufhin im Anschluss die mRNA selektiv an eine Silikat-basierte Membran gebunden wurde. Nach mehreren Waschschritten wurde die mRNA in 30 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Die Konzentration der gewonnenen mRNA wurde spektrometrisch, wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben, bestimmt.

2.2.2 cDNA-Synthese

Für die reverse Transkription der mRNA wurde das Kit PrimeScript RT verwendet. Der Ansatz sowie das Reaktionsschema für die Umschreibung in cDNA sind in Tabelle 7 und Tabelle 8 aufgeführt. Die cDNA wurde anschließend bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 7: Reaktionsansatz für die reverse Transkription.

Reagenz	Volumen
5x PrimeScript RT Master Mix	4 µl
mRNA	1 µg
RNase-freies Wasser	ad 20 µl

Tabelle 8: Reaktionsschema für die reverse Transkription.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Reverse Transkription	37 °C	15 min
Hitze-Inaktivierung	85 °C	5 sec
Herunterkühlen	4 °C	

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur *in vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (engl. *Polymerase chain reaction*, PCR) durchgeführt⁹³. Dabei wird ein von spezifischen Oligonukleotiden flankierter Bereich von einer thermostabilen DNA-Polymerase vervielfältigt. Hierbei wiederholt sich ein Zyklus bestehend aus der DNA-Denaturierung, Anlagerung (oder engl. *Annealing*) der Oligonukleotide und der Elongation. Die optimalen Reaktionsbedingungen sind von der verwendeten DNA-Polymerase abhängig. Das Reaktionsschema einer PCR mit der *Phusion High Fidelity* (HF) DNA-Polymerase von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) ist Tabelle 9 zu entnehmen. Die Anlagerung der Oligonukleotide ist dabei spezifisch und wird individuell an die Nukleotid-Länge und den GC-Gehalt angepasst. Grundsätzlich sollte bei der Planung der Oligonukleotide eine *Annealing*-Temperatur von ca. 58 °C angestrebt werden.

Tabelle 9: Reaktionsschema für die PCR mit der *Phusion* HF DNA-Polymerase.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	30 sec	
Denaturierung	98 °C	10 sec	} 35x
Annealing	X °C	30 sec	
Elongation	72 °C	30 sec/kb	
Finale Elongation	72 °C	7 min	
Herunterkühlen	4 °C	∞	

Die für die Reaktion notwendigen Komponenten sowie der Reaktionsansatz sind Tabelle 10 zu entnehmen.

Tabelle 10: Reaktionsansatz für die PCR.

Reagenz	Volumen	Konzentration
5x Phusion Green HF Buffer	10 µl	1x
10 mM dNTPs	1 µl	je 200 µM
Oligonukleotid_forward	2,5 µl	0,5 µM
Oligonukleotid_reverse	2,5 µl	0,5 µM
Template DNA	X µl	
Phusion DNA Polymerase	0,5 µl	0,02 U/µl
H ₂ O	ad 50 µl	

2.2.4 Mutagenese-PCR

Gezielte Mutationen, hier primär zur Generierung alternativer Blutgruppenantigenvarianten, wurden mit Hilfe des *QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit* in die Plasmide eingefügt. Bei diesem Verfahren wird, wie in Tabelle 11 beschrieben, zunächst das doppelsträngige DNA-Template denaturiert. Anschließend erfolgt die Anlagerung spezifischer synthetischer Oligonukleotide, die die gewünschte Mutation enthalten, gefolgt von der Elongation der DNA-Sequenz durch die *PfuUltra High-Fidelity* DNA-Polymerase. Die für die Mutagenese benötigten individuellen Oligonukleotide wurden über das *QuikChange Primer Design Program* (<https://www.agilent.com/store/primerDesignProgram.jsp>) online entworfen und von der Firma Microsynth Seqlab GmbH (Göttingen, GER) synthetisiert. Der Reaktionsansatz für die Mutagenese-PCR ist Tabelle 12 zu entnehmen. Durch eine einstündige Inkubation mit der *Dpn I* Endonuklease (10 U/µl) bei 37 °C direkt im Anschluss an die Mutagenese-PCR, wurde die methylierte parentale Plasmid-DNA verdaut. Es folgte eine Transformation der mutierten Plasmid-DNA in kompetente *E. coli*, siehe Kapitel 2.2.9.

Tabelle 11: Reaktionsschema für die Mutagenese-PCR mit der *PfuUltra* HF DNA-Polymerase.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	1 min	
Denaturierung	95 °C	50 sec	} 18x
Annealing	60 °C	50 sec	
Elongation	68 °C	1 min/kb	
Finale Elongation	68 °C	5 min	
Herunterkühlen	4 °C	2 min	

Tabelle 12: Reaktionsansatz für die Mutagenese-PCR.

Reagenz	Volumen	Konzentration
10x Reaktionspuffer	5 µl	1x
dNTPs Mix	1 µl	
Oligonukleotid_forward (125 ng)	1,25 µl	2,5 ng/µl
Oligonukleotid_reverse (125 ng)	1,25 µl	2,5 ng/µl
Template DNA (10 ng)	X µl	0,2 ng/µl
QuikSolution	3 µl	
H ₂ O	ad 50 µl	
PfuUltra HF DNA Polymerase	1 µl	2,5 U/µl

2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Trennung von DNA-Fragmenten anhand ihrer Größe wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde die DNA auf ein Gel aufgetragen, das je nach Fragmentgröße aus 1-2 % Agarose und einfach-konzentriertem Tris-Acetat-EDTA (TAE) Elektrophorese-Puffer hergestellt wurde. Die Zusammensetzung des Puffers ist Tabelle 13 zu entnehmen. Da das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA eine negative Ladung besitzt, können die Nukleinsäuren durch das Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt werden. Dabei passieren kleinere Fragmente das Gel schneller als große, da der Widerstand durch die Poren der Agarose geringer ist. Durch das Mitführen eines geeigneten Größenstandards (siehe 2.1.4) konnte die Länge der DNA-Sequenz ermittelt werden. Die Zugabe von Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) ermöglicht die Detektion der DNA-Fragmente unter UV-Licht.

Tabelle 13: Zusammensetzung des Elektrophorese-Puffers.

Bezeichnung	Zusammensetzung
TAE-Puffer	50x
TRIS-HCL	242 g
Essigsäure, 99,8 %	57,1 ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	100 ml
pH 8,3 einstellen	mit bidest. H ₂ O ad 1000 ml

2.2.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Hierzu wurde das gewünschte DNA-Fragment mit einem Skalpell auf einem UV-Licht Tisch aus dem Agarosegel ausgeschnitten, gewogen und anschließend in einem Solubilisierungs- und Bindungspuffer gelöst. Die DNA wurde an eine Silika-Membran basierte Säule gebunden, gewaschen und final mit 30 µl Pufferlösung von der Säule eluiert.

2.2.7 Bestimmung der DNA-/RNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA oder RNA wurde am Spektrophotometer NanoDrop 2000 bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Zusätzlich wurde eine Messung bei 280 nm durchgeführt und ein 260/280 Verhältnis angegeben, welches Auskunft über die Reinheit der gemessenen Probe gibt. Grundsätzlich soll der Wert bei reiner DNA bei etwa 1,8 und bei RNA bei 2,0 liegen.

2.2.8 Herstellung von Vektoren

Für die Überexpression humaner Blutgruppenantigene wurden die codierenden DNA-Sequenzen zunächst in lentivirale *Gene Ontology* (LeGO) Vektoren integriert. Diese bicistronischen Vektoren verbinden das Transgen über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) mit einem fluoreszierenden Markerprotein⁹⁴. Der schematische Aufbau eines LeGO Vektors ist in Abbildung 10 dargestellt.

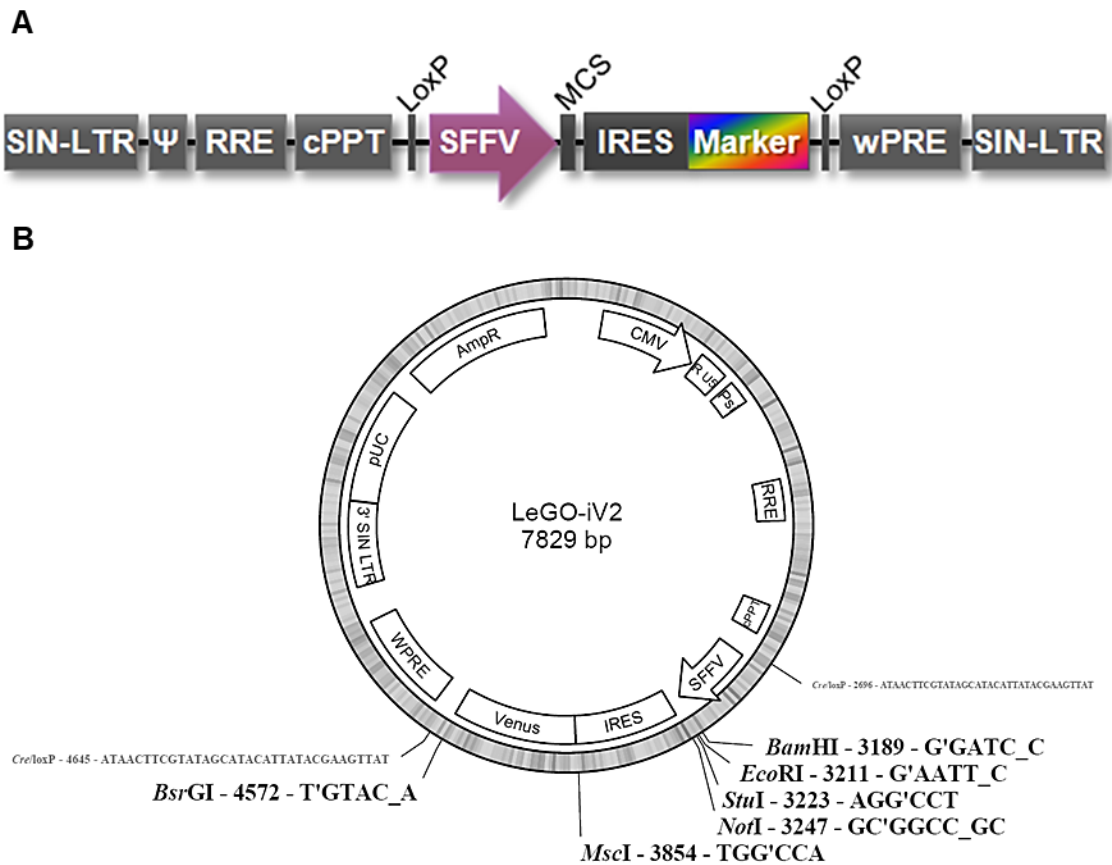


Abbildung 10: Aufbau eines LeGO Vektors der dritten Generation für die cDNA Expression. Dargestellt sind die einzelnen Domänen, aus denen sich der Vektor zusammensetzt (**A**). Auf eine selbst-inaktivierende (SIN) *long terminal repeat* (LTR) Region, die für die Integration in das Genom benötigt wird und den Vektor an den Enden flankiert, folgt ein *Rev response* Element (RRE) sowie ein integrierter, zentraler Polypurintrakt (cPPT). Hinter dem *spleen focus-forming virus* (SFFV) Promotor befindet sich die *multiple cloning site* (MCS), die über eine *internal ribosome entry site* (IRES) Struktur mit einem Selektionsmarker verbunden ist. Es folgt ein Woodchuck Hepatitis Virus post-transkriptionales regulatorisches Element (wPRE). Die Karte des Plasmids LeGO-iV2 (**B**) zeigt den zirkulären Vektor inklusive der vorhandenen Schnittstellen für Restriktionsenzyme in der MCS. Der Vektor besitzt ein Ampicillin-Resistenzgen (AmpR), welches der spezifischen Selektion dient. Modifiziert nach Weber, Bartsch, Stocking & Fehse (2008)⁹⁴.

Für die Deletion homologer, muriner Antigene wurden über den SYNTHOGO Knockout Guide Designer (Synthego Corporation, Menlo Park, USA) *single guide* RNAs (sgRNAs) ausgewählt, die mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Editierung des Genoms führen. Wie in Abbildung 11 dargestellt, enthält das lentivirale Plasmid lentiCRISPRv2 eine für Säugetiere Codon-optimierte Cas9-Nuklease aus *Streptococcus pyogenes* und einen etwa 2 kb großen Bereich, in den die gewünschte sgRNA-Sequenz integriert werden kann^{95,96}.

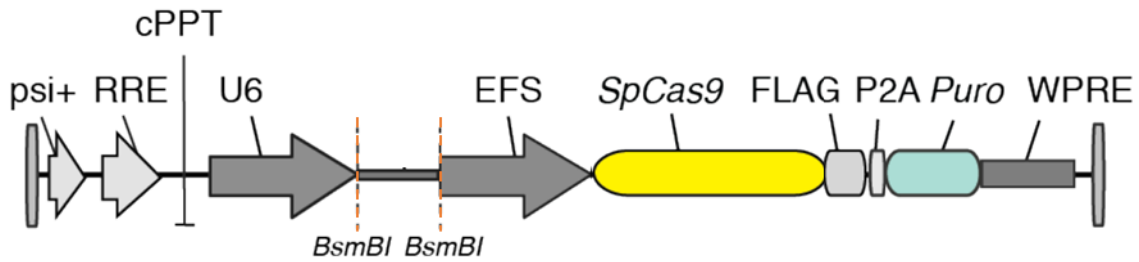


Abbildung 11: Aufbau des lentiCRISPRv2 Vektors zur Co-Expression von *Streptococcus pyogenes* Cas9 und einer *single guide* RNA. Vor dem U6-Promotor liegen neben dem Psi Verpackungs-Signal (psi+) noch ein *Rev response* Element (RRE) sowie ein integrierter, zentraler Polypurintrakt (cPPT). Hinter dem Promotor befindet sich ein 2 kb großer Bereich, der über eine Restriktion mit dem Enzym *BsmBI* entfernt werden kann, um die gewünschte sgRNA-Sequenz in den Vektor zu integrieren. Hinter dem Elongationsfaktor-1 α Kurzpromotor (EFS) befindet sich die *Streptococcus pyogenes* Cas9 (*SpCas9*) Sequenz, gefolgt von einem FLAG-Octapeptid-Tag, einem 2A selbstspaltendem Peptid (P2A) und einem Puromycin-Selektionsmarker (Puro), sowie einem posttranskriptionellen regulatorischen Element (WPRE). Modifiziert nach Sanjana, Shalem & Zhang(2014)⁹⁵ sowie Shalem *et al.* (2014)⁹⁶.

Zur Herstellung dieser sgRNA-Inserts wurden Oligonukleotide entworfen, die über etwa 20 bp mit der ausgewählten Zielsequenz in dem murinen RhD Gen übereinstimmen und an den Enden von einer „NGG“ PAM-Sequenz flankiert sind. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide können Tabelle 14 entnommen werden. Vor der Integration in den Vektor wurden das Oligonukleotid-Paar, wie in Tabelle 14 beschrieben, mit Hilfe der T4 Polynukleotid Kinase (PNK) von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) unter Verwendung der in Tabelle 15 beschriebenen Parametern in einem Thermo-Cycler phosphoryliert und anschließend hybridisiert. Um die Zielsequenz in die *multiple cloning site* (MCS) eines entsprechenden Vektors einzufügen, wurde dieser zuerst linearisiert (siehe 2.2.8.1). Anschließend wurde das Insert entweder über eine Ligation (siehe 2.2.8.2) oder alternativ Sequenz- und Ligations-unabhängig (siehe 2.2.8.3) in das Plasmid integriert. Zur Herstellung letiviraler Partikel wurden außerdem das Verpackungsplasmid psPAX2 und das *Vesicular stomatitis virus G* (VSV-G) Hüll-expressionsplasmid pMD2.G benötigt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Ausgangsvektoren sind in Tabelle 16 aufgelistet.

Tabelle 14: Reaktionsansatz für die Phosphorylierung der Oligonukleotide.

Reagenz	Sequenz	Volumen
mRhD-gRNA3_for	5'-CACCGCCTCCGGAATTTGACCTCA-3'	1 μ l
mRhD-gRNA3_rev	5'-TTTGACTCCCAGTTTAAGGCCTCCG-3'	1 μ l
10x T4 Ligase Puffer		1 μ l
T4 PNK		5,0 μ l
H ₂ O		ad 10 μ l

Tabelle 15: Reaktionsschema für die Phosphorylierung und Hybridisierung der Oligonukleotide.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Phosphorylierung	37 °C	30 min
Denaturierung	95 °C	5 min
Hybridisierung	25 °C	5 °C/min

Tabelle 16: Übersicht der verwendeten Ausgangsvektoren.

Vektor	Marker	Funktion	Herkunft
LeGO-iCer2	Cerulean	cDNA-Expression	Prof. Dr. rer. nat. Boris Fehse Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf; GER
LeGO-iG2	eGFP	cDNA-Expression	
LeGO-iV2	Venus	cDNA-Expression	
LeGO-iT2	tdTomato	cDNA-Expression	
LeGO-iT2	mCherry	cDNA-Expression	
lentiCRISPRv2	Puromycin-Resistenz	CRISPR/Cas9-Expression	Addgene plasmid # 52961
pMD2.G		VSV-G <i>env</i>	Addgene plasmid # 12259
psPAX2		HIV-1 <i>gag/pol</i>	Addgene plasmid # 12260

2.2.8.1 Restriktion

Zur Modifikation der Enden von PCR-Produkten und zur Linearisierung von Vektoren wurden die in Tabelle 17 aufgeführten *FastDigest* Enzyme von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Zusätzlich wurden die linearisierten Vektoren vor der weiteren Verwendung für die Klonierung mit einer thermosensitiven, alkalischen Phosphatase (*FastAP*; Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA) dephosphoryliert, um eine Re-Ligation des DNA-Fragments zu verhindern. Alle *FastDigest* Enzyme, sowie auch die alkalische Phosphatase sind in *FastDigest Green* Reaktionspuffer aktiv, wodurch auch multiple Restriktionen gleichzeitig durchgeführt werden konnten. Zur Überprüfung isolierter Plasmide (siehe 2.2.11) wurde eine analytische Restriktion der DNA durchgeführt.

Tabelle 17: Übersicht der verwendeten Restriktionsenzyme.

Bezeichnung	Erkennungssequenz
<i>FastDigest</i> BamHI	5'...G↓GATCC...3' 3'...CCTAG↑G...5'
<i>FastDigest</i> BsmBI (Esp3I)	5'...CGTCTCN ₁ ↓3' 3'...GCAGAGN ₅ ↑5'
<i>FastDigest</i> EcoRI	5'...G↓AATTC...3' 3'...CTTAA↑G...5'
<i>FastDigest</i> NotI	5'...GC↓GGCCGC...3' 3'...CGCCGG↑CG...5'
<i>FastDigest</i> Eco147I (StuI)	5'...AGG↓CCT...3' 3'...TCC↑GGA...5'
<i>FastDigest</i> PvuI	5'...CGAT↓CG...3' 3'...GC↑TAGC...5'

2.2.8.2 Ligation

Für die Insertion einer gewünschten DNA-Sequenz in einen linearisierten Vektor wurde die T4 DNA Ligase von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) nach Herstellerangaben eingesetzt. Dabei wurde die eingesetzte Menge der Insert-DNA so kalkuliert, dass sie im Verhältnis zur Vektor-DNA in dreifach-molarem Überschuss vorlag (siehe Formel 1).

Formel 1: Berechnung der einzusetzenden Insert-DNA für die Ligation.

$$Insert [ng] = \frac{Vektor [ng] \times Insertlänge [bp]}{Vektorlänge [bp]} \times 3$$

2.2.8.3 Sequenz- und Ligations-unabhängige Klonierung

Neben der konventionellen Klonierung über Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten gibt es eine weitere Methode, bei der unabhängig von Sequenz und ohne eine Ligation DNA in Vektoren integriert werden kann, das *sequence- and ligation-independent cloning* (SLIC)⁹⁷. Diese Vorgehensweise bietet den Vorteil, dass für die Linearisierung des Ausgangsvektors nur ein Restriktionsenzym benötigt wird. Da LeGO Vektoren nur vier Restriktionsschnittstellen in ihrer MCS besitzen und diese häufig auch in den codierenden Sequenzen humaner Blutgruppenantigene vorhanden sind, stellt diese Methode eine alternative Herangehensweise dar. Neben dem linearisierten Vektor wurde über eine PCR mit speziell synthetisierten Oligonukleotiden ein DNA-Insert

generiert, welches 15 bis 20 bp lange, homologe Überhänge zu den beiden Enden des Vektors besaß. Die Insertmenge wurde mit Formel 1 so berechnet, dass sie in dreifachem Überschuss zur Vektor-DNA vorlag. Das Prinzip dieser Klonierung basiert auf der Verwendung der T4 DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific; Waltham, USA), die neben der DNA-Synthese vom 5'- zum 3'-Ende auch eine 3'-5' Exonukleaseaktivität, aber keine 5'-3' Exonukleaseaktivität besitzt. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 18 beschrieben. Während einer 2,5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erzeugt die T4 DNA Polymerase überhängende Enden. Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz für 10 min auf Eis gelagert, wobei es zur Anlagerung der Überhänge von Vektor und Insert kam. Es folgte eine Transformation in kompetente *E. coli* Zellen, wie im nachfolgenden Kapitel 2.2.9 beschrieben.

Tabelle 18: SLIC Reaktionsansatz.

Reagenz	Volumen	Konzentration
Vektor-DNA	X µl	1x pmol
Insert-DNA	X µl	3x pmol
T4 DNA Polymerase Puffer	4 µl	1x
T4 DNA Polymerase	0,5 µl	0,6 U
H ₂ O	ad 20 µl	

2.2.9 Transformation von Bakterien

Zur Vervielfältigung von Plasmiden wurde die zirkuläre DNA in kompetente *E. coli* Zellen transformiert. Der dafür verwendete Bakterienstamm *E. coli* NEB 10-beta wird in Tabelle 19 genauer beschrieben. Diese kompetenten Bakterien sind besonders effizient bei der Transformation größerer Plasmide, was bei der Klonierung von LeGO Vektoren, die als Ausgangsvektoren bereits eine Länge von mindestens 7800 bp ausweisen, von Vorteil ist. Nach den Vorgaben des Herstellers wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, bevor die DNA hinzugegeben wurde. Nach einer Ligation (siehe 2.2.8.2) oder nach SLIC (siehe 2.2.8.3) wurden 5 µl des Ansatzes für die Transformation verwendet. Bei Re-Transformation von Plasmiden wurde 1 µl des Ausgangsvektors eingesetzt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Aufnahme der freien DNA in die Zellen über einen Hitzeschock bei 42 °C für 30 Sekunden. Anschließend wurde die Reaktion für 5 Minuten auf Eis heruntergekühlt. Nach Zugabe von *Stable Outgrowth* Medium wurden die Bakterien für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und mit 250 rpm geschüttelt. In dieser Zeit konnte die Resistenz gegen das verwendete Antibiotikum zur Selektion ausgebildet

werden. Danach wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf eine vorgewärmte LB-Agar Platte mit Antibiotikum zur Selektion ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Tabelle 19: Charakterisierung kompetenter Bakterien für die Transformation.

Stamm	Genotyp	Hersteller
<i>E. coli</i> NEB 10-beta (DH10B Derivat)	$\Delta(ara-leu)$ 7697 <i>araD139 fhuA</i> $\Delta lacX74 galK16 galE15$ <i>e14-Φ80dlacZΔM15 recA1 relA1</i> <i>endA1 nupG rpsL (Str^R) rph spoT1</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$	New England Biolabs, Ipswich, USA

2.2.10 Kultivierung von Bakterien

Die Anzucht von Bakterien erfolgte in *lysogeny broth* (LB) Komplexmedium, welches sich aus den Bestandteilen Hefeextrakt, Trypton und Natriumchlorid zusammensetzt. Das Nährmedium kann flüssig verwendet werden oder durch Zugabe von Agar als Festmedium in Platten gegossen werden. Es wurde, wie in Tabelle 20 beschrieben, mit destilliertem Wasser angesetzt und anschließend zur Sterilisation autokloviert. Nach dem Abkühlen auf mindestens 60 °C erfolgte die Zugabe von Antibiotika, wie beispielsweise Ampicillin, für die spezifische Selektion von transformierten *E. coli*. Um einzelne Bakterienkolonien zu erhalten, wurde ein Ausstrich auf LB-Agar Platten mit Selektionsmedium durchgeführt. Die Platten wurden für etwa 16 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Kultivierung flüssiger Kulturen erfolgte im Bakterienrührer bei 37 °C und 250 rpm.

Tabelle 20: Zusammensetzung des Komplexmediums für die Bakterienkultur.

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium, Lennox	20 g/l
LB-Agar, Lennox	35 g/l
<i>optional:</i> Ampicillin	100 µg/ml

2.2.11 Plasmid-Präparation

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurden das ZR Plasmid Miniprep Kit oder das ZymoPURE™ II Plasmid Maxiprep Kit nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Dabei dient das Miniprep Kit der Gewinnung kleinerer, analytischer DNA-Mengen, wohingegen das Maxiprep Kit für die hochreine, endotoxinfreie Plasmid-aufreinigung zur Herstellung letiviraler Partikel benötigt wurde (siehe 2.3.2). Beide Kits basieren auf einem modifizierten Prinzip der alkalischen Lyse und der DNA-Extraktion über eine Säule. Als Ausgangsmaterial für die analytische Miniprep wurden 2 ml einer Bakterienkultur eingesetzt. Bei der Maxiprep wurde die Plasmid-DNA aus 200 ml einer über Nacht herangezogenen Bakterienkultur isoliert.

2.2.12 DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung der DNA-Sequenzen wurde eine Sanger-Sequenzierung bei der Firma Microsynth SeqLab GmbH (Göttingen, GER) in Auftrag gegeben. Hierfür wurde Plasmid-DNA mit einer Konzentration von 40-100 ng/µl benötigt. Bei PCR-Produkten wurde eine Konzentration von 1,5 ng/µl pro 100 bp empfohlen. Die DNA wurde in einem Volumen von 12 µl mit 3 µl Oligonukleotid-DNA (20 µM) gemischt und in separaten 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen zur Sequenzierung verschickt.

2.3 Zellbiologische Methoden

In diesem Kapitel werden alle Methoden zum Umgang mit eukaryotischen Zellen erklärt. In dieser Arbeit wurde eine humane Zelllinie für die Produktion lentiviraler Partikel eingesetzt. Zur Herstellung nicht-humaner, xenogener Testzellen für die immunhämato-logische Diagnostik wurden zwei murine Zelllinien verwendet. Neben der Kultivierung und Lagerung der Zelllinien wird auch die Herstellung lentiviraler Partikel und die Transduktion von Zelllinien zur stabilen Integration von DNA in das Genom beschrieben.

2.3.1 Kultivierung und Lagerung von Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten, eukaryotische Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ und 95 %-iger Luftfeuchtigkeit in spezifischem Medium mit Zusatz von fötalem Kälberserum (engl. *fetal calf serum*, FCS) und einem Antibiotika-Cocktail aus Penicillin und Streptomycin (Pen/Strep) in einem Steri Cycle CO₂ Inkubator kultiviert. Die für die Experimente benötigten, ursprünglichen Zelllinien, mit Hilfe derer neue Testzelllinien generiert wurden, sowie die Zusammensetzung des spezifischen Mediums, werden in Tabelle 21 beschrieben.

Langfristig wurden die Zelllinien bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierfür wurden je 1×10^7 Zellen in 1 ml Einfriermedium in CryoTube Vials (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) überführt und in einem Nalgene Cryo Gefrierbehälter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) über Nacht mit 1 °C pro Minute heruntergekühlt. Das Einfriermedium setzte sich dabei zu 70 % aus dem in Tabelle 21 beschriebenen spezifischen Medium zusammen und wurde zusätzlich mit 20 % FCS und 10 % DMSO versetzt.

Das Auftauen erfolgte zügig im Wasserbad bei 37 °C. Die Zellen wurden mit 9 ml Medium gewaschen und für 5 min bei 400 xg zentrifugiert, um das DMSO aus der Zellsuspension zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium in eine sterile T-75 Zellkulturflaschen mit Belüftungskappe (Sarstedt AG, Nümbrecht, GER) überführt.

Tabelle 21: Charakterisierung der verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Spezies	Medium	Zusätze	Herkunft
A0.01	<i>Mus musculus</i>	RPMI	10 % h. i. FCS 1 % Pen/Strep	Françoise Bachelerie, Unité d'Immunologie Virale, Institut Pasteur, Paris, FR
HEK293T /17	<i>Homo sapiens</i>	DMEM GlutaMAX™	10 % h. i. FCS 1 % Pen/Strep	ATCC CRL-11268G-1
MEL-745A cl. DS19	<i>Mus musculus</i>	DMEM GlutaMAX™	20 % h. i. FCS 1 % Pen/Strep	#ACC 501 Leibniz Institute DSMZ; Braunschweig, GER

2.3.1.1 Kultivierung von A0.01

Bei den A0.01 Zellen handelt es sich um eine murine T-Zelllinie, die von Dr. H. T. He (*Centre d'Immunologie de Luminy*, Marseille, FR) etabliert wurde. Die Suspensionszelllinie wurde in RPMI Medium mit 10 % FCS in T-25 Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, GER) kultiviert und alle drei bis vier Tage 1:6 passagiert.

2.3.1.2 Kultivierung von MEL-745A cl. DS19

Die murine, erythroleukämische Zelllinie MEL-745A ist eine Suspensionszelllinie, die durch Transformation des *Friend leukemia virus* Stamms 745A erzeugt wurde⁹⁸. Der Klon DS19 wurde als DMSO sensitiv beschrieben und kann in die erythroide Richtung differenziert werden⁹⁹. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in DMEM mit 20 % FCS in Suspensionskulturflaschen mit Belüftungskappe (Sarstedt AG, Nümbrecht, GER). In kontinuierlicher Kultur wurden die Zellen alle drei bis vier Tage 1:10 passagiert, so dass eine Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml nicht überschritten wurde.

2.3.1.3 Kultivierung von HEK293T/17

Bei den HEK293T Zellen handelt sich um eine epitheliale, humane Zelllinie aus der embryonalen Nebenniere, die durch Exposition mit Adenovirus-Typ-5-DNA Fragmenten transformiert wurde¹⁰⁰. Der HEK293T Subklon 17 zeichnet sich dadurch aus, dass diese Zelllinie besonders hohe Titer an viralen Partikeln erzeugen kann¹⁰¹. Die adhärenz Zellen wurden in T-175 Zellkulturflaschen mit Standard-Wachstumsfläche und Belüftungskappe (Sarstedt AG, Nümbrecht, GER) kultiviert und mussten alle zwei bis drei Tage passagiert werden. Hierfür wurde zunächst das alte Medium entfernt und die

Zellen mit 10 ml DPBS gewaschen. Darauf folgte eine zweiminütige Inkubation mit 3 ml Trypsin-EDTA bei 37 °C, die zur Ablösung der Zellen führte. Durch Zugabe von 7 ml FCS-haltigem Medium wurde die enzymatische Reaktion gestoppt. Um das Trypsin und nicht-vitale Zellen zu entfernen, wurden die Zellen für 5 min bei 60 xg zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 8 ml spezifischen Medium resuspendiert. Zur Kultivierung wurde 1/8 der Zellsuspension in frisches Medium überführt.

2.3.2 Transfektion zur Herstellung lentiviraler Partikel

Für die transiente Transfektion wurden 7×10^6 HEK293T/17 Zellen in einer 10 cm TC-Schale (Sarstedt AG, Nümbrecht, GER) ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Zellen. Hierfür wurde die Target-DNA zusammen mit den Verpackungsplasmiden psPAX2 und pMD2.G in einer 0,9 %igen Natriumchlorid (NaCl) Lösung aufgenommen und mit einer Lösung aus Polyethylenimin (PEI) gemischt. Anschließend wurde der Mix für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die genaue Zusammensetzung des Transfektionsansatzes ist in Tabelle 22 aufgeführt. Während der Inkubationszeit wurde das Komplexmedium von den HEK293T-Zellen entfernt und durch 9 ml frisches Medium mit 25 μ M Chloroquin-Diphosphat ersetzt. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen gegeben und vorsichtig geschwenkt. Nach 4 bis 6 h wurde das Transfektionsmedium entfernt. Die Zellen wurden vorsichtig mit 10 ml DPBS gewaschen und das Medium wurde durch 7 ml frisches Komplexmedium ohne Chloroquin-Diphosphat ersetzt. Die Transfektionseffizienz der LeGO Vektoren konnte nach etwa 24 h über die Expression des fluoreszierenden Marker-Proteins am Fluoreszenzmikroskop überprüft werden. Das Medium mit den lentiviralen Partikeln konnte 24 bis 48 h nach der Transfektion abgenommen werden. In Vorbereitung auf die Transduktion (siehe 2.3.3) wurde das Medium über einen 0,45 μ m PVDF Rotilabo-Spritzenfilter (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, GER) steril filtriert und konnte bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert werden.

Tabelle 22: Ansatz für die Transfektion von HEK293T/17 in einer 10 cm TC-Schale.

Komponente	Ansatz I	Ansatz II
NaCl (0,9 %)	500 μ l	500 μ l
PEI		77,6 μ l
Target Plasmid	10 μ g	
psPAX2	6 μ g	
pMD2.G	3 μ g	

2.3.3 Transduktion muriner Suspensionszellen

Für die Transduktion wurden 1×10^5 Zellen in 50 μl Komplexmedium in einer 12-Well Suspensionskultur Platte (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, GER) ausgesät. Die Suspension wurde mit steril filtriertem Medium, das die lentiviralen Partikel enthielt, auf 990 μl aufgefüllt und mit 10 μl Protaminsulfat [400 $\mu\text{g}/\text{ml}$] versetzt. Im Anschluss wurden die Zellen für 30 min mit 400 xg bei etwa 30 °C zentrifugiert, bevor sie zurück in den Inkubator gestellt wurden. Um die Effizienz zu verbessern, konnte die Transduktion seriell wiederholt werden. Hierfür wurden nach 24 h 750 μl des alten Mediums durch vorsichtiges Abnehmen mit der Pipette entfernt und durch frisches Medium mit lentiviralen Partikeln und Protaminsulfat (1:100) ersetzt. Die Transduktionseffizienz wurde am Fluoreszenzmikroskop oder durchflusszytometrisch (siehe 2.4.1) über die Expression der fluoreszierenden Marker-Proteine überprüft.

2.3.4 Einzelzell-Klonierung

Zur Isolation von Einzelzellklonen aus einer Zellpopulation wurde eine Klonierung mit limitierender Verdünnung durchgeführt. Dazu wurde zunächst mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer die Zellzahl bestimmt und eine limitierende Verdünnung mit einer Dichte von 0,5 Zellen pro Well bzw. 5 Zellen pro ml in dem entsprechenden Komplexmedium angesetzt. Anschließend wurden die Zellen in je 100 μl pro Well in einer 96-Well Rundboden-Kulturplatte (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, GER) ausgesät. Die Platten wurden für 10 bis 14 Tagen bei 37 °C im Inkubator gelagert, bis Zellkolonien erkennbar waren. Diese wurden zunächst in einer 48-Well Suspensionskulturplatte expandiert und schließlich durchflusszytometrisch (siehe 2.4.1) analysiert.

2.4 Immunhämatologische Methoden

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit immunhämatologischen Methoden zur serologischen Identifikation, Spezifikation, Titration und Depletion von Antikörpern gegen Blutgruppenmerkmale. Neben den konventionellen diagnostischen Verfahren wird auch die in dieser Arbeit etablierte, durchflusszytometrische Vorgehensweise beschrieben.

2.4.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht durch hydrodynamische Fokussierung die Analyse von einzelnen Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Dabei kann neben der relativen Größe und Granularität einer Zelle auch die Fluoreszenz gemessen werden.

2.4.1.1 Detektion und Spezifikation humaner Antikörper

In dieser Arbeit wurde eine neue Analyse-Methode für die durchflusszytometrische Detektion und Spezifikation humaner Antikörper entwickelt. Hierfür wurden xenogene Testzellen, die über lentivirale Transduktion (siehe 2.3.3) hergestellt wurden, mit einem Überschuss an parentalen Zellen gemischt. Die Menge der Testzellen wurde so eingestellt, dass sie pro untersuchter Antikörperspezies etwa 5 % der Gesamtpopulation ausmachten, wobei der Anteil der parentalen Zellen nicht geringer als 80 % sein sollte, da diese Zellpopulation als Referenz für die Reaktion betrachtet wurde. Das Testzell-Panel wurde in DPBS mit 0,5 % BSA aufgenommen und mit dem zu analysierenden Patientenplasma gemischt. Anschließend wurde die Reaktion für 15 min bei 37 °C (für IgG Antikörper) bzw. bei Raumtemperatur (für IgM Antikörper) inkubiert. Nach dem Waschen mit 1 ml DPBS mit 0,5 % BSA und anschließender, 5-minütiger Zentrifugation bei 400 xg folgte die Inkubation mit einem Detektionsantikörper, der gegen humane IgG bzw. IgM Antikörper gerichtet ist. Hierbei wurde entweder ein direkt APC-markierter oder alternativ ein Biotin-gekoppelter Antikörper verwendet. Anschließend wurde der Reaktionsansatz erneut mit 1 ml DPBS mit 0,5 % BSA gewaschen und zentrifugiert, um überschüssige Antikörper aus der Reaktion zu entfernen. Durch die Verwendung eines biotinylierten Detektionsantikörpers und die darauffolgende Inkubation mit einem APC-gekoppelten Streptavidin ließ sich die Signalintensität deutlich amplifizieren. Dieses Prinzip ist schematisch in Abbildung 12 dargestellt.

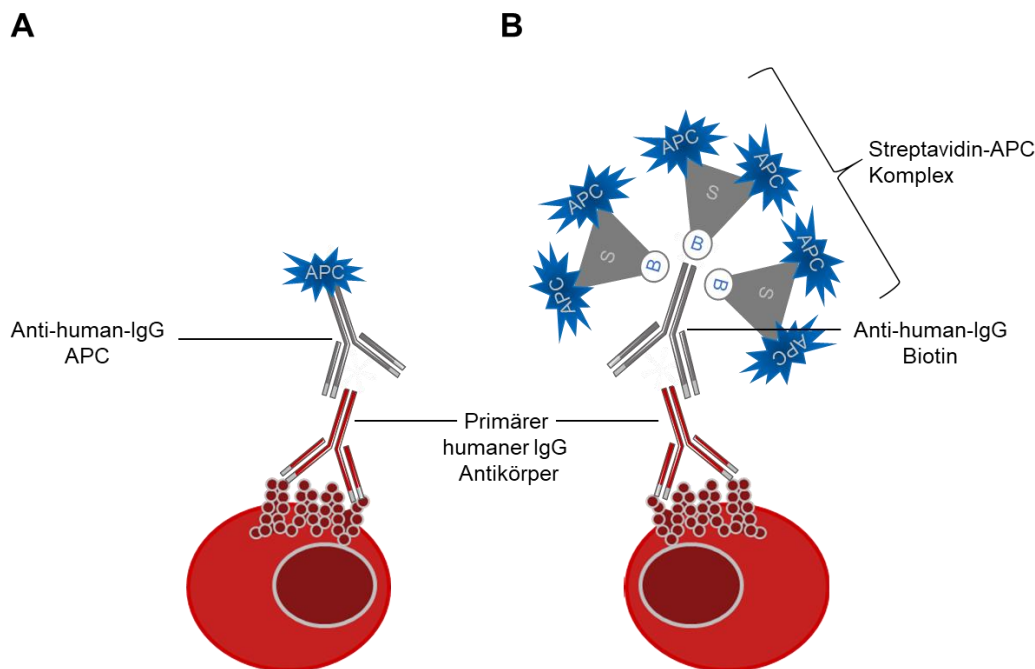


Abbildung 12: Amplifikation der Signalintensität zur Detektion humaner Antikörper. Die Bindung eines humanen Antikörpers an die Testzelle kann über einen APC-markierten Anti-human-IgG Antikörper (A) oder über einen biotinylierten Anti-human-IgG Sekundärantikörper und anschließende Markierung mit Streptavidin-APC (B) nachgewiesen werden. Durch die Kopplung von je zwei APC-Fluorophoren an ein Streptavidin-Molekül und die Bindung von drei Streptavidin-APC-Komplexen an einen Biotin-markierten Antikörper wird die Signalintensität vervielfacht.

Die unterschiedlichen Testzellen eines Panels konnten im Durchflusszytometer anhand ihres spezifischen Fluorochrom-Labels voneinander getrennt werden. Zuerst wurde die Gesamtpopulation der Zellen durch *side scatter* (SSC) und *forward scatter* (FSC) definiert. Über eine Korrelation von Fläche (*area* = A) und Höhe (*height* = H) im FSC konnten Dubletten von der Analyse ausgeschlossen werden. Die einzelnen Zellen wurden dann in den entsprechenden Kanälen auf die Expression der fluoreszierenden Marker-Proteine von den parentalen, untransduzierten Zellen unterschieden. Die Zellen konnten dabei auch mehrere Fluorochrome gleichzeitig exprimieren. Die Anregung von eGFP und Venus erfolgte durch den blauen Laser bei 488 nm und wurde im FITC Kanal gemessen. Cerulean wurde über den violetten Laser bei 405 nm angeregt und im AmCyan Kanal analysiert. Die Fluorochrome mCherry und tdTomato wurden durch den gelbgrünen Laser bei 561 nm angeregt und in den Kanälen PE-Texas Red bzw. in PE gemessen. Außerdem wurde die Fluoreszenz des Detektionsantikörpers im APC-Kanal in einem Histogramm betrachtet. Hierfür erfolgte die Anregung über einen roten Laser bei 640 nm. Eine allgemeine Strategie zur Differenzierung der Zellen im Durchflusszytometer ist in Abbildung 13 dargestellt.

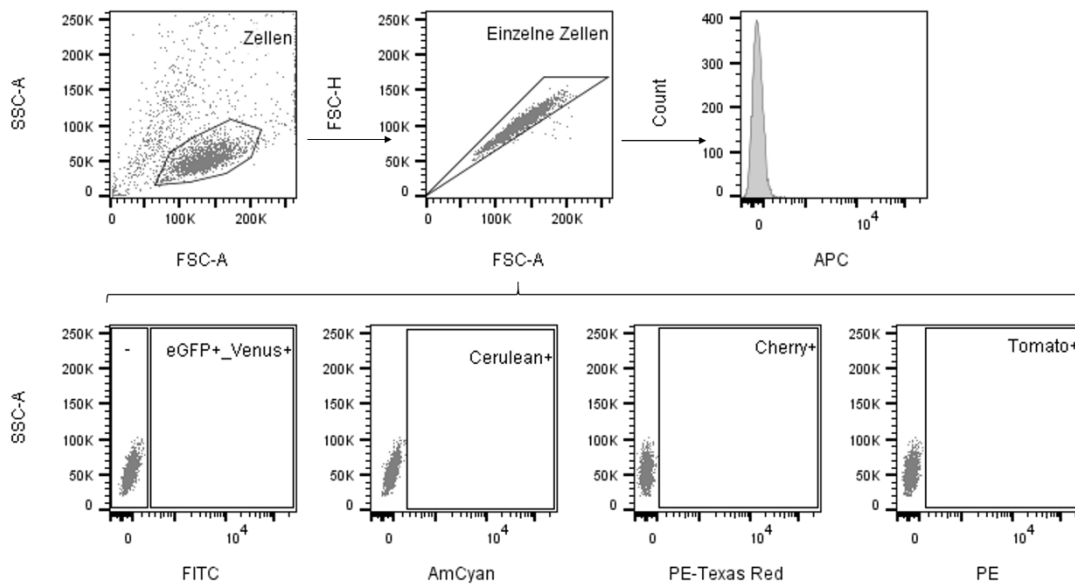


Abbildung 13: Allgemeine Gating Strategie zur Differenzierung der Zellen nach Expression des fluoreszierenden Marker-Proteins. Im Dot-Plot werden FSC und SSC gegeneinander aufgetragen und die Zielzell-Population definiert. Die Einzelzellen werden über FSC-A und FSC-H von den Dubletten abgegrenzt. Die Zellen werden in den entsprechenden Kanälen auf die Expression des Fluorochromes untersucht, wobei das Gate für den Marker anhand der parentalen, untransduzierten Zellen (grau) festgelegt wurde.

2.4.1.2 Antigendichtebestimmung

Für die Bestimmung der Antigendichte auf der Zelloberfläche wurde das BD Quantibrite Beads Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurden Beads mit definierten Mengen von PE-Konjugaten im Durchflusszytometer gemessen. Über die Korrelation des Logarithmus des geometrischen Means der vier verschiedenen Populationen (*Low*, *MedLow*, *MedHigh* und *High*) und des Logarithmus der definierten Anzahl an PE-Molekülen pro Bead wurde eine lineare Regression durchgeführt. Das Diagramm und die verwendete Geradengleichung sind in Abbildung 14 dargestellt. Durch die Färbung der zu analysierenden Zellpopulation mit einem PE-markierten, monoklonalen Antikörper konnte über die vorgegebene Geradengleichung die Anzahl der PE-Moleküle pro Zelle ermittelt werden.

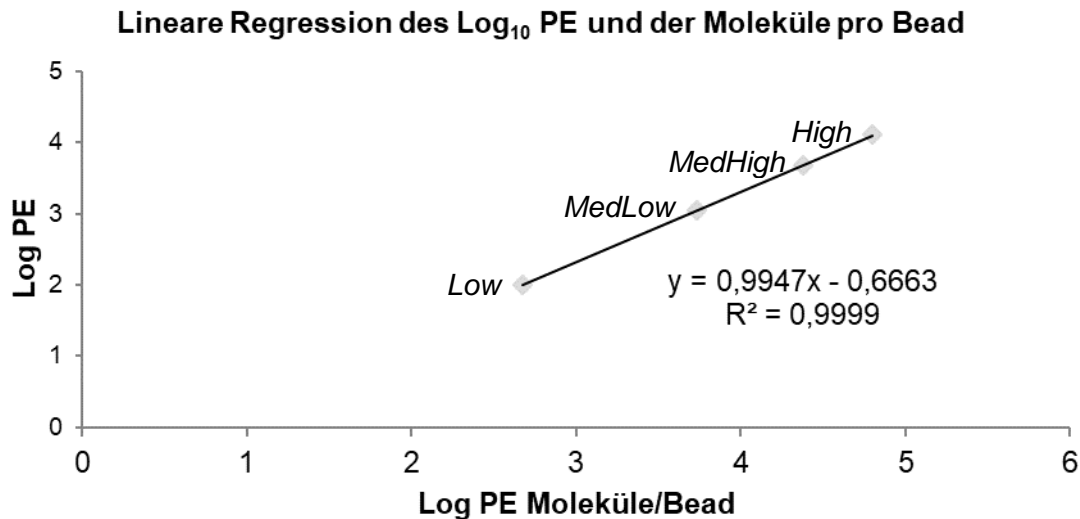


Abbildung 14: Lineare Regression zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Antigendichte auf der Zelloberfläche. Aufgetragen ist die Korrelation zwischen dem Logarithmus der PE-Moleküle pro Zelle und der logarithmischen PE-Fluoreszenz, die anhand von vier definierten PE-markierten Bead-Populationen (*Low*, *MedLow*, *MedHigh* und *High*) bestimmt wurde.

2.4.2 Stabilisierung zellulärer Antigene

Um die Blutgruppenantigen-exprimierenden xenogenen Testzellen über einen längeren Zeitraum zu lagern, musste ein neues Protokoll zur Stabilisierung etabliert werden. Dafür wurde das Reagenz TransFix (Cytomark, Buckingham, UK) verwendet. Für die Stabilisierung wurden die Zellen mit DPBS + 0,5 % BSA gewaschen. Anschließend wurden je 1×10^7 Zellen in 120 μ l DPBS aufgenommen und mit 30 μ l TransFix versetzt. Durch vorsichtiges Invertieren wurde der Ansatz gemischt und bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Das Reagenz ermöglichte die Stabilisierung von Oberflächenantigenen für bis zu 14 Tage und wurde bereits in grundsätzlich ähnlicher Anwendung in der klinischen Hämatologie und Immunologie verwendet¹⁰².

2.4.3 Indirekter Anti-Humanglobulin-Test in der Gelkarte

Der indirekte Anti-Humanglobulin-Test dient der Identifikation und Spezifikation von Antikörpern. Für den Antikörpersuchtest wurde das aus drei Testzellen bestehende, kommerzielle RBC-Panel Bio-Rad ID-DiaCell I-II-III (DiaMed GmbH, Cressier, CHE) verwendet. Das Bio-Rad ID-DiaPanel (DiaMed GmbH, Cressier, CHE), bestehend aus 11 Test-RBCs, diente der genaueren Differenzierung von Antikörpern. Für den Gelkarten-Test wurden 50 μ l einer 0,8 %igen Erythrozyten-Suspension in das Mikroröhrchen einer Bio-Rad ID LISS/Coombs Gelkarte (DiaMed, Cressier, CHE)

gegeben und mit 25 µl des zu untersuchenden Plasmas gemischt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 37 °C wurden die Karten in einer DiaMed ID Zentrifuge 24S (DiaMed, Cressier, CHE) für 10 min bei 950 rpm zentrifugiert. Danach erfolgten die Bewertung der Agglutinationsstärke und die Auswertung des Reaktionsmusters mit Hilfe der Antigen-Tabelle.

2.4.4 Bestimmung des Antikörper-Titers

Um den Titer eines spezifischen Antikörpers zu bestimmen, wurde das zu analysierende Plasma seriell in DPBS verdünnt, bis der Antikörper nicht mehr nachweisbar war. Hierzu wurde die Verdünnungsreihe mit gepoolten, Antigen-positiven Test-RBCs (mindestens 3 unterschiedliche Spenderzellen), wie in 2.4.3 beschrieben, auf eine Gelkarte aufgetragen. Die letzte Verdünnungsstufe, bei der noch eine Agglutination erkennbar war, gibt den Antikörper-Titer an.

2.4.5 Herstellung DTT-behandelter Test-RBCs

Für serologische Untersuchungen bei Patienten unter Daratumumab-Therapie wurden für den Antikörpersuchtest DTT-behandelte Test-RBCs verwendet. Dazu wurde je 1 ml einer 3 %igen Erythrozytensuspension zunächst zentrifugiert und einmal mit DPBS gewaschen. Dann wurde das Erythrozyten-Pellet (ca. 30 µl) in 120 µl einer 0,2 mol/L DTT-Lösung für 45 min bei 37 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation und vier darauffolgenden Waschschrritten mit DPBS konnten die Erythrozyten in 2,5 ml Diluent 2 (DiaMed GmbH, Cressier, CHE) aufgenommen werden, so dass eine 0,8 %ige Suspension entstand.

2.4.6 Prä-analytische Depletion von anti-CD38 Antikörpern

Die spezifische Depletion von monoklonalen anti-CD38 Antikörpern wurde im Rahmen dieser Arbeit als zuverlässige Methode zur Vorbereitung von Patientenplasmen für die serologische Diagnostik etabliert. Hierbei wurden 75 µl des analytischen Plasmas mit 3×10^7 CD38-exprimierenden *Darasorb* Zellen für 20 min bei 37 °C und 950 rpm in einem Thermomixer R inkubiert. Die Zellen wurden durch eine anschließende Zentrifugation für eine Minute bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge pelletiert. Anschließend konnte das Plasma als Überstand abgenommen und für konventionelle Tests verwendet werden.

3. Ergebnisse

Zur ersten Überprüfung der Hypothese, dass humane Blutgruppenantigene in nicht-humanen Zellen exprimiert werden und diese xenogenen Testzellen zur Detektion und Spezifikation irregulärer humaner Antikörper verwendet werden können, wurde zunächst ein vergleichsweise simpel aufgebautes Blutgruppensystem gewählt. Die antithetischen Antigene Fy^a und Fy^b des Duffy Blutgruppensystems wurden zusammen mit den Fluorochromen dsRed bzw. zsGreen in der murinen, lymphoiden Zelllinie A0.01 co-exprimiert. Die generierten Testzellen wurden mit humanen Patientenplasmaproben, welche irreguläre anti-Fy Antikörper enthielten, inkubiert. Die humanen Antikörper konnten über einen Fluorochrom-gekoppelten Detektionsantikörper im Durchflusszytometer spezifiziert werden. Dies zeigte, dass es grundsätzlich möglich ist, humane Multipass-Transmembranproteine auf der Oberfläche muriner Zellen zu präsentieren. Fraglich blieb jedoch, ob dieses Prinzip auch auf humane Blutgruppenantigene übertragen werden kann, die in komplexere molekulare Strukturen in der Zellmembran integriert sind.

3.1 Expression komplexer erythrozytärer Antigene

Um die Expression komplexer erythrozytärer Antigene im molekularen Kontext einer nicht-humanen Zelle zu untersuchen, wurde das Rh Blutgruppensystem betrachtet. Die Rh Antigene werden erythroid-spezifisch exprimiert, wobei ihre Expression einen geeigneten molekularen Kontext, unter anderem die Co-Expression des strukturgebenden Rh-assoziierten Glykoproteins (RhAG) erfordert. In Anbetracht dieser Tatsache wurden murine, erythroleukämische MEL-745A Zellen zunächst mit einem Plasmid transduziert, welches die Expressionskassetten des humanen RHAGs zusammen mit den Fluorochromen Venus oder alternativ tdTomato enthielt. Darauf folgend wurden die RhAG-exprimierenden Zellen erneut mit verschiedenen Varianten der Rh Antigene zusammen mit einem weiteren Fluorochrom transduziert. Auf diese Weise wurden Testzellen generiert, welche die Rh Antigene D, CE, Ce, cE und ce sowie C^w mit einem genetischen ce-Hintergrund, exprimierten. Diese sechs Zelllinien wurden mit parentalen MEL-745A Zellen zu einem Rh Testpanel vereint. Das Panel zum Nachweis von Antikörpern gegen die sechs Varianten der Rh Antigene ist in Abbildung 15 zu sehen. Die Differenzierung der einzelnen Spezies im Durchflusszytometer war durch die unterschiedliche Fluorochrom-Markierung der Zellen möglich. Nach Inkubation mit Patientenplasmen, die laut Gel-Agglutinationstest Antikörper gegen die untersuchten

Rh Antigene enthielten, konnte als erwartetes Ergebnis die Rechtsverschiebung der entsprechenden Zellpopulation im APC-Kanal beobachtet werden.

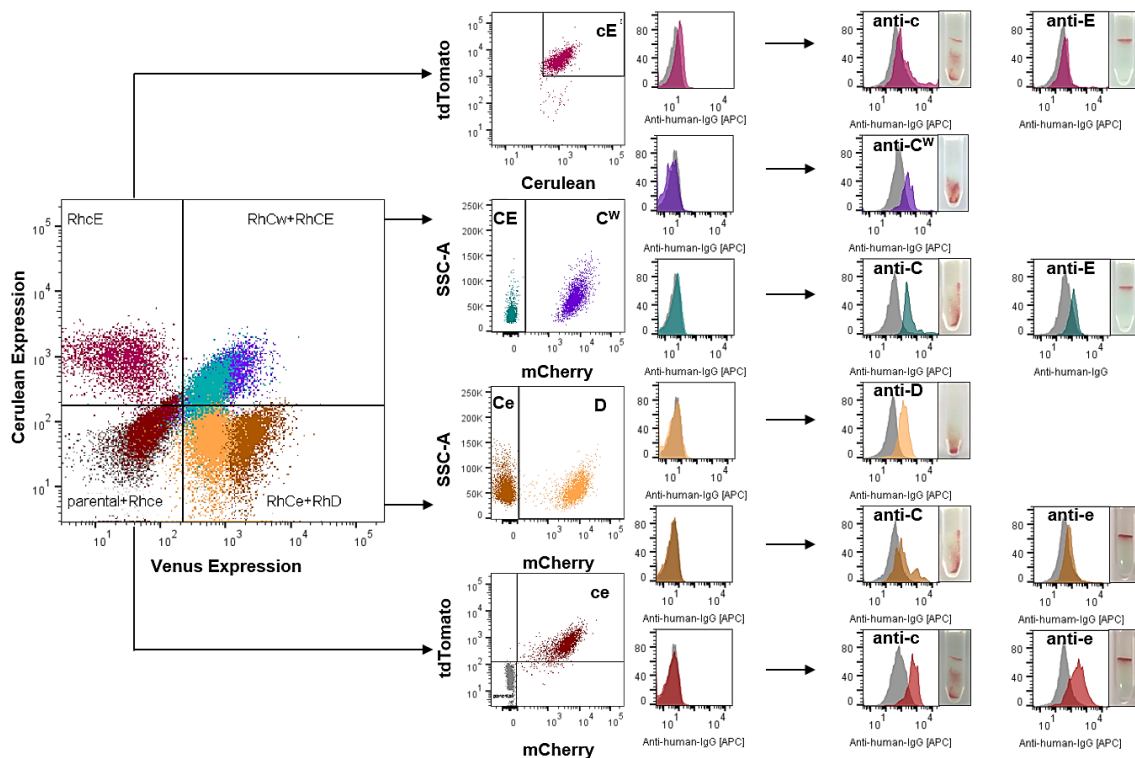


Abbildung 15: Testzell-Panel zum Nachweis und zur Spezifikation von Antikörpern gegen Antigene des Rh Blutgruppensystems. Die abgebildeten humanen Testzellen exprimieren das humane Rh-assoziierte Glykoprotein sowie jeweils ein humanes, polymorphes Rh Protein. Das Panel besteht aus einem Überschuss an parentalen, murinen Zellen und sechs verschiedenen Testzelllinien mit Rh Merkmalen. Neben Zellen, die das humane RhD exprimieren, sind fünf Varianten des RhCE Proteins vertreten. Auf dem RhCE Antigen befinden sich unter anderem die Polymorphismen C/c und E/e, die in den Varianten CE, Ce, ce und cE in dem Panel vertreten sind. Weiterhin verfügt das Panel über eine Testzelle, die den C^W Polymorphismus im genetischen Kontext mit der Variante ce trägt. Diese ist, im Gegensatz zu allen anderen Testzellen, mit drei statt zwei Fluorochromen markiert. Über die farbliche Codierung lassen sich die Testzellen zunächst über die Expression der Fluorochrome Venus und Cerulean unterscheiden, wodurch die RhcE Zellen von allen anderen Panelzellen getrennt werden können. Über die mCherry-Expression können RhC^W und RhCE exprimierende Zellen voneinander unterschieden werden. Die Trennung von RhCe und RhD sowie Rhce und parentalen Zellen erfolgt ebenfalls über die mCherry-Expression. Bei der Betrachtung der Testzellen im APC Kanal liegen alle Populationen im Histogramm übereinander. Nach der Inkubation der Zellen mit Patientenserum, die einen Antikörper gegen eines der untersuchten Merkmale enthalten, lässt sich eine Verschiebung der entsprechenden Zellpopulation gegenüber den parentalen Zellen (in grau) feststellen. Die Agglutinationsstärke im konventionellen Gel-Agglutinationstest mit homozygoten Test-RBCs ist neben jedem Histogramm angegeben.

Der deutliche Überschuss an parentalen murinen Zellen in dem Testpanel fungierte einerseits als Referenz für die Hintergrundfluoreszenz bzw. unspezifische Bindung des Detektionsantikörpers, diente andererseits aber auch der Erhöhung der Spezifität der Reaktion, indem dadurch die unspezifisch bindenden Plasmakomponenten quantitativ abgefangen werden sollten. Da als Trägerzelle der humanen Antigene eine murine Zelllinie ausgewählt wurde, musste jedoch in Betracht gezogen werden, dass die humanen Rh Antikörper mit dem murinen RhD Protein kreuzreagieren könnten. Um dies genauer zu untersuchen, wurde aus der parentalen MEL-745A Zelllinie mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die codierende Sequenz des murinen RhD Gens in einer PCR mit Oligonukleotiden amplifiziert, die, wie in Abbildung 16A dargestellt, im Bereich der untranslatierten Regionen binden. Das etwa 1300 bp große PCR-Produkt (Abbildung 16B) wurde aus dem Agarosegel extrahiert und mittels Sanger-Sequenzierung analysiert. Auf Grundlage dessen wurde auch die Aminosäuresequenz des murinen RhD Antigens betrachtet und mit den humanen Proteinsequenzen des RhD und des RhCE Antigens verglichen. Abbildung 16C zeigt dabei die Bereiche mit signifikanter Ähnlichkeit zwischen dem murinen Protein und den beiden humanen Proteinen RhD und RhCE. Das murine Protein besitzt mit 418 Aminosäuren eine Aminosäure mehr als die humanen Rh Varianten. Es zeigte sich eine 57 %ige Übereinstimmung des murinen Rh Proteins mit dem humanen RhD und eine 58 %ige Homologie zum RhCE-Protein. Beim detaillierten Vergleich der Aminosäuresequenzen in Abbildung 16D fällt allerdings auf, dass sich an Position 103, welche ausschlaggebend für den C/c Polymorphismus ist, in dem murinen Rh Protein weder die Aminosäure Serin (s) noch Prolin (p) befinden. Auch der humane RhC^w Polymorphismus an Position 41 konnte anhand der analysierten Sequenz in dem murinen RhD-Protein ausgeschlossen werden. Folglich konnte eine Kreuzreaktivität mit humanen anti-C, anti-c und anti-C^w Antikörpern ausgeschlossen werden. Bei genauerer Betrachtung der Aminosäureposition 226, die den E/e Polymorphismus definiert, fiel jedoch auf, dass sich sowohl in den humanen Varianten als auch in dem murinen Protein ein Alanin befand.

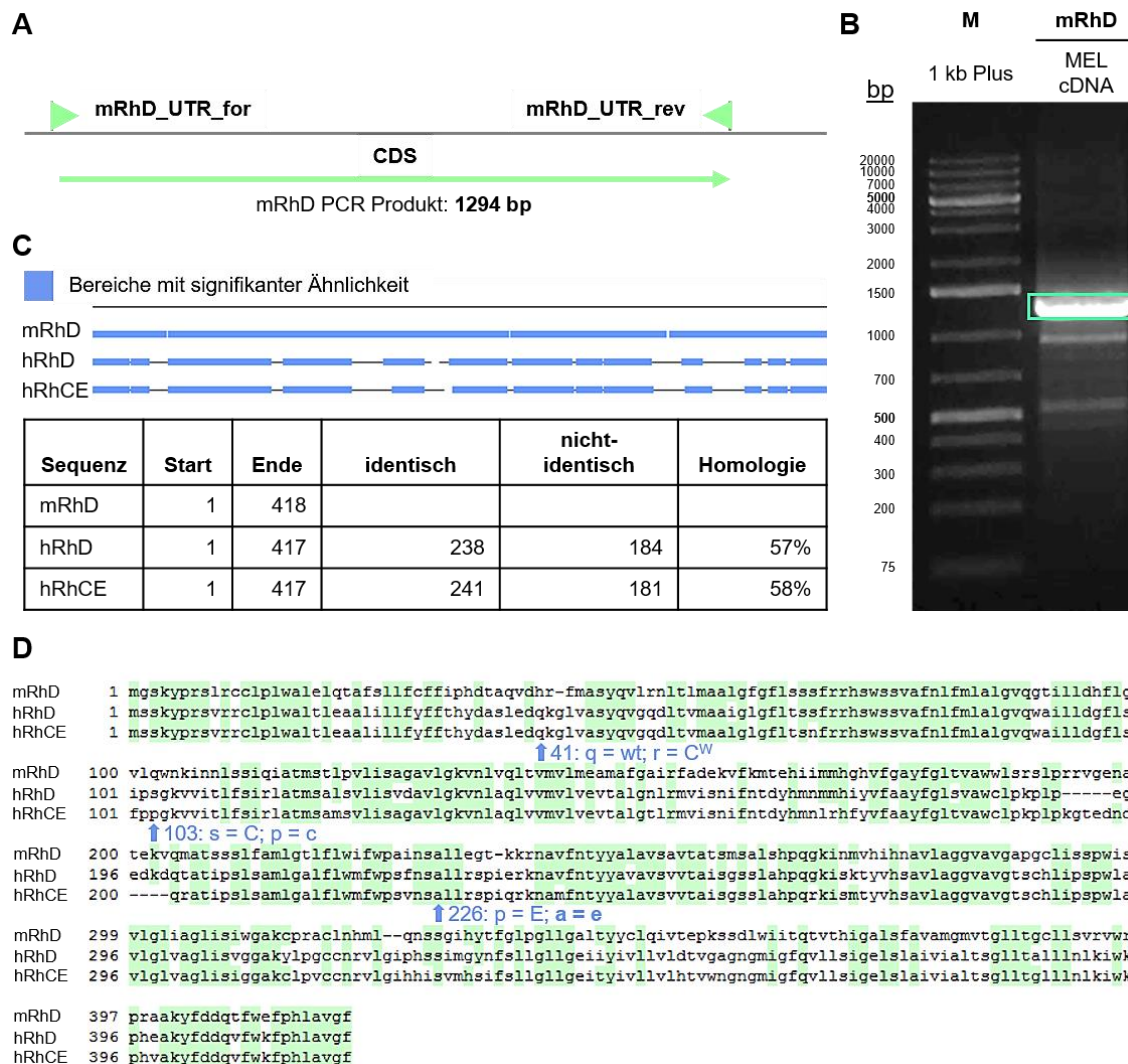


Abbildung 16: Nachweis der murinen RhD Expression in MEL-745A Zellen und Homologieanalyse zwischen murinen und humanen Rh Proteinen. Zum Nachweis der murinen RhD-Variante in MEL-745A Zellen wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden mRhD_UTR_for und mRhD_UTR_rev durchgeführt, die in den untranslatierten Regionen (UTRs) des murinen RhD Gens binden und die komplette codierende Sequenz (CDS) umschließen (A). Als Template für die PCR wurde aus der murinen Zelllinie mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Das 1294 bp große PCR-Produkt wurde auf ein 1 %iges Agarosegel geladen und eine Stunde bei 100 V elektrophoretisch aufgetrennt (B). Zur Betrachtung der Homologie zwischen murinen und humanen Rh Proteinen wurde ein globales Protein Alignment mit einer BLOSUM 62 Scoring Matrix durchgeführt. Die 418 Aminosäuren lange Sequenz des murinen RhD Proteins (mRhD) diente dabei als Referenzmolekül und wurde mit den Aminosäuresequenzen des humanen RhD (hRhD) bzw. RhCE (hRhCE) verglichen. In einer schematischen Übersicht (C) sind die Bereiche mit signifikanter Ähnlichkeit der drei Sequenzen in blau dargestellt. In der Sequenzansicht (D) sind Bereiche mit hoher Übereinstimmung bei gleicher Basisposition grün dargestellt. Der Polymorphismus C/c befindet sich an Position 103 des humanen RhCE Proteins. Dieser war in der murinen RhD-Variante nicht vorhanden, wohingegen der E/e Polymorphismus an Position 226 homolog in murinem RhD zu finden war. Da sich an dieser Position in dem murinen RhD Protein ein Alanin (a) befand, was phänotypisch der humanen e-Variante entsprach, könnten humane anti-e Antikörper potenziell mit dem murinen Rh Protein kreuzreagieren.

Somit entsprach das murine RhD Antigen phänotypisch der humanen Rh Variante „e“, wodurch eine Kreuzreaktion der murinen Testzellen mit humanen anti-e Antikörpern nicht vollständig ausgeschlossen werden konnte. Als potenzielle Lösung dieses Problems bietet sich eine spezifische Deletion des murinen RhD Gens aus dem Genom der parentalen Testzelllinie an. Hierfür wurde das CRISPR/Cas9 System angewandt. Zunächst wurde über das Online-Tool SYNTHOGO eine *guide* RNA (gRNA) Sequenz designt, die sich vor einer DNA-Sequenz mit einem Protospacer angrenzendem Motiv (engl. *protospacer adjacent motif*, PAM) befand. Die exakte Lage und die Sequenz der gRNA sind Abbildung 17A zu entnehmen. Nach der Synthetisierung der gRNA-Sequenz wurde diese in den Vektor lentiCRISPRv2 kloniert, der zusätzlich eine CRISPR-assoziierte Endonuklease (Cas9) enthielt. Die MEL-745A Zellen wurden mit dem lentiviralen Vektor transduziert und über die Co-Expression eines Puromycin-Resistenzgens selektiert und subkloniert. Nach Expansion wurde aus den Einzelzell-Klonen mRNA isoliert und in cDNA transkribiert. Der codierende Bereich des murinen RhD Gens wurde mittels PCR amplifiziert, extrahiert und anschließend sequenziert. Wie dem Chromatogramm in Abbildung 17B entnommen werden kann, ergab die Sequenzanalyse eine Insertion zweier Cysteine an der Position des durch die Cas9-Endonuklease herbeigeführten Doppelstrangbruchs vor der PAM-Sequenz. Diese Insertion zweier Basenpaare in der genomischen DNA verursachte eine Verschiebung des offenen Leserahmens (OLR), was in der Konsequenz zu einer veränderten Aminosäureabfolge führte. Durch diese Veränderung entstanden im Exon 3 des murinen RhD Gens mehrere Stop-Codons, in Folge derer die Translation des Proteins an dieser Stelle abgebrochen wurde. Das erste Stop-Codon entstand nach Nukleotid 345, wodurch ein 115 Aminosäuren großes, trunkiertes Protein gebildet werden könnte. Da der relevante, homologe e-Polymorphismus sich jedoch hinter diesem Abschnitt befand, konnte eine erfolgreichen Deletion der murinen RhD-Variante angenommen werden. Die hier generierte Zelllinie konnte somit als Referenz-Zelllinie für das Durchflusszytometrie-basierte Rh Testpanel verwendet werden.

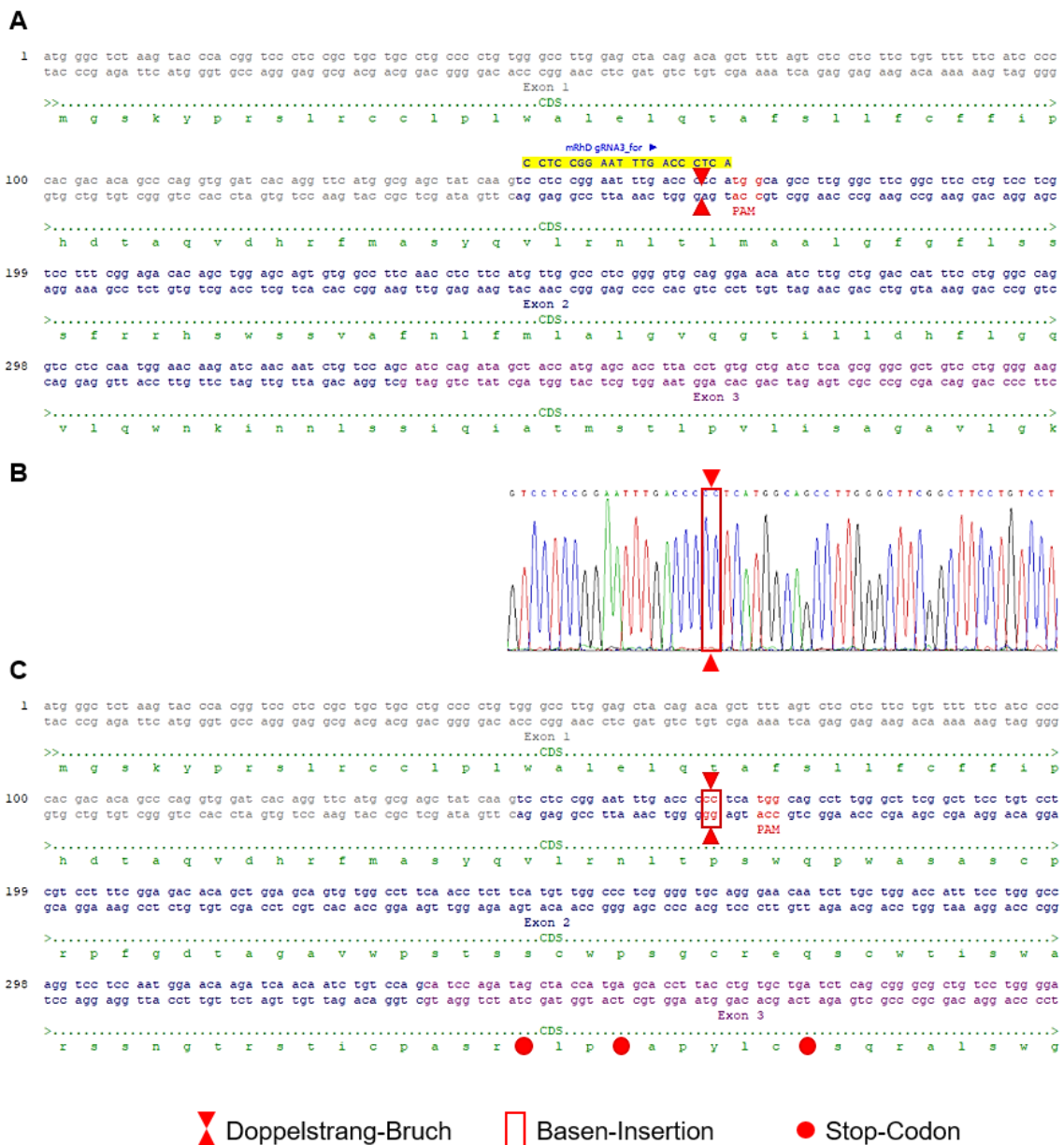


Abbildung 17: Sequenzanalyse des murinen RhD Blutgruppenantigens in MEL-745A Zellen. Aus der murinen Zelllinie wurde mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die mRHD codierende Sequenz (CDS) wurde mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Dargestellt ist die Sanger-Sequenzierung des mRHD Antigens in parentalen MEL-745A Zellen im *CloneManager* (A), sowie das mit *Chromas* analysierte Nukleotid-Chromatogramm (B) und die *CloneManager* Analyse der Sequenzierung einer MEL-745A mRHD-*Knockout*-Zelllinie (C), die mittels CRISPR/Cas erzeugt wurde. Die der Nukleotidabfolge entsprechende Aminosäuresequenz ist in grün unter den jeweiligen Basentriplets abgebildet. Über das Programm SYNTHOGO wurde eine *guide* RNA Sequenz (gelb markiert) generiert, die sich im Anfangsbereich des zweiten Exons (blau) direkt vor einer PAM-Sequenz (rot) befindet. Über die Cas9 wird ein Doppelstrangbruch (rotes Dreieck) verursacht. Bei der Reparatur des Doppelstrangbruchs kam es in der MEL-745A mRHD-*Knockout*-Zelllinie zur Insertion (rotes Kästchen) von zwei Cysteinen (c), was zu einer Verschiebung des Leserasters führte. Die Aminosäuresequenz des mRHD-Proteins verändert sich ab der Insertion und führte im Exon 3 (violett) zu einem Stop-Codon (roter Punkt) und somit zum Abbruch der Translation.

3.2 Expression granulozytärer Antigene

Um die Eignung der murinen Zelllinie für die Expression humaner granulozyten-spezifischer Antigene zu untersuchen, sollte ein Testpanel zur Detektion von anti-HNA Antikörpern entwickelt werden. Ein granulozytäres Antigenesystem von klinischer Relevanz ist das HNA-1 System mit den polymorphen Ausprägungen der Antigene HNA-1-a, -b, -c und -d, weshalb dieses Blutgruppensystem exemplarisch für die Expression granulozytenspezifischer Antigene ausgewählt wurde. In einer vorangegangenen Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass HNA-1 auf der Oberfläche muriner lymphozytärer A0.01 Zellen präsentiert werden kann¹⁰³. Der Nachweis wurde durchflusszytometrisch mit einem nicht Polymorphismus-spezifischen anti-CD16-PE Antikörper durchgeführt. Allerdings konnten vorbeschriebene anti-HNA-1 Antikörper aus Patientenplasmen bis dato nicht eindeutig mit Hilfe der generierten xenogenen Testzellen nachgewiesen werden. Eine Sequenzierung der verwendeten Plasmide ergab Nukleotid-Sequenzen, die zu Abweichungen in den Aminosäure-positionen 65, 82 und 106 im Vergleich zu den von den von Fleisch und Reil⁶⁹ beschriebenen Sequenzen von HNA-1a, HNA-1b und HNA-1c führten. Nach gezielter Mutagenese der entsprechenden Nukleotidpositionen und Sanger-Sequenzierung zur Verifizierung wurden MEL-745A Zellen mit den drei unterschiedlichen HNA-1 Varianten transduziert. Da bisher nur in zwei Fällen ein anti-HNA-1d Antikörper diagnostiziert wurde, dessen klinische Relevanz folglich vernachlässigbar ist, beschränkte sich das generierte Testpanel zum Nachweis von Antikörpern gegen HNA-1 auf die Antigene HNA-1a, -b und -c. Die Testzelllinien konnten über die Fluoreszenz entsprechender Markerproteine durchflusszytometrisch voneinander getrennt werden. Das resultierende HNA-1 Panel ist in Abbildung 18 dargestellt. Testzellen, die das HNA-1a auf der Oberfläche tragen, co-exprimieren das Fluorochrom Venus. Die HNA-1b exprimierenden Zellen sind mit den Fluorochromen Venus und mCherry markiert und Testzellen mit dem HNA-1c Polymorphismus sind durch mCherry-Expression gekennzeichnet. Parentale Zellen dienten als Referenz und wurden dem Panel im Überschuss (> 80 %) hinzugefügt. Nach Inkubation mit einem Plasma, welches keine HNA-1 Antikörper enthielt (Abbildung 18A), lag der APC-Median der parentalen Zellen bei 70, die APC-Fluoreszenz der Testzell-Populationen war noch geringer. Abbildung 18B zeigt exemplarisch die Sekundärfluoreszenz des APC-gekoppelten Anti-human-IgG Antikörpers nach vorangegangener Inkubation mit einem Plasma, welches anti-HNA-1a Antikörper enthielt. Die HNA-1a Zellpopulation (in grün) zeigte eine deutlich höhere APC-Fluoreszenz, als die parentalen Zellen und die Testzelllinien HNA-1b (gelb) und -1c (rot). Der APC-Median

der HNA-1a-exprimierenden Zellpopulation ist mit 17373 etwa 45-fach höher, als der APC-Median der parentalen Referenzpopulation. Im Vergleich dazu zeigten die HNA-1b und -1c Zellen mit 2,3- bis 3-fach erhöhten APC-Medianen eine allenfalls geringe Rechtsverschiebung zu den Referenzzellen.

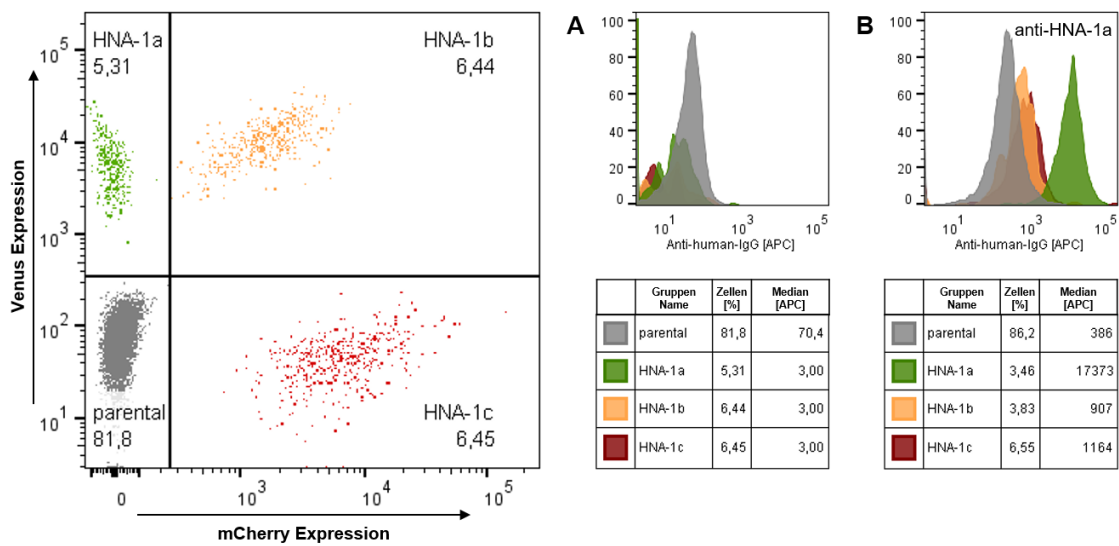


Abbildung 18: Testpanel zur Detektion und Spezifikation von Antikörpern gegen HNA-1. Die in dem Dotplot dargestellten nicht-humanen Testzellen exprimieren verschiedene Varianten des HPA-1 Polymorphismus auf ihrer Oberfläche. Die Venus-exprimierenden Zellen (grün) tragen das HPA-1a Merkmal, die doppelt positive Zellpopulation (gelb) exprimiert HNA-1b auf der Oberfläche und die HNA-1c Testzellen (rot) co-exprimieren das Fluorochrom mCherry. Parentale Zellen (grau) waren im Überschuss vorhanden und dienten als Referenz. Nach der Inkubation mit Patientenplasma wurde die Fluoreszenz eines Anti-human-IgG Sekundärantikörpers im APC-Histogramm betrachtet. Da in dem Plasma kein HNA-1 Antikörper vorhanden war, waren die vier Zellpopulationen deckungsgleich (A), wohingegen es nach Inkubation mit einem Plasma mit anti-HNA-1a Antikörpern zu einer isolierten Rechtsverschiebung der HNA-1a Zellpopulation (grün) kam (B).

3.3 Expression thrombozytärer Antigene auf Integrin-Heterodimeren

Antikörper gegen humane Thrombozytenantigene werden nicht routinemäßig untersucht, da sie erheblich seltener vorkommen als erythrozytäre Antikörper und weniger häufig klinische Relevanz besitzen. Lediglich bei Thrombozyten-transfusionsrefraktären Patienten und Schwangeren bzw. Wöchnerinnen mit Kindern, die unter schwerer Thrombozytopenie leiden, wird regelhaft nach irregulären anti-HPA Antikörpern gesucht. Im Bereich der HPA Antikörper Diagnostik wäre jedoch ein Testpanel zum Nachweis und zur Spezifikation von anti-HPA-1a und anti-HPA-5b Antikörpern von klinischem Interesse. Dieses könnte bei thrombozytopenischen Neugeborenen mit Verdacht auf fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie in der Notfalldiagnostik eingesetzt werden, da die verfügbaren Testsysteme langsam, wenig sensitiv und niedrigauflösend sind. Im Rahmen der Herstellung eines solchen HPA Mini-Testzell-Panels sollte untersucht werden, ob die murinen Testzellen in der Lage sind, humane Thrombozytenantigene in ausreichend hoher Dichte auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Da die humanen Plättchenantigene auf Integrinketten liegen und nur als Heterodimere mit einem entsprechenden Komplexpartner auf die Zelloberfläche gelangen, mussten die humanen Glykoproteine zudem in einem geeigneten Verhältnis co-exprimiert werden. Zusätzlich tragen die Komplexpartner teilweise ihrerseits Polymorphismen, die eine eindeutige Zuordnung eines Antikörpers zu einem spezifischen Plättchenantigen möglicherweise erschweren könnten. Zur Untersuchung dieser Problematik wurden Testzellen generiert, die den humanen Fibrinogen-Rezeptor (GP IIb/IIIa bzw. α IIb/ β 3) exprimieren, auf welchem die polymorphen Antigene HPA-1 auf dem β 3-Integrin und HPA-3 auf dem α IIb-Integrin lokalisiert sind. Da die humanen Integrine variabel in den xenogenen Zellen überexprimiert werden können, wurden außerdem Testzellen erzeugt, die den Vitronektin-Rezeptor, also das α V/ β 3-Heterodimer mit der polymorphen Ausprägung HPA-1a auf der β 3-Kette, auf ihrer Oberfläche präsentieren. Diese Testzellen, die den α V/ β 3-Integrinkomplex tragen, welcher natürlicherweise nicht auf Thrombozyten, sondern nur auf Endothelzellen zu finden ist, sollte als potentieller Indikator für intrazerebrale Blutungen untersucht werden. Weiterhin wurden für den Nachweis von anti-HPA-5b Antikörpern Testzellen hergestellt, die das Integrin-Heterodimer α 2/ β 1 (GP Ia/IIa) exprimieren. Zum Nachweis der humanen Glykoprotein-Komplexe auf der Oberfläche der murinen Zellen wurden spezifische, PE-markierte Antikörper verwendet, deren Intensität zugleich in erster Näherung Auskunft über die Antigendichte auf den

Testzellen gab. Die Quantifizierung der humanen Plättchenantigene auf den Testzellen im Vergleich zu primären humanen Thrombozyten ist in Abbildung 19 dargestellt. Die Oberflächenexpression wurde anhand von definierten, PE-markierten Beads in die Bereiche niedrig (*low*), mittel-niedrig (*MedLow*), mittel-hoch (*MedHigh*) und hoch (*High*) unterteilt. Während die parentale Zelllinie murinen Ursprungs bei allen verwendeten Antikörpern zum Nachweis der humanen Antigenkomplexe nur eine niedrige Hintergrundfluoreszenz aufwies, konnten die Integrin-Heterodimere $\alpha\text{IIb}/\beta\text{3}$ und $\alpha\text{V}/\beta\text{3}$ in hoher Dichte auf den generierten Testzellen nachgewiesen werden. Die Expression des Fibrinogen-Rezeptors war auf den nicht-humanen, HPA-3a- und HPA-1a-exprimierenden $\alpha\text{IIb}/\beta\text{3}$ -Testzellen mit 51.623 Molekülen pro Zelle etwa viermal so hoch wie auf den Thrombozyten. Erwartungsgemäß konnte auf den humanen Plättchen kein $\alpha\text{V}/\beta\text{3}$ Heterodimer nachgewiesen werden, wohingegen die $\alpha\text{V}/\beta\text{3}$ -Testzellen mit HPA-1a Polymorphismus den Komplex mit durchschnittlich über 90.000 Molekülen pro Zelle hoch exprimierten. Da kein PE Antikörper zum Nachweis des $\alpha\text{2}/\beta\text{1}$ Heterodimer-Komplexes verfügbar war, wurde die Expression der Integrine α2 und β1 separat betrachtet. Während die humanen Thrombozyten mit 4176 Molekülen pro Zelle eine dreimal höhere Expression des Integrins β1 im Vergleich zum α2 -Integrin aufwiesen, war die Dichte des HPA-5b Polymorphismus tragenden α2 -Integrins auf den nicht-humanen Testzellen mit 4106 Molekülen pro Zelle etwa zehnmals höher als die Expression des β1 -Integrins.

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass die nicht-humanen Zellen in der Lage sind, die humanen, polymorphen Glykoprotein-Komplexe auf der Oberfläche zu präsentieren, sollte die Spezifität und Funktionalität der generierten Testzellen überprüft werden. Hierzu wurden zusätzlich zu den Testzellen, die das Integrin $\alpha\text{IIb}/\beta\text{3}$ -Heterodimer mit den Polymorphismen HPA-1a und HPA-3a tragen, HPA-1b und HPA-3a exprimierende Zellen generiert. Außerdem stellte sich die Frage, ob die Integrin-Heterodimer-Komplexe genetisch modifiziert werden können. Viele Blutgruppenantigene tragen mehrere Polymorphismen gleichzeitig. Für Situationen, in denen sich mehr als ein Polymorphismus auf einem Antigen befindet, oder im Falle des Integrin $\alpha\text{IIb}/\beta\text{3}$ -Heterodimers, dessen α - und β -Partner beide polymorph sind, sollte exemplarisch gezeigt werden, dass antigenisch "neutrale" Mutanten erzeugt werden können, die mit ihrem designierten Partner heterodimerisiert werden können. In Anbetracht der Tatsache, dass diese Untersuchungen mit primären humanen Testzellen wie Erythrozyten oder Thrombozyten nicht möglich sind, sollte die vorgestellte Methode auf die Umsetzbarkeit solcher individuellen Modifikationen geprüft werden.

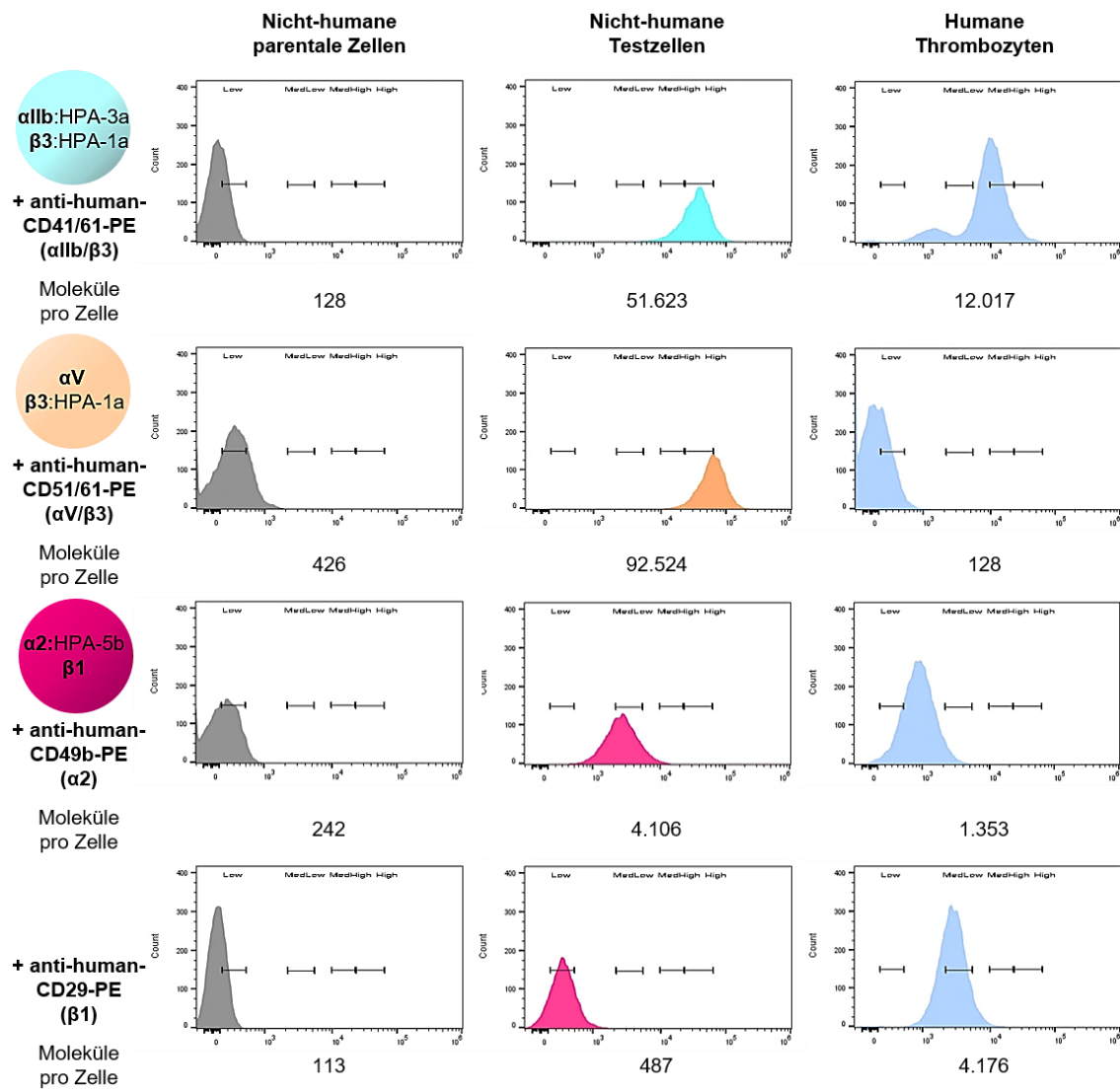


Abbildung 19: Oberflächenexpression humaner, thrombozytärer Glykoproteine. Dargestellt ist die durchflusszytometrisch gemessene PE-Fluoreszenz der nicht-humanen, parentalen Zellen und der generierten Testzellen im Vergleich zu humanen Thrombozyten nach Inkubation mit PE-gekoppelten Antikörpern gegen die humanen Glykoprotein-Komplexe $\alpha\text{IIb}/\beta\text{3}$ und $\alpha\text{V}/\beta\text{3}$ sowie gegen Integrin α2 und β1 . Es erfolgte eine Unterteilung der Fluoreszenzintensität in *Low* (niedrig), *MedLow* (mittel-niedrig), *MedHigh* (mittel-hoch) und *High* (hoch). Diese wurde anhand von BD Quantibrite™ PE-Beads festgelegt. Über den geometrischen PE-Mean der Zellpopulationen wurde die Anzahl der Moleküle pro Zelle ermittelt. Da die Antikörper gegen humane Glykoproteine gerichtet sind, kommt es nur zu einer geringen, unspezifischen Bindung an die parentalen, nicht-humanen Testzellen. Die Expression der Heterodimers $\alpha\text{IIb}/\beta\text{3}$ war auf den HPA-3a/1a Testzellen (blau) etwa viermal höher als auf humanen Thrombozyten. Der $\alpha\text{V}/\beta\text{3}$ -Komplex, der auf den HPA-1a/ αV Testzellen (orange) in hoher Dichte auf der Oberfläche vorhanden war, wurde auf humanen Thrombozyten erwartungsgemäß nicht exprimiert. Während das humane Integrin α2 auf den HPA-5b/ β1 Testzellen (pink) deutlich höher als auf Thrombozyten exprimiert wurde, war die Expression des β1 -Integrins nahezu eine log-Stufe geringer als auf den Thrombozyten.

Deshalb wurde der HPA-3 Polymorphismus auf dem Glykoprotein α IIb so mutiert, dass sich in Folge dessen an Position 843 statt Isoleucin (HPA-3a) oder Serin (HPA-3b) die Aminosäure Glycin (weder HPA-3a noch -3b, im Folgenden als „HPA-3~“ bezeichnet) befand. Auch mit der genetisch modifizierten HPA-3~ Mutation wurden Testzellen erzeugt, die das HPA-1a auf der β 3-Kette tragen. Die unterschiedlichen Varianten der Testzellen, die den Glykoprotein-Komplex α IIb/ β 3 mit den Polymorphismen HPA-1 und HPA-3 auf der Oberfläche tragen, sind in Abbildung 20 blau dargestellt. Die in orange dargestellten Testzellen exprimieren den endothelialen α V/ β 3-Komplex mit der HPA-1a Variante auf der β 3-Kette. Die Histogramme 1-4 zeigen die einzelnen Zellpopulationen nach Inkubation mit Plasma einer gegen HPA-1a-sensibilisierten Patientin. Histogramm 1 zeigt die Funktionalität der HPA-1a/3a exprimierenden Zellen, da diese nach Inkubation mit dem anti-HAP-1a Plasma eine sechsfach höhere APC-Sekundärfluoreszenz aufwiesen, als die parentalen Referenzzellen (grau). Dass diese Reaktion spezifisch ist, wird durch die Überlappung der APC-Fluoreszenzen von Test- und Referenzzellen in Histogramm 2 deutlich. Die HPA-1b/3a exprimierenden Testzellen reagierten somit nicht mit dem anti-HPA-1a Plasma. Bei den genetisch modifizierten, HPA-1a/3~ Testzellen wiederum ist in Histogramm 3 eine deutliche Rechtsverschiebung nach Inkubation mit dem APC-gekoppelten Detektionsantikörper zu erkennen, weshalb davon ausgegangen werden konnte, dass die genetische Modifikation der α IIb-Kette die Dimerisierung des Komplexes nicht beeinflusst hat und die Bindung des humanen anti-HPA-1a Antikörpers möglich war. Auch die Testzellen, die den Vitronektin-Rezeptor mit polymorpher Ausprägung des HPA-1a Merkmals besaßen, reagierten mit dem Patientenplasma, wodurch einerseits das breite Verwendungspotenzial des Testsystems auch für Antikörper außerhalb der Immunhämatologie deutlich, und andererseits das Vorhandensein eines kreuzreaktiven anti-HPA-1a Antikörpers mit dem α V/ β 3-Komplex bestätigt wurde. Die α IIb/ β 3-exprimierenden Zellvarianten wurden zusätzlich mit dem Plasma eines Patienten getestet, bei dem anti-HPA-3 Antikörper vordiagnostiziert wurden. Sowohl bei den HPA-1a/3a Testzellen in Histogramm 5 als auch bei den HPA-1b/3a Testzellen in Histogramm 6 ist der APC-Median im Gegensatz zu den HPA-1a/3~ Testzellen in Histogramm 7 nach der Inkubation leicht erhöht. Allerdings führt die starke, unspezifische Reaktion des Plasmas mit den Referenzzellen dazu, dass keine eindeutige Bewertung der Antikörperspezifität möglich war. In Ermangelung anderer Patientenplasmen mit vorbeschriebenen anti-HPA-3 Antikörpern konnte keine weiterführende Analyse der Testzellen mit neutralem HPA-3 Polymorphismus durchgeführt werden.

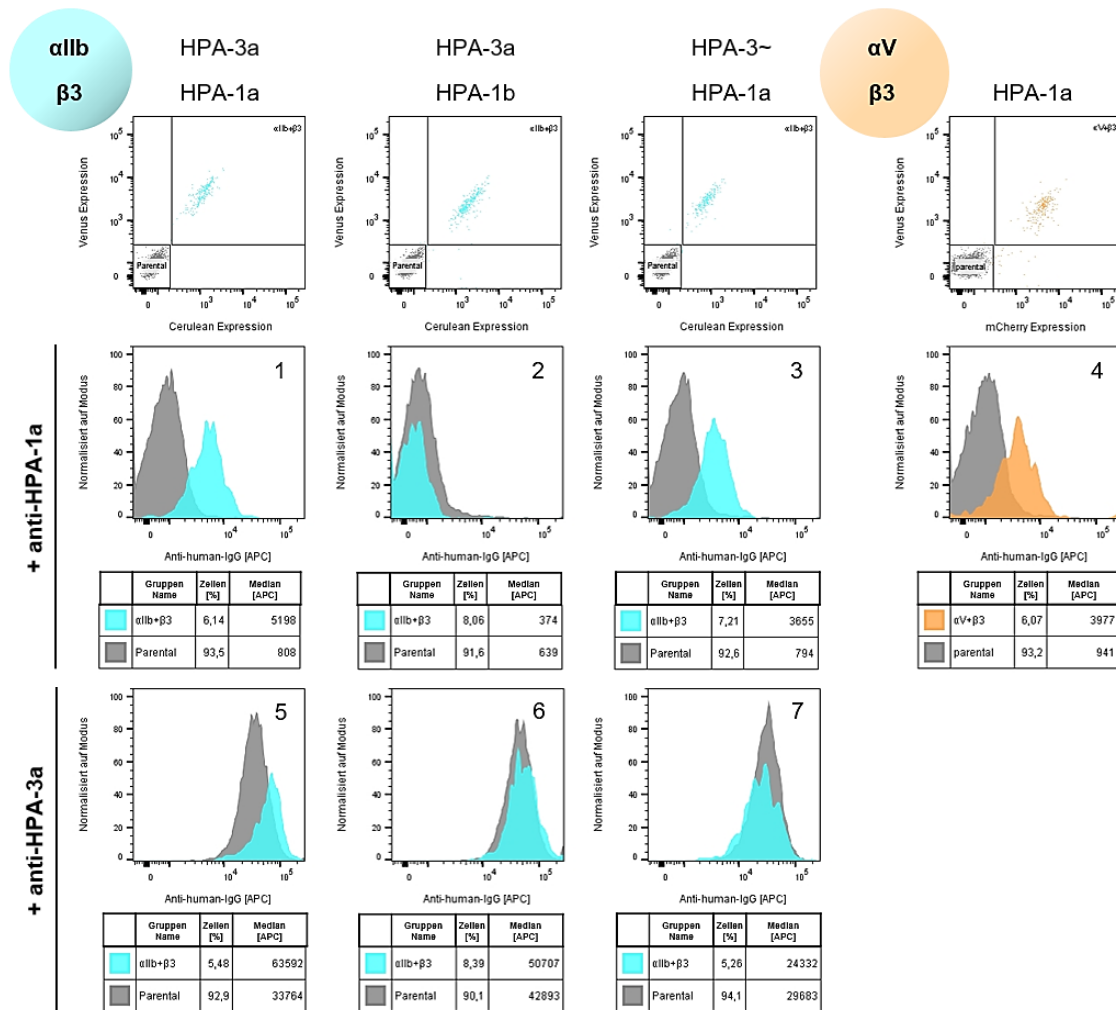


Abbildung 20: Expression von natürlichen und nicht-natürlichen HPA-Varianten auf xenogenen Testzellen zur Spezifikation von anti-HPA Antikörpern. Die blau dargestellte Testzelle trägt das Integrin αIIb/β3-Heterodimer mit den Polymorphismen HPA-1 und HPA-3 auf der Oberfläche. Von links nach rechts sind die natürlichen Varianten HPA-3a/HPA-1a und HPA-3a/HPA-1b, sowie eine HPA-1a Variante mit „immunologisch neutraler“, genetischer Modifikation des HPA-3 Polymorphismus (*non-a-non-b*) aufgeführt. Die orange Testzelle exprimiert ein endotheliales Integrin, den αV/β3-Komplex mit der HPA-1a Variante auf der β3-Kette. Die Histogramme zeigen die einzelnen Zellpopulationen nach Inkubation mit einem anti-HPA-1a (mittlere Reihe) bzw. anti-HPA-3a (untere Reihe) Patientenplasma sowie einem Anti-human-IgG-APC Detektionsantikörper. Die parentalen Zellen (grau) dienen als Richtwert für die APC-Fluoreszenzverschiebung. Das anti-HPA-1a Patientenplasma verursachte eine Rechtsverschiebung der HPA1a/HPA-3a-, HPA1a/HPA-3~- und HPA-1a/αV-Zellen (Histogramme 1+3+4), nicht aber der HPA1b/HPA-3a-Zellen (Histogramm 2), was neben der Funktionalität auch die Spezifität des Testsystems bewies. Dass es sowohl bei der natürlichen HPA-3a-Variante (Histogramm 1), als auch bei der genetisch veränderten HPA-3~-Variante (Histogramm 3) zu einer APC-Fluoreszenzverschiebung kam, zeigte, dass die Polymorphismen modifiziert werden können, ohne Antigenexpression einzubüßen. Dies ist potenziell nützlich, um distinkte Antigene, die auf demselben (Glyko-) Protein lokalisiert sind, voneinander zu trennen. Dass auch bei der modellierten HPA-1a/αV Testzelle (Histogramm 4) eine Rechtsverschiebung der Sekundärfluoreszenz nach Inkubation mit einem anti-HPA-1a Patientenplasma festzustellen war, zeigte, dass das Testsystems auch für die Detektion nicht-hämatopoetischer Antigene geeignet ist. Das Patientenplasma mit vorbeschriebenen anti-HPA-3a Antikörpern führte zu einer diskreten Rechtsverschiebung der HPA-3a-positiven Testzellen (Histogramm 5+6), wohingegen die Zellpopulationen mit den HPA-1a/3~ Testzellen (Histogramm 7) deckungsgleich blieben.

Für die Umsetzung der neuen Methode zur Detektion und Spezifikation von Antikörpern ist die Sensitivität des Testsystems besonders relevant. Auch in Anbetracht der Tatsache, dass der Blutverlust des Patienten bei vielzähligen Untersuchungen möglichst geringgehalten werden soll, sind die benötigten Volumina für die Durchführung der Tests von großem Interesse. Zur Untersuchung der benötigten Probenmenge wurden parentale Referenzzellen und Testzellen in einem Ansatz vereint und auf ein Volumen von 100 µl eingestellt. Für die durchgeführten Analysen wurde dieser Ansatz üblicherweise mit 100 µl Patientenplasma inkubiert, woraus eine 1:2 Verdünnung des Probenmaterials resultierte. Um die Empfindlichkeit des Testsystems genauer zu definieren, wurde die zu untersuchende Probe mit PBS so verdünnt, dass das Plasma final 1:10 bzw. 1:100 oder 1:1000 in dem Reaktionsansatz vorlag. Die Resultate der durchflusszytometrischen Antikörperanalyse nach Verdünnung der Plasmaproben sind in Abbildung 21 zu sehen. Die APC-Fluoreszenz der HPA-3a/1a exprimierenden Testzelle ist nach der Inkubation mit 100 µl eines anti-HPA-1a Antikörper enthaltenden Patientenplasmas etwa drei log-Stufen höher als die der parentalen Referenzzellen. Nach Inkubation mit 1:10 verdünntem Plasma blieb diese Reaktionsstärke erhalten. Erst bei einer 1:100 Verdünnung der Probe halbierte sich Rechtsverschiebung der Testzellpopulationen zueinander, war aber weiterhin eindeutig erkennbar. Selbst bei einer 1000-fachen Verdünnung des Patientenplasmas war der APC-Median der Testzellen noch nahezu doppelt so hoch wie der mediane Messwert der Referenzzellen, was eine hohe Sensitivität der HPA-3a/1a Testzelle für die Detektion von anti-HPA-1a Antikörpern bewies. Auch die $\alpha V/\beta 3$ -exprimierenden Testzellen mit polymorpher Ausprägung des HPA-1a Merkmals wurden mit dem anti-HPA-1a Plasma in verschiedenen Verdünnungen behandelt. Die Inkubation des Reaktionsansatzes mit 100 µl des Patientenplasmas führte zu einer mehr als zehnfachen Verschiebung des APC-Medians der Testzellen im Vergleich zu den parentalen Zellen. Allerdings war bereits nach einer 1:10 Verdünnung der Probe keine APC-Fluoreszenzverschiebung mehr detektierbar, was eine vergleichsweise geringere Bindungsaffinität des HPA-1a Antikörpers an den $\alpha V/\beta 3$ -Komplex vermuten ließ. Bei den HPA-5b Testzellen, die den $\alpha 2/\beta 1$ Integrin-Komplex auf ihrer Oberfläche tragen, zeigte sich ein deutlicher Vorteil der Vorverdünnung des Probenmaterials. Während die Inkubation mit der unverdünnten Plasmaprobe lediglich eine Verdopplung des APC-Medians hervorbrachte, erhöht sich die Verschiebung der Zellpopulationen mit zunehmender Verdünnung des Plasmas.

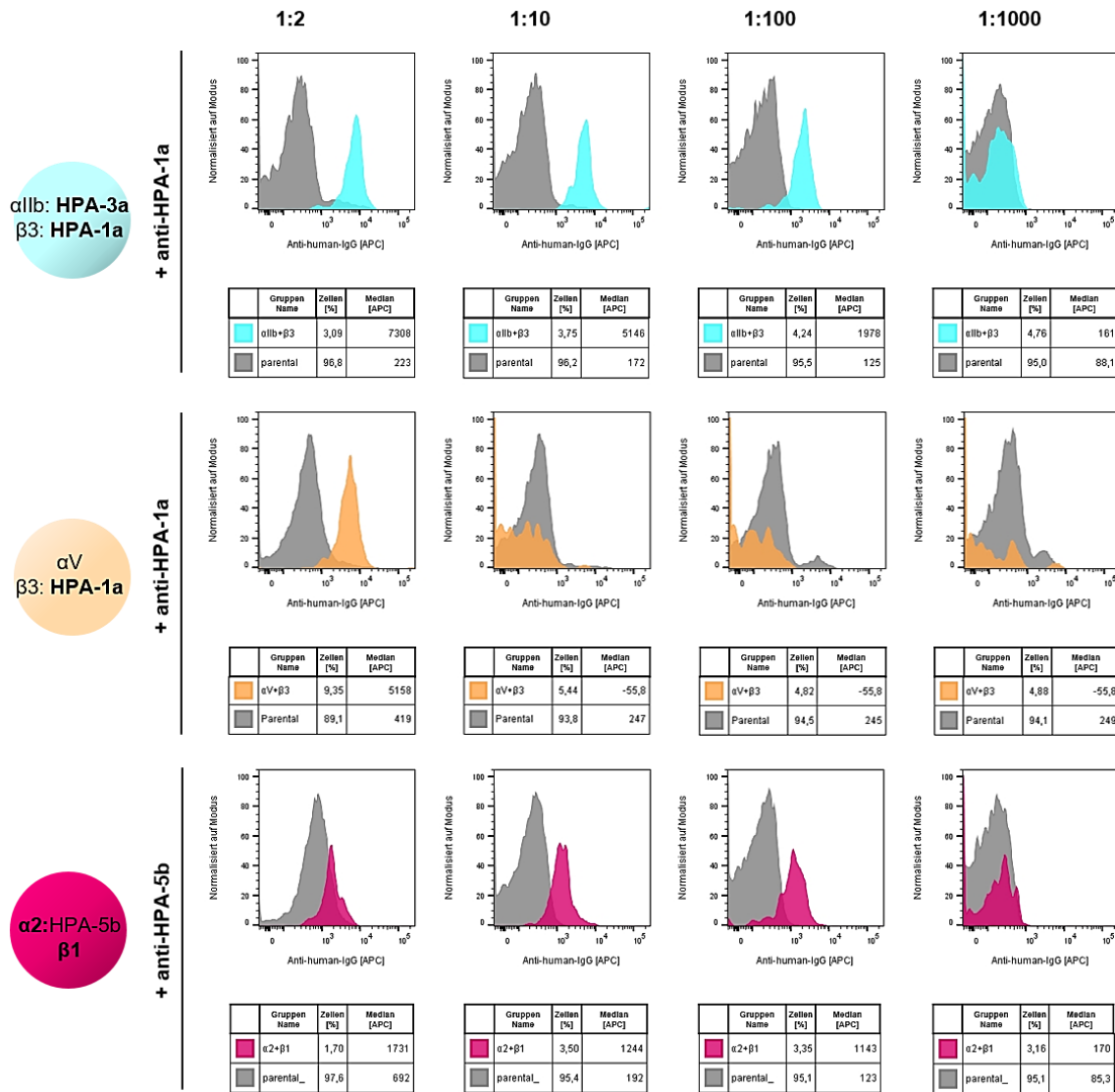


Abbildung 21: Sensitivität der xenogenen Testzellen zur Prüfung der Empfindlichkeit des Testsystems. Die generierten Testzellen, die das HPA-1a Antigen (in blau mit dem αIIb/β3-Integrinkomplex oder in orange mit dem endothelialen αV/β3-Komplex) tragen, wurden mit einem Patientenplasma mit anti-HPA-1a Antikörpern in verschiedenen Verdünnungen inkubiert. Während die αIIb/β3-Testzellen den anti-HPA-1a Antikörper auch noch bei 100-facher Verdünnung detektieren, war der Anteil des mit den αV/β3-Testzellen kreuzreagierenden Klons gering. Bei einem Titer von 10 war diese Antikörperspezifität bereits nicht mehr nachweisbar. Bei den in pink dargestellten α2/β1-Testzellen, die den HPA-5b Polymorphismus tragen, verringerte sich nach Inkubation mit einem anti-HPA-5b Patientenplasma die mutmaßlich unspezifische Rechtsverschiebung der parentalen Zellen (in grau) mit zunehmender Verdünnung, wodurch die relative Rechtsverschiebung der Testzell-Population verstärkt wurde. Bei der 1:2 Verdünnung kam es zu einer 2,5-fachen Verschiebung der Testzellen bezogen auf die parentalen Zellen. Mit einer 10-fachen Verdünnung war bereits eine 6,5-fache APC-Fluoreszenzverschiebung erkennbar, die bei der 1:100 Verdünnung auf 9,3 stieg. Bei 1000-facher Verdünnung des Patientenplasmas fiel der Antikörper unter die Nachweisgrenze.

Diese führte dazu, dass sich die unspezifische Rechtsverschiebung der parentalen Referenzzellen verringerte und sich in Folge dessen die Testzell-Populationen deutlicher voneinander trennten. Ähnlich wie bei den HPA-1a/3a Testzellen war auch der APC-Median der HPA-5b Testzellen nach Inkubation mit dem 1:1000 verdünnten Plasma noch doppelt so hoch wie die mediane APC-Verschiebung der parentalen Testzellen, was die hohe Sensitivität der HPA-5b Testzellen gegenüber Antikörpern der entsprechenden Spezifität erkennen ließ.

Nachdem die Funktionalität und Spezifität der xenogenen Zellen sowie Sensitivität des Testsystems genauer betrachtet wurden, sollten die HPA-exprimierenden Testzellen zu einem HPA Mini-Testzell-Panel vereint werden, welches zur Vereinfachung der klinischen Diagnose der FNAIT und dessen zugrundeliegender Antikörperspezifität beitragen könnte. Das in Abbildung 22 dargestellte Detektionspanel für HPA Antikörper beinhaltete die HPA-1a- (α IIb/ β 3 in blau; α V/ β 3 in orange) und HPA-5b- (α 2/ β 1 in pink) exprimierenden Testzellen, sowie einen Überschuss an parentalen Zellen (grau) als Referenz. Die einzelnen Zellpopulationen konnten anhand ihrer Venus- bzw. mCherry-Expression durchflusszytometrisch voneinander abgegrenzt werden. Der Nachweis der Antikörperbindung an die Testzellen erfolgte über einen APC-gekoppelten Anti-human-IgG Detektionsantikörper und ist durch die relative Rechtsverschiebung der Zellpopulation im APC-Kanal identifizierbar. Ohne die Bindung eines Antikörpers war die sekundäre APC-Fluoreszenz aller Zellpopulationen identisch, was daran zu erkennen ist, dass die vier Zellpopulationen im Histogramm übereinanderliegen. Nach Inkubation mit der Probe einer Patientin (PS-057), in deren Plasma anti-HPA-1a Antikörper vorbeschrieben waren, welche zu einer FNAIT ihres Kindes geführt hatten, kam es zur Rechtsverschiebung der α IIb/ β 3- (blau) und der α V/ β 3-Testzell-Populationen (orange). Das Plasma der Patientin enthielt also anti-thrombozytäre HPA-1a Antikörper, welche mit dem Vitronektin-Rezeptor kreuzreagierten. Diese Antikörper sind vorbeschrieben und werden mit dem Auftreten intrakranieller Blutungen bei FNAIT in Verbindung gebracht⁹⁰⁻⁹². Die α 2/ β 1 Testzellen hingegen zeigten keine Reaktion mit diesem Plasma und lagen im APC-Kanal über der Population der parentalen Referenzzellen. Die Inkubation eines Patientenplasmas mit vorbeschriebenen HPA-5b Antikörpern (PS-03) mit dem HPA Mini-Testzell-Panel ergab eine ausschließliche Verschiebung der APC-Fluoreszenz der α 2/ β 1-exprimierenden HPA-5b Testzellen, wohingegen die APC-Mediane der HPA-1a Testzell-Varianten niedriger waren, als bei den parentalen Zellen.

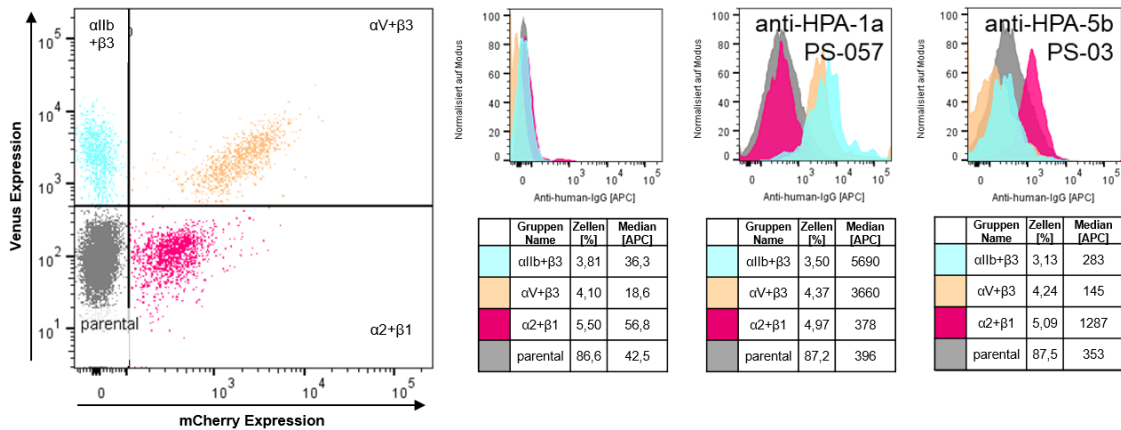
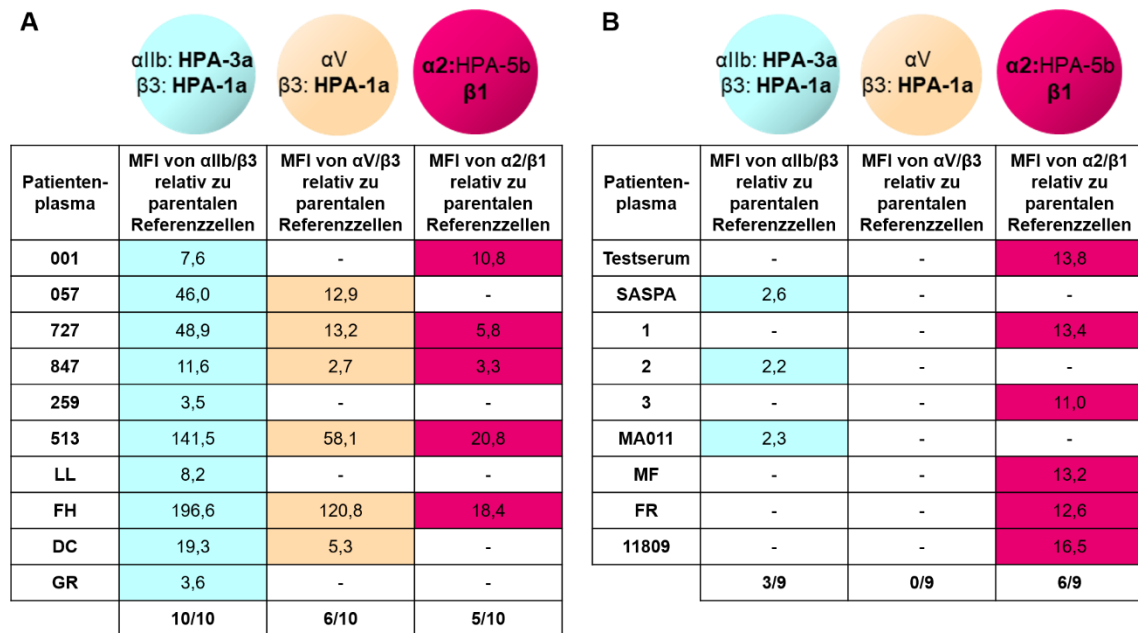


Abbildung 22: Generierung eines HPA Mini-Testzell-Panels zur Detektion der klinisch relevanten anti-HPA-1a und anti-HPA-5b Antikörper. Beim Vorliegen einer FNAIT sind die ursächlichen Antikörper in etwa 75 % der Fälle gegen das HPA-1a Antigen gerichtet. Neueste Erkenntnisse deuten darauf hin, dass anti-HPA-1a Antikörper, die mit dem endothelialen $\alpha V/\beta 3$ Komplex kreuzreagieren, kausal an der FNAIT mit zerebralen Blutungen beteiligt sind. Das abgebildete Testpanel enthält Zellen, die zum einen den $\alpha IIb/\beta 3$ Integrin-Komplex (blau) und zum anderen das $\alpha V/\beta 3$ Heterodimer (orange) mit dem HPA-1a Polymorphismus auf der Oberfläche tragen. Fast alle verbleibenden Fälle einer FNAIT werden durch einen anti-HPA-5b Antikörper verursacht, weshalb in dem Panel auch eine $\alpha 2/\beta 1$ -Testzelle (pink) vorhanden ist. Ein Überschuss an parental Zellen (grau) diente als Referenz für die Antikörperbindung und als Quencher für unspezifisch bindende Antikörper. Die vier Zellpopulationen konnten im Durchflusszytometer über die Expression der Fluorochrome Venus und mCherry voneinander unterschieden werden. Die Bindung humaner IgG Antikörper an die Testzellen wurde über einen APC-gekoppelten Detektionsantikörper nachgewiesen. War kein Antikörper vorhanden, waren die einzelnen Populationen im APC-Kanal deckungsgleich. Nach Inkubation mit dem Patientenplasma PS-057 kam es zu einer relativen Rechtsverschiebung beider HPA-1a-exprimierenden Zellarten (blau und orange), was auf eine schwer verlaufende FNAIT, verursacht durch einen kreuzreaktiven anti-HPA1a Antikörper hinwies. Die Inkubation mit der Patientenprobe PS-03 führte zu einer Zunahme der APC-Fluoreszenz der pinken Testzellen, verursacht durch die Bindung von anti-HPA-5b Antikörpern.

Mit diesem HPA Mini-Testzell-Panel wurden alle verfügbaren Patientenplasmen mit durch konventionelle Methoden vordiagnostizierten anti-HPA Antikörpern analysiert. Wie Tabelle 23 entnommen werden kann, konnten in insgesamt 16 der 19 untersuchten Proben die vorbeschriebene Antikörperspezifität bestätigt werden. Aus der PROFNAIT Studie, bei welcher Plasma von Frauen gesammelt wurde, die in einer vorangegangenen Schwangerschaft gegen HPA-1a immunisiert worden waren, standen zehn Proben zur Verfügung. Die durchflusszytometrische Analyse konnte das Vorhandensein der anti-HPA-1a Antikörper in allen zehn Plasmen bestätigen. Die Analyse ergab zudem, dass sechs der zehn untersuchten anti-HPA-1a Plasmen auch mit dem $\alpha V/\beta 3$ -Komplex reagierten.

Tabelle 23: Untersuchung von vordiagnostizierten Patientenproben mit anti-HPA Antikörpern im HPA Mini-Testzell-Panel. Seren mit vorbeschriebenen anti-HPA-1a oder anti-HPA-5b Antikörpern wurden mit den xenogenen Testzellen durchflusszytometrisch analysiert. Dazu wurde das Patientenplasma 1:100 verdünnt mit der Zellsuspension inkubiert, anschließend gewaschen und mit einem biotinylierten Anti-human-IgG Detektionsantikörper und APC-gekoppeltem Streptavidin behandelt. Das Vorliegen eines Antikörpers wurde bei mindestens verdoppeltem APC-Median der Testzell-Population im Vergleich zu den parentalen Referenz-Zellen angenommen und ist farblich markiert. Anti-HPA-1a Antikörper, die gegen den α IIb/ β 3 Komplex gerichtet sind, sind blau markiert. Die Bindung des anti-HPA-1a Antikörpers an die α V/ β 3-Testzellen ist gelb hinterlegt. Das Vorhandensein von anti-HPA-5b Antikörpern ist in pink gekennzeichnet. Aufgeführt ist die relative Verschiebung des APC-Medians der jeweiligen Testzellen gegenüber der parentalen Zellpopulation. Alle 10 Proben mit vorbeschriebenem anti-HPA-1a Antikörper (**A**) konnten in dem durchflusszytometrischen Setting bestätigt werden. Außerdem ist bei 6 von 10 Proben eine Kreuzreaktivität des Antikörpers mit dem α V/ β 3 Heterodimer erkennbar. Das Assay gibt außerdem Hinweise auf das zusätzliche Vorhandensein eines anti-HPA-5b Antikörpers bei 5 Proben. Die Spezifität des Antikörpers konnte bei 6 von 9 Seren mit vorbeschriebenem anti-HPA-5b (**B**) bestätigt werden. In den 3 Proben, bei denen keine Antikörperbindung an die α 2/ β 1-Testzellen festgestellt werden konnte, zeichnet sich das Vorhandensein eines sehr schwachen Antikörpers ab, der gegen ein Merkmal auf dem α IIb/ β 3-Integrinkomplex gerichtet sein könnte.



Diese Häufung kreuzreagierender anti-HPA-1a Antikörper ist nicht überraschend, da nach einer Geburt keine routinemäßige Blutuntersuchung vorgenommen wird und deshalb anti-HPA Antikörper häufig nur bei symptomatischen Neugeborenen diagnostiziert werden, die durch ausgeprägte thrombopenische Blutungszeichen der Haut oder sonografische Diagnose einer Hirnblutung aufgefallen sind. In einigen der vordiagnostizierten Proben mit HPA-1a Antikörpern ergab sich außerdem der Hinweis auf einen zusätzlichen anti-HPA-5b Antikörper. Weiterhin standen neun Patientenplasma mit vorbeschriebenen anti-HPA-5b Antikörpern zur Verfügung. Bei sechs der neun Proben zeigte auch das durchflusszytometrische Assay gegen HPA-5b gerichtete

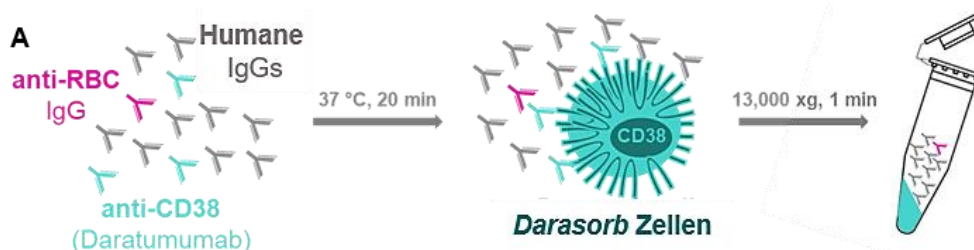
Antikörper. Lediglich bei drei Plasmen war kein anti-HPA-5b nachweisbar, jedoch ließ sich bei diesen Proben eine schwache Reaktivität mit den α IIb/ β 3-Testzellen feststellen. Diese Reaktion deutet auf eine potentielle Fehltypisierung des Plasmas hin und könnte einen Hinweis auf einen gegen α IIb/ β 3 gerichteten Antikörper geben. In Ermangelung größerer Mengen Patientenmaterials war eine abschließende Aufklärung des Befundes bisher nicht möglich.

3.4 Prä-analytische Depletion von therapeutischen Antikörpern aus Patientenplasma für immunhämatologische Untersuchungen

Eine alternative Verwendung der Testzellen stellt die spezifische Depletion von Antikörpern aus Patientenplasma dar. Diese Anwendung kann hilfreich sein, wenn Antikörper gegen häufige oder hochfrequente Antigene vorliegen. Von besonderer Bedeutung ist sie aber bei therapeutischen Antikörpern wie Daratumumab (anti-CD38) oder Magrolimab (anti-CD47), die zu starken Interferenzen in der immunhämatologischen Diagnostik führen. Basierend auf dem beschriebenen Prinzip der Generierung xenogener Testzellen sollte eine Zelllinie zur prä-analytischen Depletion monoklonaler anti-CD38 Antikörper generiert werden. Dabei musste nachgewiesen werden, dass die Reaktivität verschiedener Antikörperspezifitäten nach Abreicherung von anti-CD38 Antikörpern im Plasma erhalten bleibt. Die besondere Herausforderung dieser anti-CD38-Absorptionszelle gegenüber einer Absorptionszelle für einen erworbenen Immunantikörper ist der extrem hohe anti-CD38 Plasmaspitzen Spiegel, der nach serieller Infusion regelhaft erreicht wird und der eine extrem hohe Expressionsdichte von CD38 pro Zelle erforderlich machte. Da eine Stabilisierung der Testzellen für die praktische Anwendbarkeit wünschenswert wäre, sollte die Funktionalität der Depletionszelllinie des Weiteren an fixierten Zellen im zeitlichen Verlauf untersucht werden. Um zu überprüfen, ob das Verfahren auch auf andere therapeutische Antikörper übertragen werden kann, sollte nach demselben Prinzip auch eine Zelllinie für die Depletion des therapeutischen Antikörpers Magrolimab (anti-CD47) erzeugt werden.

3.4.1 Depletion monoklonaler anti-CD38 Antikörper durch *Darasorb* Zellen

Zur Unterstützung der konventionellen immunhämatologischen Diagnostik bei Patienten, die mit einem monoklonalen anti-CD38 Antikörper behandelt wurden, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein innovatives Reagenz zur prä-analytischen Absorption von freiem anti-CD38 entwickelt und validiert. Die Ergebnisse dessen wurden bereits 2021 unter dem Titel "Preanalytic depletion of medicinal anti-CD38 antibody from patient plasma for immunohematology testing." in der Fachzeitschrift *Blood* vol. 138,9:814-817 veröffentlicht.¹⁰⁴ Die hergestellten Depletionszellen, welche im nachfolgenden Text als „*Darasorb*“ bezeichnet werden, wurden für die Antikörper-Absorption mit analytischem Patientenplasma inkubiert und anschließend mittels Zentrifugation wieder entfernt, so dass das anti-CD38-depletierte Plasma im Anschluss daran mit konventionellen immunhämatologischen Verfahren untersucht werden konnte. Ein schematischer Überblick über das Verfahren zur selektiven Abreicherung von anti-CD38 Antikörpern ist in Abbildung 23A dargestellt. Die Herstellung der *Darasorb* Zellen erfolgte über stabile Transduktion von MEL-745A Zellen mit einer humanen CD38 (huCD38) Expressionskassette, die zusätzlich das Fluorochrom Venus enthielt. Durch anschließende Subklonierung wurden auf Grundlage der fluoreszenzmarkierten Daratumumab-Bindung hochexprimierende Einzelzellklone selektiert (Abbildung 23B). Die Expression unter einem starken SFFV-Promotor ermöglichte eine sehr hohe Oberflächenexpression des CD38 Proteins, die, wie Abbildung 23C zu entnehmen ist, etwa 5.000-mal höher war als auf humanen Erythrozyten. Abbildung 23D zeigt exemplarisch die Reaktivität des Plasmas eines mit Daratumumab behandelten Patienten in einer Gelkarte, wie sie typischerweise im immunhämatologischen Labor für die Antikörpersuche verwendet wird. Das Agglutinationsmuster blieb nach Inkubation mit den parentalen MEL-745A Zellen unverändert, wohingegen die Reaktion nach der Behandlung mit *Darasorb* Zellen negativ ausfiel.



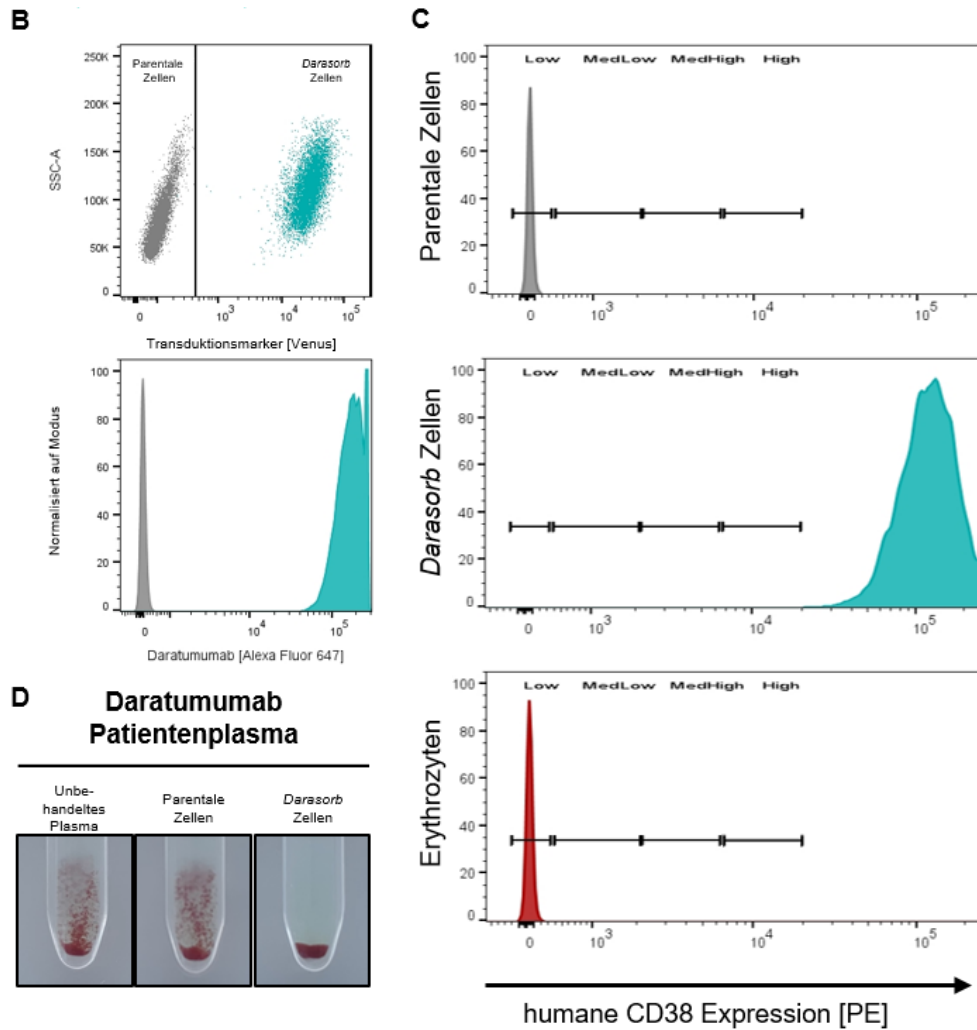


Abbildung 23: Schematischer Überblick und Charakterisierung der *Darasorb* Zellen. **A:** Das Schema zeigt ein wegen eines therapeutischen CD38 Antikörpers (z.B. Daratumumab) panagglutinierendes Patientenplasma. Die Detektion irregulärer erythrozytärer Antikörper (anti-RBC) in dem Plasma wird durch die Panagglutination verhindert. Nicht-humane Zellen, die humanes CD38 in hoher Dichte auf ihrer Oberfläche exprimieren (hier „*Darasorb*“ Zellen genannt), entfernen selektiv den freien therapeutischen Antikörper aus dem Patientenplasma. Anschließend werden die *Darasorb* Zellen mittels Zentrifugation entfernt, wobei andere Antikörper davon unbeeinflusst bleiben. **B:** Nicht-humane Zellen wurden mit einer Expressionskassette, die das humane CD38 Antigen und das Fluorochrom Venus co-exprimiert, stabil transduziert. Die CD38-exprimierenden *Darasorb*-Zellen binden Daratumumab (hier markiert mit Alexa Fluor 647). **C:** Die Bestimmung der Antigendichte erfolgte mit BD Quantibrite™ Beads, die eine definierte Anzahl von PE-Molekülen auf der Oberfläche tragen und als Referenz dienen. Die PE-Moleküle pro Zelle werden in *Low* (niedrig), *MedLow* (mittel-niedrig), *MedHigh* (mittel-hoch) und *High* (hoch) unterteilt. Die gewünschten Zellen wurden mit einem anti-human-CD38-PE Antikörper auf die huCD38 Oberflächenexpression analysiert. Dargestellt sind die parentalen murinen Zellen, *Darasorb* Zellen und humane Erythrozyten, wobei eine *Darasorb* Zelle ca. 490.000 CD38-Moleküle auf der Oberfläche trägt. Im Vergleich dazu befinden sich auf menschlichen Erythrozyten nur etwa 100 CD38-Moleküle pro Zelle. **D:** Die Reaktivität einer Plasmaprobe eines mit Daratumumab behandelten Patienten im Gel-Agglutinationstest. Das unbehandelte Plasma (links) zeigt die erwartete Agglutination im IAT. Die Reaktion bleibt nach der Inkubation mit parentalen Zellen (Mitte) unverändert. Nach der Behandlung des Plasmas mit *Darasorb* Zellen (rechts) kann keine Reaktivität mehr festgestellt werden, was die vollständige prä-analytische Abreicherung von Daratumumab bestätigt. Adaptiert von Ehrend *et al.*, Blood (2021)¹⁰⁴.

Insgesamt wurden 60 Plasmaproben von 27 kürzlich mit Daratumumab bzw. Isatuximab behandelten Patienten untersucht. Dabei konnten, wie in Abbildung 24A aufgeführt, maximale Plasmaiter von 1024 – 4096 festgestellt werden, wobei jedoch die Hälfte der Proben Titer von 512 oder weniger aufwiesen. 75 % der Plasmaproben waren nach einem Inkubationszyklus mit den *Darasorb* Zellen reproduzierbar von anti-CD38 befreit. Bei 22 % der untersuchten Proben war ein zweiter Depletionszyklus notwendig. Alle Proben bis zu einem anti-CD38 Titer von 512 wurden mit einer Inkubation zuverlässig depletiert. Ein zweiter Abreicherungszyklus war bei einem Teil der Proben mit Titern von mindestens 1024 erforderlich. Lediglich bei zwei Plasmen mit Titern von 2048 und 4096 waren drei bzw. vier Depletionszyklen mit *Darasorb* Zellen erforderlich, um den medizinischen Antikörper vollständig aus der analytischen Probe zu entfernen. Diese pan-reaktiven Proben wurden wiederholt auf das Vorhandensein weiterer irregulärer Antikörper untersucht. Das konventionelle Antikörperscreening mit nativen und DTT-behandelten Test-Erythrozyten ist in Abbildung 25 zu sehen. Zwar konnte dadurch ein Antikörper gegen ein hochfrequentes, DTT-sensitives Antigen nicht definitiv ausgeschlossen werden, wahrscheinlicher ist aber, dass die starke Agglutination auf die hohen anti-CD38 Titer zurückzuführen war. Da bei keinem der mit Daratumumab behandelten Patienten in unserem immunhämatologischen Labor irreguläre Antikörper diagnostiziert wurden, wurde Plasma von Spendern, die irreguläre Antikörper verschiedener Spezifität und Stärke besaßen, mit 100 µg/ml Daratumumab versetzt. Abbildung 24B zeigt eines dieser Plasmen, welches ursprünglich einen niedrigtitrigen anti-Jk^a Antikörper enthielt und dementsprechend nach der Inkubation mit Jk^a-positiven Test-Erythrozyten eine Agglutination hervorrief, aber nicht mit Jk^a-negativen Test-RBCs reagierte. Nach der Zugabe von Daratumumab zu diesem Plasma fielen, wie zu erwarten, die Reaktionen mit beiden Test-Erythrozyten positiv aus. Nach der Behandlung des mit Daratumumab versetzten Plasmas mit *Darasorb* Zellen blieb der irreguläre anti-Jk^a Antikörper erhalten, wohingegen keine Reaktion mit den Antigen-negativen Erythrozyten mehr festzustellen war, wodurch sich eine selektive Abreicherung des anti-CD38 Antikörpers erkennen ließ. Weiterhin konnte keine Abnahme der Reaktionsstärke nach der Behandlung des Plasmas mit den *Darasorb* Zellen festgestellt werden, was bestätigte, dass die irregulären Antikörper auch quantitativ erhalten geblieben waren. Das anti-Jk^a Antikörper-enthaltende Patientenplasma wurde exemplarisch ausgewählt, da anti-Jk^a Antikörper einerseits schwere verzögerte hämolytische Transfusionsreaktionen hervorrufen können und weiterhin als

besonders gefährlich gelten, da sie aufgrund ihrer häufig niedrigen Titer rasch unter die Detektionsgrenze konventioneller immunhämatologischer Assays fallen^{105–107}.

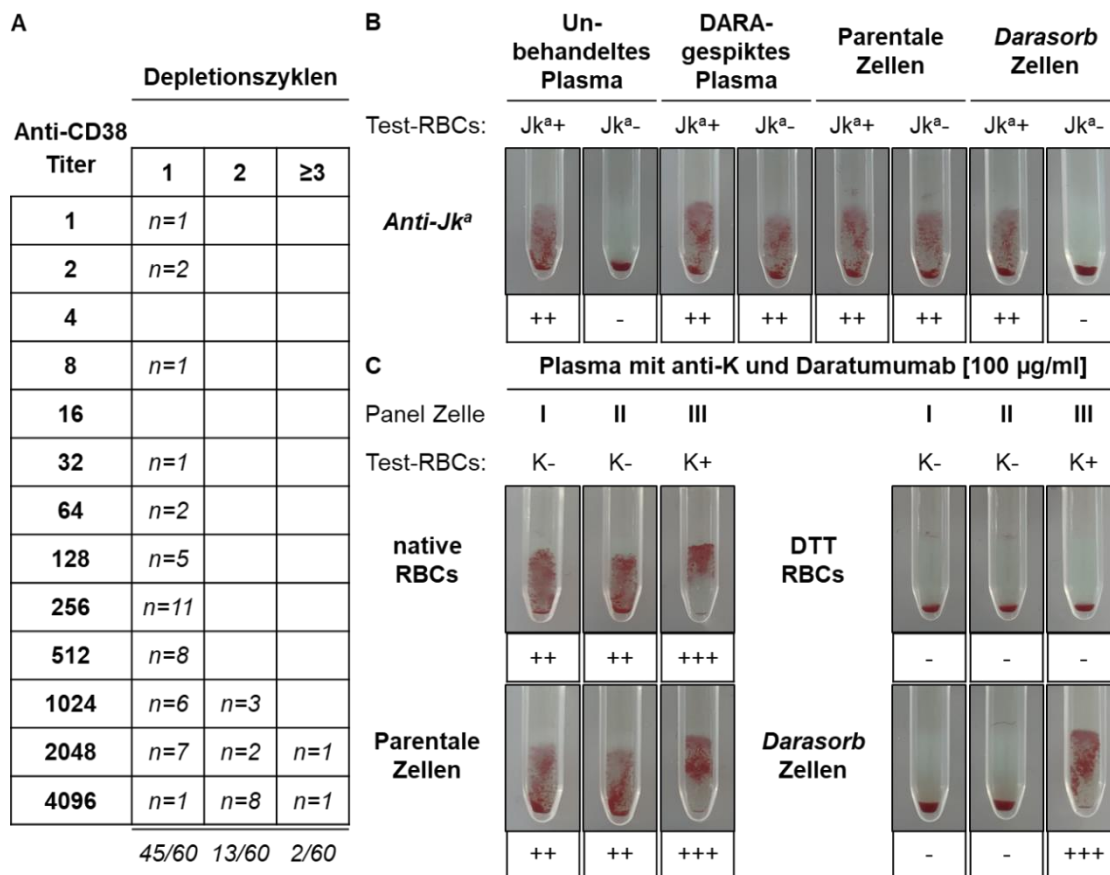
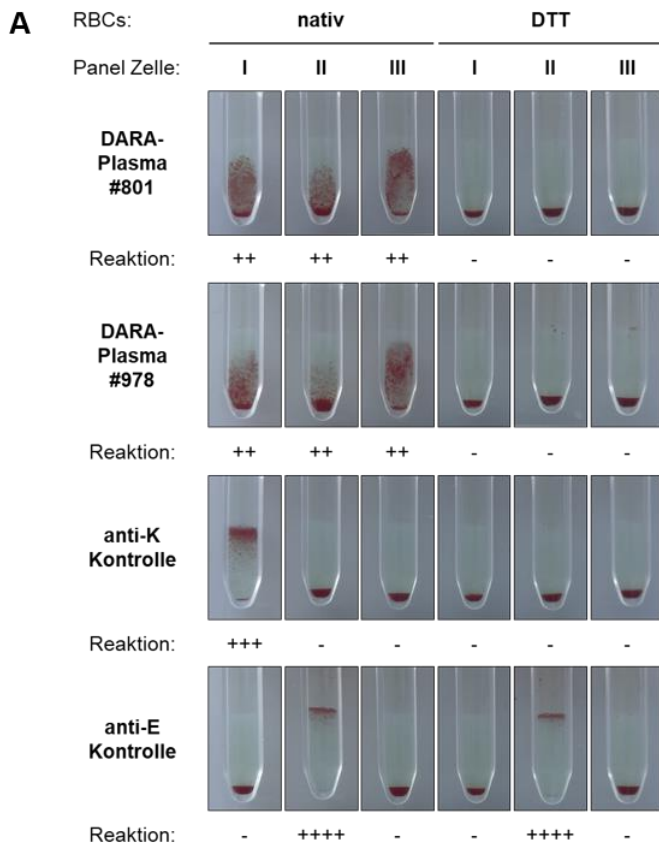


Abbildung 24: Depletion von anti-CD38 Antikörpern aus Patientenplasma mit Darasorb Zellen. **A:** 60 Routine-Plasmaproben von 27 Patienten, die mit anti-CD38 Antikörpern behandelt wurden (davon 26 mit Daratumumab und einer mit Isatuximab), wurden mit Darasorb-Zellen behandelt und anschließend im Gelkarten-Agglutinationstest analysiert. 58 von 60 getesteten Proben waren nach einem (n=45) oder zwei (n=13) Depletionszyklen mit Darasorb Zellen frei von anti-CD38 Antikörpern. Zwei der untersuchten Proben waren erst nach 3 bzw. 4 sequenziellen Absorptionen frei von Panagglutinin. **B:** Bei der Depletion mit Darasorb Zellen bleiben irreguläre Antikörper quantitativ erhalten. Unbehandeltes Patientenplasma, welches niedrigtitrige anti-Jk^a Antikörper enthielt, wurde mit Daratumumab versetzt, was zu einer Agglutination sowohl mit Jk^a positiven (+) als auch mit Jk^a negativen (-) Test-RBCs führt. Nach der Behandlung mit Darasorb Zellen konnte nur noch eine Agglutination mit Jk^a positiven (+) Test-RBCs festgestellt werden, was die vollständige und spezifische Entfernung von freien anti-CD38 Antikörpern schließen lässt. Die Negativkontrolle (Inkubation mit parentalen Zellen) blieb pan-reaktiv. **C:** IAT mit anti-K Antikörpern und Daratumumab. Ein Patientenplasma mit anti-K Antikörpern wurde mit Daratumumab versetzt, was zu einer Panagglutination mit den nativen RBCs I, II und III führte. Die Negativkontrolle nach Inkubation mit parentalen Zellen blieb unverändert. Nach Behandlung der Test-RBCs mit DTT fielen alle Reaktionen negativ aus, da sowohl CD38 als auch das KEL Glykoprotein auf den Zellen zerstört wurden. Nach selektiver Depletion von Daratumumab mit Darasorb Zellen war eine positive Reaktion mit den KEL1-exprimierenden (K+) Test-RBCs III feststellbar. Adaptiert von Ehrend *et al.*, Blood (2021)¹⁰⁴.



B Biotestcell-P3

REF	816017
LOT	3108011-00
	2021-04-26

196485 / 06

Last Name Nachname		First Name Vorname		Born geboren
Bloodgroup Blutgruppe		Identified Antibodies identifizierter Antikörper		ID
Hospital / Physician Krankenhaus / Arzt			Date Datum	Signature Unterschrift

Donor-No.	Rh-Typ	Rh-hr													Keil				Duffy		Luth-eran		Kidd		MNS				Lewis		P	Xg	Colton	Diego	Special Type** Besonderheiten**	Test Results Ergebnisse					
		D	C	E	c	e	C ^a	K	k	Kp ^a	Kp ^b	Js ^a	Js ^b	Fy ^a	Fy ^b	Lu ^a	Lu ^b	Jk ^a	Jk ^b	M	N	S	s	Le ^a	Le ^b	P ₁	Xg ^a	Co ^a	Co ^b	Df ^a	Df ^b										
1	103350	R ₁ ^a R ₁	+	+	o	o	+	+	+	+	+	+	o	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1					
2	103878	R ₂ R ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2				
3	103879	rr	o	o	o	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	3				
Autocontrol																														Autocontrol											

Pos. Reaktion with Pos. Reaktion mit	1	2	3	1 + 2	1 + 3	2 + 3	1 + 2 + 3
Possible Antibodies Mögliche Antikörper	C, C ^a , K, Le ^b , Co ^a	E	Lu ^a , M, S	D, Fy ^b , Jk ^b , N, s	e, Fy ^a , Jk ^a , Xg ^a	c, Le ^a , P ₁	k, Kp ^b , Lu ^b

Shaded columns indicate antigens destroyed or diminished in reactivity by enzyme treatment. Die farbige gekennzeichneten Antigene können im Enzymtest unterbrochen oder zerstört werden.

** Donors are tested negative for HLA class I antigens according to Bio-Rad test method using a monoclonal anti-HLA class I reagent. Die Spender werden negativ auf HLA class I mit einem monoklonalen Anti-HLA class I-Reagenz in einer Testmethode von Bio-Rad getestet.

Bio-Rad Medical Diagnostics GmbH
 Industriest. 1, D-63303 Dreieich, Germany
 Tel.: +49-6103-3130-0, Fax: +49-6103-3130-124
 www.bio-rad.com, techsupport@bio-rad.com

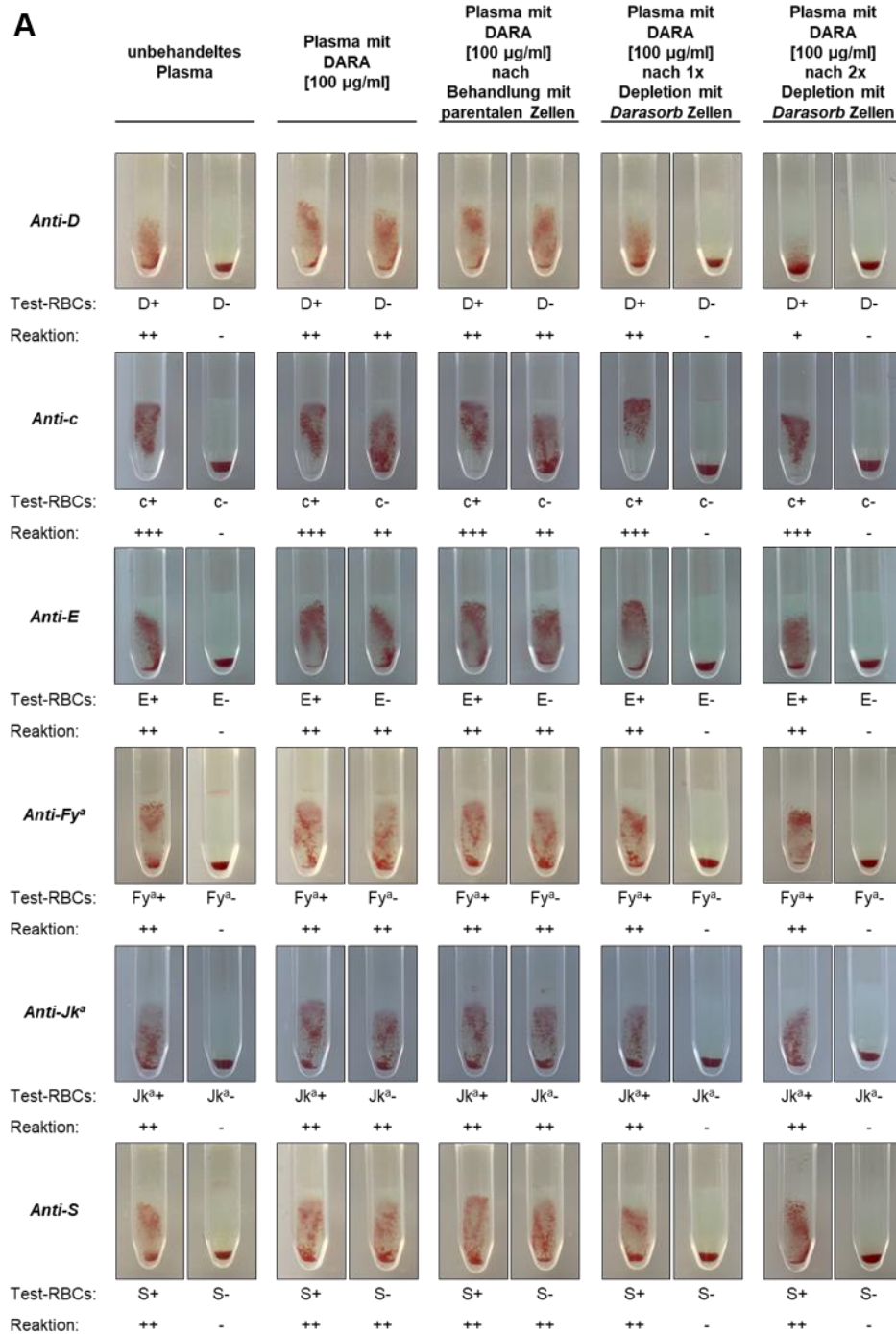
BIO-RAD

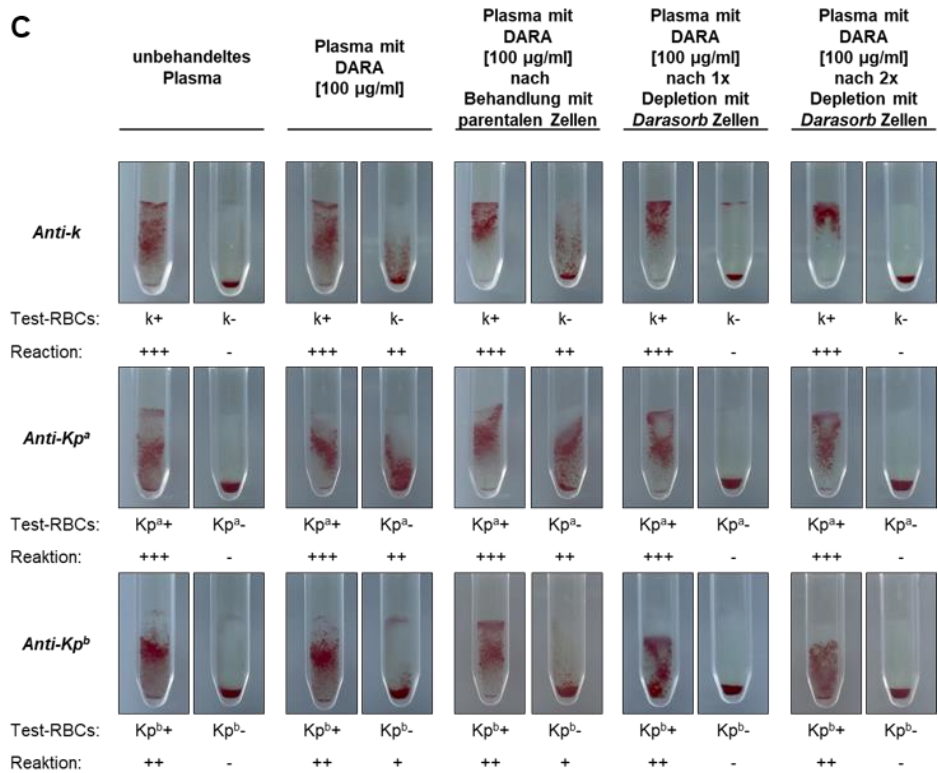
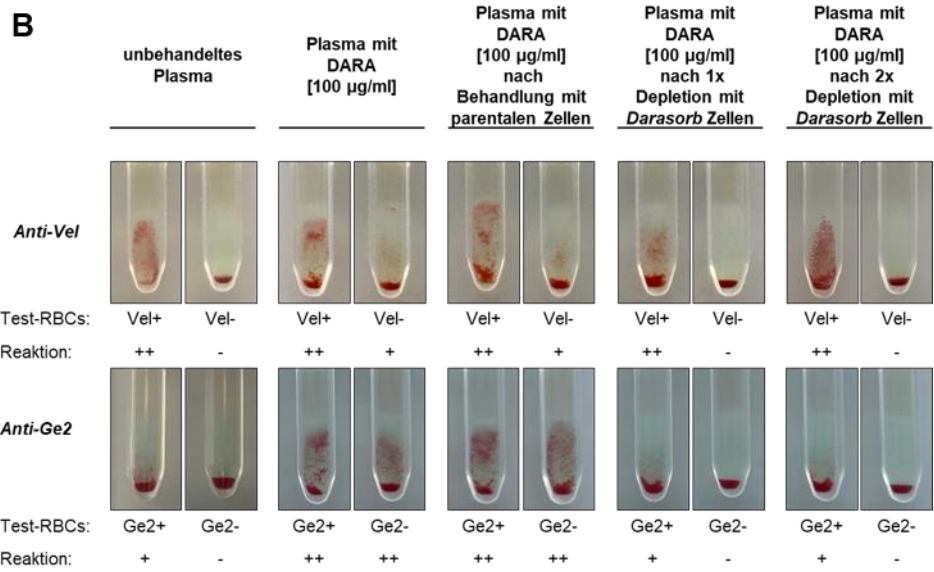
CE 0197

Abbildung 25: Ausschluss weiterer Panagglutinine in Patientenplasmaproben, die nach zwei Darasorb Depletionszyklen weiterhin panagglutinierend waren. Das Antikörper-screening wurde mit nativen und DTT-behandelten Erythrozyten und entsprechenden anti-K- und anti-E-Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt (A). Die beiden Plasmaproben mit anti-CD38 Titern von 2048 bzw. 4096 agglutinierten native Test-RBCs (+), nicht aber DTT-behandelte Test-RBCs (-). Die Antigenprofile der Panelzellen sind im beigefügten Antigramm (B) dargestellt. Adaptiert von Ehrend *et al.*, Blood (2021)¹⁰⁴.

Im Gegensatz zur Vorbehandlung der Test-Erythrozyten mit DTT, die durch die Zerstörung von Disulfidbrücken dazu führt, dass Antikörper gegen Antigene des KEL-Blutgruppensystems oder anderer durch Disulfidbrücken stabilisierter Blutgruppensysteme nicht mehr erkannt werden können, blieben nach der Behandlung mit *Darasorb* Zellen Antikörper gegen alle DTT-sensitiven Antigenensysteme detektierbar. Dies ist exemplarisch in Abbildung 24C anhand der Reaktivität eines Plasmas dargestellt, welches anti-K Antikörper enthielt. Während durch die Behandlung mit DTT die KEL-Proteine auf den Test-Erythrozyten zerstört wurden, so dass keine anti-K Reaktivität des Plasmas mehr festgestellt werden konnte, entfernten *Darasorb* Zellen selektiv das Daratumumab aus dem Plasma, so dass der anti-K Antikörper mit nativen, K-heterozygoten Test-Erythrozyten nachgewiesen werden konnten. Um sicherzustellen, dass die murine Depletionszelllinie nicht mit humanen Antikörpern kreuzreagiert und andere, ggf. auch schwache, erythrozytäre Antikörper nach der Behandlung mit *Darasorb* Zellen nachweisbar bleiben, wurden Spenderplasmen mit unterschiedlichen vorbeschriebenen Antikörperspezifitäten mit Daratumumab versetzt und anschließend sowohl mit den parentalen murinen Zellen, als auch mit *Darasorb* Zellen inkubiert. Abbildung 26 zeigt insgesamt 16 verschiedene Plasmen, die nach Zugabe des Daratumumab mit *Darasorb* Zellen behandelt und wieder von den monoklonalen anti-CD38 Antikörpern befreit wurden, wobei die irregulären erythrozytären Antikörper davon qualitativ und im Wesentlichen auch quantitativ unbeeinflusst blieben. Exemplarisch wurden Antikörper gegen nicht DTT-sensitive, Richtlinien-relevante Antigene der Rh, Duffy, Kidd und MNS Blutgruppensysteme (Abbildung 25A), sowie auch Antikörper gegen die nicht Richtlinien-relevanten Antigene Vel und Gerbich (Abbildung 25B) ausgewählt. Da der Erhalt von Antikörpern gegen DTT-sensitive Antigene von besonderem diagnostischen Interesse ist, wurden, wie in Abbildung 25C zu sehen, Antikörper gegen alle Richtlinien-relevanten Antigene des Kell- und Lutheran-Blutgruppensystems untersucht. Zusätzlich wurden auch Antikörper gegen die nicht Richtlinien-relevanten, DTT-sensitiven Antigene Do^a des Dombrock-Blutgruppensystems, sowie Yt^a und Yt^b betrachtet (Abbildung 25D). Die Behandlung dieser mit Daratumumab-versetzten Plasmen mit den *Darasorb* Zellen zeigte, dass die erythrozytären humanen Antikörper nicht mit homologen murinen Antigenen auf den Depletionszellen reagierten. Die Reaktionsstärke der Agglutination blieb auch nach zwei Depletionszyklen in den meisten Fällen quantitativ vergleichbar mit der Ausgangsreaktivität des Plasmas, wodurch gezeigt werden konnte, dass die Inkubation mit *Darasorb* Zellen keinen Verdünnungseffekt der im Plasma enthaltenen Antikörper

hervorrief. Eine unspezifische Absorption von anti-erythrozytären Antikörpern durch *Darasorb* Zellen war nicht erkennbar. Die prä-analytische Antikörperdepletion ermöglicht somit sowohl die Detektion von Antikörpern gegen nicht DDT-sensitive, als auch gegen DTT-sensitive Antigene, da die Antigenstrukturen der Erythrozyten, im Gegensatz zur Behandlung der Testzellen mit DTT, durch die Behandlung des Plasmas mit *Darasorb* Zellen nicht beeinträchtigt werden.





	unbehandeltes Plasma	Plasma mit DARA [100 µg/ml]	Plasma mit DARA [100 µg/ml] nach Behandlung mit parentalen Zellen	Plasma mit DARA [100 µg/ml] nach 1x Depletion mit Darasorb Zellen	Plasma mit DARA [100 µg/ml] nach 2x Depletion mit Darasorb Zellen
Anti-Lu^a					
Test-RBCs:	Lu ^a + Lu ^a -	Lu ^a + Lu ^a -	Lu ^a + Lu ^a -	Lu ^a + Lu ^a -	Lu ^a + Lu ^a -
Reaktion:	+++ -	+++ ++	+++ ++	+++ -	+++ -
Anti-Lu^b					
Test-RBCs:	Lu ^b + Lu ^b -	Lu ^b + Lu ^b -	Lu ^b + Lu ^b -	Lu ^b + Lu ^b -	Lu ^b + Lu ^b -
Reaktion:	++ -	++ +	++ +	++ -	++ -
D					
Anti-Do^a					
Test-RBCs:	Do ^a + Do ^a -	Do ^a + Do ^a -	Do ^a + Do ^a -	Do ^a + Do ^a -	Do ^a + Do ^a -
Reaktion:	++ -	++ ++	++ ++	++ -	++ -
Anti-Yt^a					
Test-RBCs:	Yt ^a + Yt ^a -	Yt ^a + Yt ^a -	Yt ^a + Yt ^a -	Yt ^a + Yt ^a -	Yt ^a + Yt ^a -
Reaktion:	++ -	++ ++	++ ++	++ -	+ -
Anti-Yt^b					
Test-RBCs:	Yt ^b + Yt ^b -	Yt ^b + Yt ^b -	Yt ^b + Yt ^b -	Yt ^b + Yt ^b -	Yt ^b + Yt ^b -
Reaktion:	++ -	++ +	++ +	++ -	++ -

Abbildung 26: Erhalt der Antikörper-Reaktivität nach Abreicherung von anti-CD38 Antikörpern aus Patientenplasma mit *Darasorb* Zellen. Bei der Depletion mit *Darasorb* Zellen blieben irreguläre Antikörper gegen Richtlinien-relevante, nicht-DTT-sensitive Antigene (**A**), nicht-Richtlinien-relevante, nicht-DTT-sensitive Antigene (**B**), Richtlinien-relevante, DTT-sensitive Antigene (**C**) und nicht Richtlinien-relevante, DTT-sensitive Antigene (**D**) quantitativ erhalten. Unbehandeltes Patientenplasma wurde mit Daratumumab versetzt, was zu einer Agglutination sowohl mit Antigen-positiven (+) als auch Antigen-negativen (-) Erythrozyten führte. Die Inkubation mit parentalen Zellen (Negativkontrolle) verändert das Reaktionsmuster nicht. Nach der Behandlung mit *Darasorb* Zellen wurde nur eine Agglutination mit Antigen-positiven Erythrozyten festgestellt, was auf eine vollständige und spezifische Entfernung von freier anti-CD38 Antikörpern hinweist. Adaptiert von Ehrend *et al.*, Blood (2021)¹⁰⁴.

In Anbetracht der Tatsache, dass für die Anwendbarkeit der Depletionsmethode eine verlängerte Haltbarkeit der Testzellen von großem Vorteil wäre, sollten die *Darasorb* Zellen stabilisiert werden. Hierzu wurden verschiedene Fixationsreagenzien getestet, unter denen das zelluläre Antigen-Stabilisierungsreagenz TransFix zunächst am vielversprechendsten aussah und daher für die initialen Untersuchungen verwendet wurde. Das kommerziell erhältliche Reagenz wird üblicherweise zur Stabilisierung humaner Blutproben verwendet. Laut Herstellerangaben¹⁰⁸ wird durch die Zugabe von TransFix zu den Zellen eine Haltbarkeit von bis zu 14 Tagen gewährleistet. Um zu überprüfen, ob das humane CD38 auf der Oberfläche der *Darasorb* Zellen durch das Reagenz über einen längeren Zeitraum qualitativ und quantitativ stabilisiert werden kann, wurden sechs Patientenplasmen mit unterschiedlich hohen Daratumumab-Titern ausgewählt und zu verschiedenen Zeitpunkten mit den stabilisierten *Darasorb* Zellen inkubiert.

Abbildung 27 zeigt die Ergebnisse der anti-CD38 Depletion mit frischen (unfixierten) *Darasorb* Zellen im Vergleich zur Depletion mit Zellen, die sieben Tage, zehn Tage oder zwei Wochen zuvor mit TransFix Reagenz fixiert worden waren. Die Inkubation mit unfixierten Zellen führte bei allen untersuchten Plasmen nach einer Inkubation zur vollständigen Depletion des CD38 Antikörpers. Nach einwöchiger Lagerung der Zellen in TransFix konnte dieses Ergebnis für alle Plasmaproben reproduziert werden, was zeigte, dass die Struktur des CD38-Proteins stabilisiert wurde und das Antigen auf den Zellen quantitativ erhalten blieb. Nach 10 bzw. 14-tägiger Lagerung der Zellen fiel auf, dass das Plasma mit dem höchsten Titer nicht mehr vollständig von dem pan-agglutinierenden Antikörper befreit wurde, was darauf hindeutet, dass sich die funktionale Depletionskapazität über die Zeit verringert hatte. Dieser geringe quantitative Verlust der Absorptionsfähigkeit der *Darasorb* Zellen konnte durch einen zusätzlichen Inkubationszyklus mit *Darasorb* Zellen ausgeglichen werden.

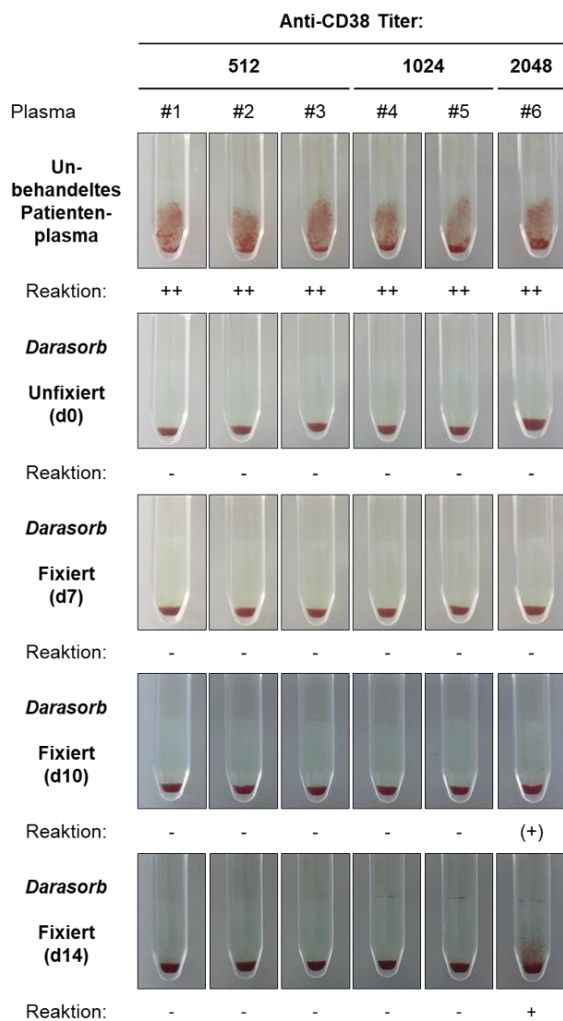


Abbildung 27: Depletion von anti-CD38 Antikörpern mit stabilisierten Darasorb Zellen. Es wurden sechs einzelne Patientenproben mit ansteigenden anti-CD38 Titern (512-2048) im zeitlichen Verlauf analysiert. Alle zeigten positive (+) Reaktionen mit Test-RBCs in unbehandeltem Zustand und waren nach einer Inkubation mit unfixierten Darasorb Zellen frei von dem Panagglutinin (-). Bei Verwendung fixierter Darasorb Zellen konnten die Proben auch nach 7, 10 und 14 Tagen noch von den anti-CD38 Antikörpern befreit werden. Das Patientenplasma mit dem höchsten anti-CD38 Titer von 2048 benötigte nach zehn Tagen einen zweiten Depletionszyklus, was auf einen leichten Verlust der Adsorptionskapazität im Laufe der Zeit hindeutet. Adaptiert von Ehrend *et al.*, Blood (2021)¹⁰⁴.

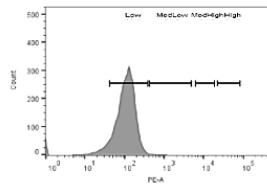
3.4.2 Depletion monoklonaler anti-CD47 Antikörper durch Magrosorb Zellen

Ein weiterer therapeutischer Antikörper, der bisher noch nicht zugelassen ist, aber in mehreren Studien zur Behandlung von verschiedenen hämatologischen Krebsarten sowie auch bei soliden Tumorerkrankungen getestet wird, ist der monoklonale IgG4 Antikörper Magrolimab (anti-CD47). Das targetierte Glykoprotein CD47 stellt einen Immuncheckpoint dar und könnte zukünftig bei einer Vielzahl von Indikationen Anwendung finden. CD47 wird jedoch auf allen Zellen, auch auf humanen Thrombozyten und Erythrozyten, exprimiert^{109,110}. Abbildung 28 reproduziert die vorbeschriebene Beobachtung, dass die Expressionsstärke des Antigens abhängig von der Rh Blutgruppe variiert, wobei RhD-negative Erythrozyten die höchste CD47-Antigendichte aufwiesen^{111,112}. Die Expression des Antigens auf Rh-positiven Erythrozyten war beim R₁R₁ Phänotyp etwas stärker als beim R₂R₂ Phänotyp. Die Abbildung zeigt zudem die

parentale murine Zelllinie MEL-745A, die das humane CD47 Antigen nicht besitzt, und *Magrosorb* Zellen, die durchschnittlich mehr als 400.000 CD47-Moleküle pro Zelle auf ihrer Oberfläche exprimieren.

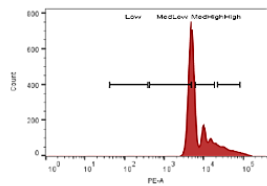
CD47 Expression: Moleküle/Zelle:

Parentale Zellen



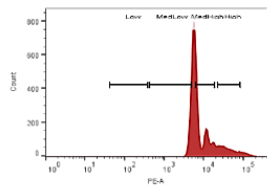
182

Erythrozyten
R₂R₂
[ccD.EE]



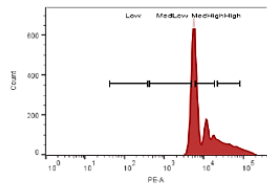
14.923

Erythrozyten
R₁R₁
[CCD.ee]



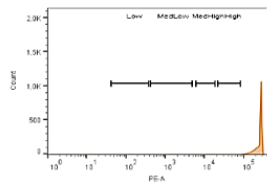
17.497

Erythrozyten
rr
[ccddee]



19.742

Magrosorb
Zellen



436.451

Abbildung 28: Bestimmung der Oberflächenexpression des humanen CD47 Antigens. Über einen anti-human-CD47-PE Antikörper wurde die Antigendichte auf parentalen, murinen Zellen (grau), humanen Erythrozyten (rot) und *Magrosorb* Zellen (orange) analysiert. Durch die Referenzmessung von BD Quantibrite™ Beads erfolgt eine Unterteilung der Expressionsdichte in die vier verschiedenen Bereiche *Low* (niedrig), *MedLow* (mittel-niedrig), *MedHigh* (mittel-hoch) und *High* (hoch). Die Expression des humanen CD47 Antigens ist auf den *Magrosorb* Zellen etwa 25-fach höher als auf humanen Erythrozyten, während die parentalen Zellen lediglich eine niedrige Hintergrundfluoreszenz besitzen. Humane Erythrozyten mit Rh-negativem Phänotyp (rr) weisen im Vergleich zu Rh-positiven Erythrozyten (R₁R₁ und R₂R₂) eine höhere CD47 Antigendichte auf.

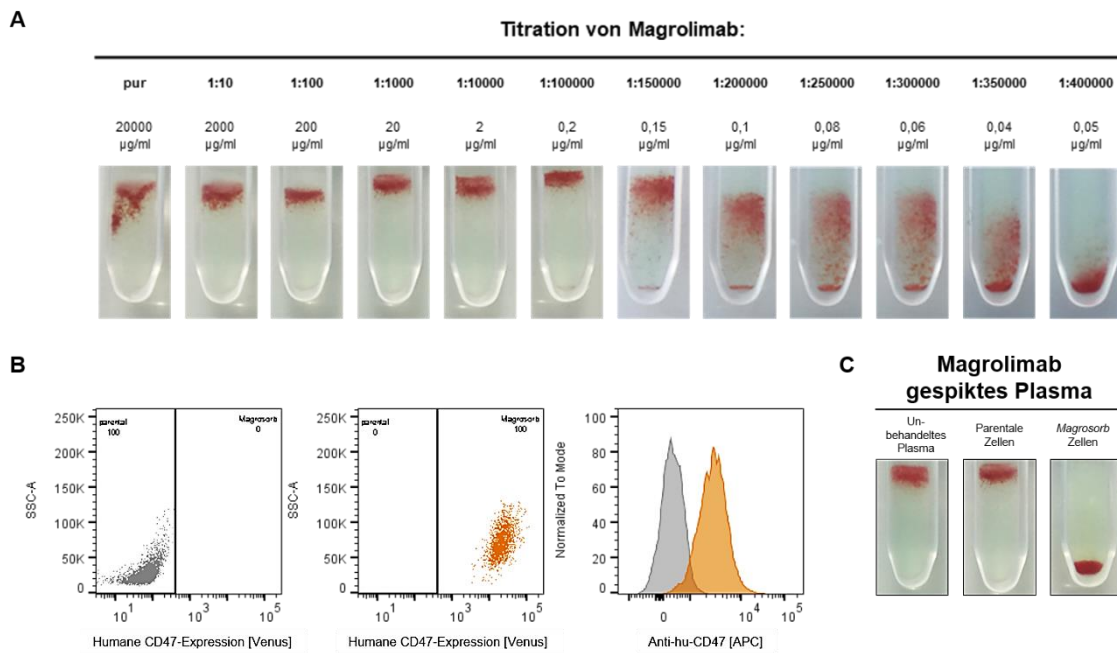


Abbildung 29: Interferenz des therapeutischen Antikörpers Magrolimab (anti-CD47) im IAT und Charakterisierung von *Magrosorb* Zellen. **A:** Reaktivität von Magrolimab im Gelkartenagglutinationstest. Die Titration des monoklonalen anti-CD47 Antikörpers zeigt nicht nur unverdünnt bei einer Konzentration von 20 mg/ml eine stark positive Reaktion im IAT, sondern auch noch bei 100.000-facher Verdünnung. Auch bei minimalen Konzentrationen von 0,05 µg/ml erfolgt noch eine schwache Agglutination. **B:** Parentale murine Zellen (grau) wurden mit einer Expressionskassette, die humanes CD47 und das Fluorochrom Venus co-exprimiert, stabil transduziert. Die CD47-exprimierenden *Magrosorb* Zellen wurden auf Bindung des Alexa Fluor 647-markierten anti-CD47 Antikörpers selektiert. **C:** Reaktivität eines Plasmas, welches mit Magrolimab versetzt wurde. Das unbehandelte, gespiktes Plasma (links) zeigt eine stark positive Reaktion im IAT. Nach Behandlung mit parentalen Zellen (Mitte) bleibt die Reaktion unverändert. Durch die Behandlung des Plasmas mit *Magrosorb* Zellen (rechts) wird der CD47 Antikörper abgereichert und es kommt nicht mehr zu einer Agglutinationsreaktion.

Wie in Abbildung 29A zu sehen ist, verursachen, der hohen Expressionsstärke auf Erythrozyten entsprechend, schon geringe Konzentrationen des therapeutischen Antikörpers Magrolimab eine viertgradige Agglutination der Test-Erythrozyten in der Gelkarte. Während die Reaktionsstärke von 0,05 µg/ml bis 0,15 µg/ml langsam zunimmt, fiel die Reaktion ab einer Konzentration von 0,2 µg/ml bereits vierfach-positiv aus. Bei der Behandlung mit Magrolimab sind im Serum der Patienten allerdings maximale Konzentrationen von mehr als 200 µg/ml und Plasma Titer zwischen 4096 bis zu 16384 festgestellt worden^{113,114}, weshalb bei der immunhämatologischen Diagnostik der Patientenproben von einer starken Interferenz mit den Test-Erythrozyten ausgegangen werden kann. Basierend auf dieser Problematik, die nicht durch die Behandlung der Test-Erythrozyten mit DTT umgangen werden kann, da das CD47 Antigen im Gegensatz zu CD38 nicht mit DTT zerstörbar ist und sich auch keine anderen offensichtlichen Strategien für seine Depletion von den Test-Erythrozyten anbieten, wurde eine murine

Depletionszelllinie generiert, die humanes CD47 in hoher Dichte auf der Oberfläche trägt und in der Lage ist, den therapeutischen anti-CD47 Antikörper zu binden (Abbildung 29B). Das Absorptionspotential dieser Zellen, welche nachfolgend als „*Magrosorb*“ Zellen bezeichnet werden, sollte äquivalent zu den *Darasorb* Zellen getestet werden. Da der Antikörper in Deutschland jedoch noch nicht zugelassen wurde und dementsprechend keine Patientenproben zur Verfügung standen, wurde analytisches Plasma mit dem therapeutischen Antikörper Hu5F9-G4, der uns für diese Studien von der Firma FortySeven (Chris Takimoto) zur Verfügung gestellt wurde, versetzt und mit *Magrosorb* Zellen behandelt. Das in Abbildung 29C dargestellte, mit Magrolimab versetzte Plasma zeigte vor der Behandlung mit den Depletionszellen eine vierfach-positive Agglutinationsreaktion in der Gelkarte. Nach der Inkubation mit den *Magrosorb* Zellen war keine Reaktivität des Plasmas mehr erkennbar, während die Inkubation mit parentalen Zellen das Reaktionsmuster nicht beeinflusste. Der monoklonale CD47 Antikörper konnte somit durch die Behandlung mit den CD47-exprimierenden *Magrosorb* Zellen spezifisch aus dem Plasma entfernt werden.

4. Diskussion

Da Bluttransfusionen nur für eine sehr kleine Anzahl der über 400 bekannten Blutgruppenantigene gematcht ausgewählt werden können, kann jede Transfusion zu einem sensibilisierenden Ereignis werden. In dem Moment, in dem ein Patient gegen ein Antigen sensibilisiert ist und einen spezifischen Antikörper ausgebildet hat, ist dieses Antigen für ihn nicht mehr verträglich. In der Konsequenz würde eine Bluttransfusion mit einer hämolytischen Transfusionsreaktion einhergehen. Im Prinzip gilt dasselbe für Schwangere. Jede Schwangerschaft kann die Mutter gegen die vom Vater vererbten kindlichen Antigene sensibilisieren. Daher wird vor jeder Erythrozyten-Transfusion das Blut des Empfängers auf das Vorliegen von irregulären anti-erythrozytären Antikörpern untersucht. Im Falle von anti-thrombozytären Antikörpern kann ebenso jede Transfusion zu einer Sensibilisierung führen, wodurch die Wirksamkeit nachfolgender Antigen-positiver Thrombozytenpräparate aufgehoben wird. Allerdings sind Sensibilisierungen gegen humane Plättchenantigene eher selten und Transfusionen gegen anti-HPA Antikörper verlaufen häufig asymptomatisch, sind *per se* also für den Empfänger ungefährlich. Aus pragmatischen Gründen wird deshalb nur bei einer neonatalen Thrombozytopenie mit entsprechendem klinischem Verdacht und bei Transfusionsrefraktärität eine Suche auf anti-HPA Antikörper eingeleitet. Es mangelt jedoch an robusten Testsystemen. Allen Testsystemen gemeinsam ist, dass sie auf primären Zellen beruhen, woraus sich auch die im Folgenden diskutierten Limitationen ergeben, welche die hier entwickelten Reagenzien inspiriert haben. Die immunhämatologische Diagnostik sieht sich bei der Detektion und Spezifikation von irregulären Antikörpern tagtäglich mit einer Vielzahl von Problemen konfrontiert. Diese sind im Wesentlichen darauf zurückzuführen, dass die derzeit verfügbaren Assays zur Identifikation irregulärer Antikörper primäre humane Zellen verwenden, die auf ihrer Oberfläche mehrere hundert Blutgruppenantigene tragen. Diese Tatsache führt dazu, dass die konkrete Zuordnung der Antikörperspezifität bei polysensibilisierten Patienten schwierig sein kann. Zudem sind die meisten Antigene in der Bevölkerung sehr asymmetrisch verteilt. Wenn die Verteilung der Genfrequenzen 99,9 % oder höher beträgt, spricht man von einem „hochfrequenten“ Major-Antigen. Liegt die Frequenz der Minor-Form bei weniger als 0,1 %, wird das Antigen als „niedrigfrequent“ bezeichnet. In der Konsequenz sind niedrigfrequente Antigene, aber auch Antigene, die aufgrund der ethnischen Antigenverteilung in der hiesigen Bevölkerung nicht vorkommen, nicht regelmäßig in den Testzell-Panels vertreten, wodurch spezifische Antikörper übersehen

werden können. Bei Patienten, die Antikörper gegen hochfrequente oder nicht-polymorphe Antigene besitzen, oder bei pan- und polyagglutinierenden Plasmen ist eine Differenzierung aufgrund der allenfalls wenigen verbleibenden nicht-reaktiven Testzellen manchmal unmöglich. Einige Antigene, wie beispielsweise Antigene des KEL Blutgruppensystems, werden wiederum nur in sehr geringer Dichte auf den primären Zellen exprimiert oder kommen in bestimmten ethnischen Populationen nur äußerst selten vor und sind deshalb nicht regelhaft in kommerziellen Testpanels vertreten, was zu falsch negativen Ergebnissen im Antikörperscreening führen kann. Andererseits können durch Pseudoagglutinationen, auch bekannt als „Geldrollenbildung“, ausgelöst durch Adhäsionskräfte zwischen den Erythrozyten¹¹⁵⁻¹¹⁷, falsch positive Testresultate hervorgerufen werden. Ein weiteres Problem von zunehmender Bedeutung stellen therapeutische monoklonale Antikörper dar, deren Zielstrukturen auch auf Erythrozyten exprimiert werden. Die daraus resultierende Panagglutination der Testzellen führt dazu, dass die Tests für den Nachweis anderer irregulärer Antikörper blind sind. Im Bereich der Neutrophilen- und Thrombozyten-Antikörperdiagnostik sollten die Testsysteme im Hinblick auf Arbeitsaufwand, Haltbarkeit und Abhängigkeit von der natürlichen Antigenverteilung und der Co-Segregation optimiert werden. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten unterstützen die Annahme, dass unser neuartiger, innovativer Ansatz zum Nachweis und zur Depletion von erythrozytären, granulozytären, thrombozytären und therapeutischen Antikörpern, der auf nicht-humanen Testzellen basiert, das Potential besitzt, viele Unzulänglichkeiten herkömmlicher immunhämologischer Tests zu beheben.

4.1 Alleinstellungsmerkmale xenogener Testzellen gegenüber primären humanen Testzellen

Die Expression eines einzelnen humanen Antigens auf einer nicht-humanen Testzelle, wie wir sie in der von uns vorgestellten Technologie verwenden, ermöglicht nicht nur die eindeutige Identifizierung der Antikörperspezifität anhand der Reaktivität einer einzigen Testzelle, sondern auch eine direkte Identifikation verträglicher Blutgruppenantigene. Außerdem ist das vorgestellte Testsystem aufgrund der Verwendung nicht-humaner Zellen weitestgehend unempfindlich gegenüber nicht-polymorphismus-spezifischen, panagglutinierenden Antikörpern oder einer Erythrozyten-spezifischen, nicht Antikörpervermittelten Pseudoagglutination. Dies kann infolge einer Disruption der stark negativen

Oberflächenladung bei Dysproteinämien zum Beispiel bei Myelom- oder Rheumapatienten der Fall sein¹¹⁸. Die Auswahl einer geeigneten Zelllinie ist dabei für das Testsystem von entscheidender Bedeutung. Die designierte Zelllinie sollte durch möglichst wenig homologe Proteinstrukturen eine geringe serologische Kreuzreaktivität mit humanem Plasma besitzen, was beispielsweise Insektenzellen als Trägerzellen für ein solches Testsystem attraktiv machen würde¹¹⁹. Auch die Kopplung der humanen Blutgruppenantigene an Latex Beads, ähnlich zum Luminex-basierten Human-Leukozytenantigen (HLA) Antikörper-screening, wäre eine erfolgsversprechende Alternative¹²⁰. Der Vorteil xenogener Zellen gegenüber Beads besteht allerdings darin, dass die humanen Antigene in ihrer natürlichen Konformation auf der Zelloberfläche präsentiert werden¹²¹. Einige Antigene sind auf komplexen membran-integralen Proteinen gelegen, so dass die korrespondierenden Antikörper oftmals die korrekte Konformation des Proteins benötigen, um binden zu können. Ein konkretes Beispiel dafür ist der Antikörper anti-f, der gegen das Rhce Protein gerichtet ist und ce in *cis*-, nicht aber wenn sich die Antigene auf separaten Rh Proteinen befinden (cE/Ce), erkennen kann¹²². Die natürliche Konformation ist also für die sichere Detektion von irregulären Antikörpern zumindest grundsätzlich notwendig. Weiterhin ist für die Expression humaner Membranproteine häufig ein gewisses zelluläres Grundgerüst erforderlich, weshalb die Wahl auf eine murine Zelllinie fiel. Sowohl *in silico* als auch in experimentellen Analysen konnte gezeigt werden, dass trotz der strukturellen Existenz homologer, erythroider Oberflächenmarker und der Ähnlichkeit der murinen und humanen Proteinexpressionsmuster die Homologie, insbesondere um die polymorphen, also das Antigen definierenden Positionen, so gering ist, dass keine serologische Kreuzreaktivität zwischen murinen Blutgruppenantigenen und humanen irregulären Antikörpern zu erwarten ist^{123,124}. Zunächst wurde die murine T-Zelllinie A0.01¹²⁵ als Testzelllinie in Betracht gezogen, welche aufgrund ihrer geringen Autofluoreszenz für durchflusszytometrische Analysen besonders geeignet erschien. Diese in der Literatur bisher wenig charakterisierte Suspensionszelllinie ließ sich allerdings nur schwer transduzieren und erwies sich als ungeeignet für die Expression komplexerer erythrozytärer Antigenstrukturen, wie beispielsweise Antigene des Rh Blutgruppensystems. Dies ist mutmaßlich dem Umstand geschuldet, dass für die Expression der Rh Proteine konkrete Komponenten des erythrozytären Zytoskeletts co-exprimiert werden müssen, welche in A0.01 Zellen aufgrund der lymphozytären Spezifizierung nicht exprimiert werden. Für die murine, erythroleukämische Zelllinie MEL-745A⁹⁸ liegen hingegen detaillierte Proteomanalysen vor. Diese bestätigen das Vorhandensein eines potenziellen, erythrozytären

Zytoskeletts¹²⁶, weshalb diese Zelllinie prädestiniert für die Expression humaner Blutgruppenantigene erschien. Eine alternative Zelllinie, die häufig für die Expression rekombinanter Proteine verwendet wird, sind CHO-Zellen (Chinesische Hamster Ovarialzellen)¹²⁷. Da es sich bei den CHO-Zellen allerdings um eine adhärenzte Zelllinie handelt, wäre zur Vorbereitung der Testzellen für die durchflusszytometrische Analyse stets eine enzymatische Vorbehandlung von Nöten, die gegebenenfalls auch die exprimierten humanen Blutgruppenantigene beeinflussen könnte. Eine Behandlung mit Trypsin beeinflusst beispielsweise die Glykophorine des MNS-Blutgruppensystems und die Antigene der Blutgruppensysteme IN und JM¹²⁸. Dementsprechend war ein weiteres Argument für die Verwendung von MEL-745A Zellen, dass es sich um eine Suspensionszelllinie handelt. Dies ist nicht nur von Vorteil bei der Anwendung des Durchflusszytometrie-basierten Testverfahrens, sondern auch im Hinblick auf die Kultivierung und besonders der Expansionskapazität der Testzellen.

4.2 Eignung des Testsystems zum Nachweis von Antikörpern gegen erythrozytäre Antigene

Dass der Nachweis und die Spezifikation anti-erythrozytärer Antikörper mittels muriner Testzellen, die jeweils ein humanes Blutgruppenantigen exprimieren, grundsätzlich möglich ist, zeigten bereits die ersten *proof-of-principle* Untersuchungen, die am Beispiel des FY Testzell-Panels (Abbildung 4) durchgeführt worden waren. Die antithetischen Antigene Fy^a und Fy^b, die sich auf dem G-Protein gekoppelten Duffy-Antigen-Rezeptoren befinden, welcher die Zellmembran sieben Mal durchspannt und zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen besitzt, konnten durchflusszytometrisch auf der Oberfläche der Zelllinie A0.01 nachgewiesen werden und die Antikörper anti-Fy^a und anti-Fy^b spezifisch in humanem Patientenplasma identifizieren. Allerdings waren die murinen T-Zellen nicht in der Lage, die Antigene des Rh Blutgruppensystems auf ihrer Zelloberfläche zu exprimieren. In Anbetracht der komplexen Formation der Rh Antigene in der erythrozytären Zellmembran¹⁹, lag die Vermutung nahe, dass der lymphoide Hintergrund der Zellen nicht das nötige Grundgerüst für die Darstellung der Proteine auf der Zelloberfläche bietet. Die Expression der komplexen Rh Antigene wurde deshalb in MEL-745A Zellen untersucht. Da bereits beschrieben wurde, dass das Rh-assoziierte Glykoprotein essentiell für die Expression der Rh Antigene ist²¹, wurden die MEL-745A Zellen zunächst mit einem humanen RHAG-Konstrukt transduziert. In Ermangelung eines kommerziell erhältlichen, für Durchflusszytometrie geeigneten, RhAG Antikörpers

konnte die Expression nur durch die Co-Expression des fluoreszierenden Reporterproteins, aber nicht direkt auf der murinen Zelloberfläche nachgewiesen werden. Dass die Expression des RhAG in anderen heterologen Systemen möglich ist, wurde bereits in vorangegangenen Untersuchungen gezeigt¹²⁹⁻¹³¹, weshalb davon ausgegangen werden konnte, dass das RhAG auch auf den MEL-745A-Zellen exprimiert wird. Nachdem die MEL-745A Zellen mit dem RHAG-Konstrukt transduziert und auf die entsprechenden Fluoreszenzmarker selektiert wurden, erfolgte die Transduktion der Rh Antigene D, CE, Ce, cE und ce sowie C^W. Indirekt bestätigt der Nachweis der Rh Antigene auf der Zelloberfläche auch die Co-Expression des RhAGs, wodurch diese Annahme retrospektiv bewiesen werden konnte.

In Abhängigkeit von der Anzahl der im Durchflusszytometer vorhandenen Laser können die xenogenen Testzellen im Prinzip zu beliebig großen Panels kombiniert werden. Dies wurde beispielhaft am Testzell-Panel zum Nachweis und zur Spezifikation von Antikörpern gegen Antigene des Rh Blutgruppensystems (Abbildung 15) mit sechs Testzelllinien sowie parental Referenzzellen demonstriert. Neben der Codierung der Testzellen über die Fluorochrommarkierung könnten zusätzliche Merkmale der Testzellen, beispielsweise ihre Größe und Granularität sowie unterschiedliche Expressionsstärken der Fluorochrome für die Differenzierung der Zellen im Durchflusszytometer herangezogen werden, wodurch die Anzahl der verschiedenen Testzellspezies pro Panel noch deutlich erweitert werden könnte.

Obwohl es sich bei dem Rh Blutgruppensystem um eines der komplexesten und klinisch relevantesten Blutgruppensysteme handelt, stellen Antikörper gegen Rh Antigene selten eine diagnostische Herausforderung dar. Dennoch bietet auch hier die Verwendung xenogener Testzellen Vorteile, da beispielsweise auch nicht-natürliche Varianten von Blutgruppenantigenen erzeugt werden können, die so in der Bevölkerung nicht oder nur selten zu finden sind. Ein Beispiel für ein solches nicht-natürliches Blutgruppenantigen ist die in unserem Rh Panel verwendete C^W-Zelle, die den Polymorphismus in einem genetischen Kontext trägt, der in dieser Form in der Bevölkerung nur sehr selten auftritt, nämlich auf einem ce Hintergrund. Diese Unabhängigkeit unseres Testsystems von der Blutgruppenverteilung in der normalen Blutspenderpopulation ist eine nützliche Eigenschaft, die in Zukunft vor allem in Anbetracht der zunehmenden ethnischen Vielfalt an Bedeutung gewinnt.

Da die für die Testzellen verwendete Zelllinie murinen Ursprungs ist und bereits bekannt ist, dass Mäuse homologe Blutgruppenantigene besitzen^{132,133}, wurden die erythroleukämischen MEL-745A Zellen auf das Vorhandensein homologer Rh Antigene (Abbildung 16) untersucht. Obwohl das murine Rh Protein zu über 50 % mit den humanen Varianten RhD (57 %) und RhCE (58 %) übereinstimmt, ist eine serologische Reaktivität mit humanen Rh Antikörpern bisher nicht beschrieben¹³². Phänotypisch lässt sich bei dem murinen Rh Protein der humane e Polymorphismus wiederfinden. Eine Bindung humaner anti-e Antikörper an das murine Rh Protein lässt sich daher nicht *a priori* ausschließen, auch wenn keines der von uns verwendeten Plasmen mit anti-e Reaktivität mit den parentalen MEL-745A Zellen kreuzreagierte. Durch die Möglichkeit, die Testzelllinie im Gegensatz zu primären Erythrozyten multipel genetisch zu modifizieren, können homologe murine Antigene bei Bedarf spezifisch aus dem Genom der Testzellen deletiert werden. Wie in Abbildung 17 dargestellt ist, wurde exemplarisch das murine RHD-Gen in den MEL-745A Zellen mittels CRISPR/Cas9 so verändert, dass es durch die Insertion zweier Basen in die genomische DNA zu einer Verschiebung des offenen Leserahmens kam, die in der Konsequenz nach 115 Aminosäuren zu einem Translationsstop führt. Da kein kommerzieller Antikörper zum Nachweis des murinen RhDs auf der Zelloberfläche verfügbar war, konnte die Deletion auf Proteinebene nicht überprüft werden. Dass ein trunkiertes, murines Rh Protein exprimiert wird, kann somit nicht vollständig ausgeschlossen werden. Da sich der Bereich des homologen e-Polymorphismus jedoch hinter dem ersten Stop-Codon befindet, kann die Möglichkeit einer Kreuzreaktivität der mRhD Deletionszelllinie mit humanen anti-e Antikörpern definitiv ausgeschlossen werden. Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patientenplasmen konnte bislang keine serologische Reaktivität der humanen Antikörper mit den parentalen MEL-745A Zellen festgestellt werden. Sollte sich in der Zukunft jedoch eine derartige Problematik ergeben, stellt die zielgerichtete genetische Deletion ein nützliches Tool zur Optimierung der xenogenen Testzellen dar. Weiterhin wäre eine potentielle Konkurrenz um Bindungsstellen im Multiproteinkomplex zwischen den endogenen murinen und den gentechnisch eingeführten, homologen humanen Proteinen vorstellbar. Diese Hypothese wurde bisher nicht systematisch untersucht, wäre aber mit derselben Strategie kontrollierbar. Auch der Einfluss der geringfügig unterschiedlichen O- und N-Glykosylierungsmuster humaner und muriner Proteine wurde noch nicht genauer untersucht. Die bisher durchgeführten Experimente geben zwar keinen Hinweis auf eine Beeinträchtigung der

antigenischen Qualität, eine systematische Untersuchung der differenziellen Glykosylierung humaner Blutgruppenantigene in MEL-745A Zellen verglichen mit humanen Zellen (insbesondere primären Erythrozyten) stehen jedoch noch aus. Die Möglichkeit der Glykom-Modellierung durch gezielte Deletion nicht-humaner Glykosyltransferasen wird bereits regelhaft bei der Herstellung rekombinanter therapeutischer Proteine in nicht-humanen *Producer*-Zellen eingesetzt^{134–136} und könnte analog bei den xenogenen Testzellen angewandt werden.

Neben den Rh-exprimierenden Testzellen wurden bereits weitere Testzellen mit den erythrozytären Antigenen M, N, S und s des MNS-Blutgruppensystems¹³⁷, Jk^a und Jk^b des JK-Blutgruppensystems¹³⁸, sowie K, k, Kp^a und Kp^b des KEL-Blutgruppensystems¹³⁹ hergestellt und untersucht. Grundsätzlich können durch das vorgestellte Verfahren Testzellen für alle Protein-basierten Blutgruppenantigene erzeugt werden. Lediglich die Blutgruppensysteme, wie ABO, H, I, Lewis und P1PK, deren Antigene auf Kohlenhydratstrukturen zurückzuführen sind, lassen sich nicht ohne Weiteres auf den xenogenen Testzellen darstellen. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass die zugrundeliegenden Gene dieser Blutgruppen nicht das Antigen an sich codieren, sondern die katalytischen Enzyme, die für den Transfer bestimmter Mono- oder Oligosaccharide verantwortlich sind. Grundsätzlich wäre es denkbar, durch Geneditierung von multiplen Glykosyltransferasen auch Testzellen mit Polysaccharid-basierten Antigenen herzustellen, jedoch sind die komplexen Synthesewege teilweise immer noch unzureichend beschrieben und dadurch biotechnologisch schwer kontrollierbar¹⁴⁰.

4.3 Eignung des Testsystems zum Nachweis von Antikörpern gegen HNAs

Da Antikörper gegen HNAs außerhalb von Schwangerschaften kaum eine Rolle spielen, weil Neutrophile nur sehr selten und ohnehin fast ausschließlich bei stark Immunsupprimierten transfundiert werden und außerdem die Antigenität der Neutrophilantigene als gering einzustufen ist, steht die HNA Antikörper Diagnostik eher selten im Fokus der Entwicklung neuer Testsysteme. Das in dieser Arbeit vorgestellte innovative Testverfahren lässt sich jedoch auch auf nicht-erythroide Blutgruppensysteme übertragen und bietet somit die Möglichkeit, die vorhandenen diagnostischen Tests im Hinblick auf ihre Spezifität und Sensitivität weiter zu verbessern und gegebenenfalls zu vereinfachen oder zu beschleunigen. Die Hauptvoraussetzung für eine zuverlässige Identifikation und Spezifikation von granulozytären Antikörpern ist ein breit aufgestelltes

Testzell-Panel, welches möglichst viele unterschiedliche Antigenvarianten enthält⁵⁰. Da die aktuellen Verfahren jedoch auf frisch isolierte, primäre Granulozyten als Testzellen zurückgreifen und sich die Frequenz und Verteilung der HNA-Merkmale in der Bevölkerung stark zwischen den einzelnen Populationen unterscheiden¹⁴¹, sind die seltenen HNAs in der Regel in den Panels unterrepräsentiert. Besonders für Minor-Antigenvarianten sind homozygote Merkmalsträger extrem selten, wodurch die Auflösung und Spezifität der aktuellen Tests verringert wird. Aber auch Antikörper, die gegen seltener vorkommende Merkmale wie beispielsweise HNA-1c gerichtet sind, können schwere neonatale Immuneutropenien verursachen¹⁴². Zusätzlich werden auf den primären Testzellen nicht nur die Neutrophilen-spezifischen Antigene exprimiert, sondern beispielsweise auch HLAs, wodurch eine Abgrenzung der zugrundeliegenden Antikörper (anti-HLA oder/und anti-HNA) deutlich erschwert wird. Xenogene Testzellen nicht-humanen Ursprungs wären hingegen unabhängig von der ethnischen Antigenverteilung in der Spenderpopulation und könnten die Differenzierung der Antikörperspezifitäten dadurch erheblich vereinfachen. Ein Testpanel für anti-HNA Antikörper könnte außerdem indirekt durch den Ausschluss von Neutrophilenantikörpern die Diagnose einer nicht-immunologischen oder z.B. anti-HLA Antikörper-vermittelten Neutropenie differentialdiagnostisch in den Vordergrund stellen¹⁴³. Weiterhin wären die Testzellen, die sich mit wenig Aufwand kultivieren und beliebig expandieren lassen, deutlich einfacher verfügbar und die generierten Panels könnten über einen längeren Zeitraum stabilisiert werden. Da neutrophile Granulozyten nur eine Lebensdauer von wenigen Stunden besitzen¹⁴⁴ und sich die Lagerung der primären Zellen unter Erhalt der Antigenstrukturen schwierig gestaltet¹⁴⁵, ist das derzeitige Testverfahren nicht nur personal- und zeitaufwändig, sondern auch schwer standardisierbar und kann nicht, wie allgemein in der Diagnostik üblich, CE-zertifiziert werden. Ein weiterer Vorzug des durchflusszytometrischen Testverfahrens sind die geringen Mengen an Patientmaterial, die besonders die Anwendbarkeit in der Pädiatrie oder Neonatologie verbessern könnten und natürlich auch im Hinblick auf das *Patient Blood Management* (PBM) erstrebenswert sind^{146–148}. Da aus den xenogenen Testzellen beliebig große Panels mit unterschiedlichen Antigenkonstellationen zusammengestellt werden können und etwa 50 µl Patientenplasma je Ansatz ausreichend für die durchflusszytometrische Analyse sind, wären nur sehr geringe Probenmengen erforderlich. Durch die reduzierte Blutentnahme bleibt der Blutverlust der Patienten gering und die körpereigenen Reserven werden geschont.

Neben der Verwendung der Testzellen für die Diagnostik von granulozytären Antikörpern könnten die xenogenen Zellen möglicherweise auch der grundlagenwissenschaftlichen Erkenntnisgewinnung über die humanen Neutrophilenantigene dienen, denn obwohl die molekulare Genetik der HNAs bekannt ist, sind die Zusammenhänge zwischen dem serologischen Phänotyp und dem Genotyp bisher nicht vollständig geklärt¹⁴⁹. Der Einbau von „immunologisch neutralen“ Aminosäuren, die weder HNA-1a noch -1b entsprechen, generiert nicht-natürliche HNA-1 Varianten, gegen die inhärent keine Antikörper vorliegen können und könnte beispielsweise die genauere Differenzierung von anti-HNA-1b und anti-HNA-1d Antikörpern ermöglichen.

4.4 Eignung des Testsystems zum Nachweis von Antikörpern gegen HPAs

Obwohl eine HPA-Inkompatibilität zwischen Mutter und Kind bereits in der ersten Schwangerschaft ernstzunehmende, teilweise lebensbedrohliche Konsequenzen haben kann⁸⁷, werden HPA Antikörper in Ermangelung geeigneter Testsysteme trotz Verfügbarkeit evidenzbasierter therapeutischer Optionen bei Schwangeren bisher nicht routinemäßig untersucht. Da die derzeit etablierten Technologien für ein flächendeckendes pränatales HPA Antikörper-Screening ungeeignet sind, sollten in dieser Arbeit xenogene Testzellen hergestellt werden, die in Form eines Mini-Testzell-Panels zur Detektion der FNAIT-verursachenden Antikörper anti-HPA-1a und anti-HPA-5b, konzeptionell auch für ein Screening, eingesetzt werden könnten. Die Auswahl der Antigene ergibt sich daraus, dass fast alle FNAIT-Fälle bei Kindern zentraleuropäischer Mütter durch diese beiden Spezifitäten begründet sind und auch nur für diese Spezifitäten regelhaft Antigen-negative TKs für die Transfusion betroffener Neugeborener in den großen Blutbanken vorgehalten werden. Ähnlich wie die oben diskutierte Herausforderung der konformationsgetreuen Darstellung von Multipassproteinen zur Diagnostik anti-erythrozytärer Antikörper, stellen auch die HPAs spezielle Herausforderungen an das Testsystem: Eine Vielzahl der humanen Plättchenantigene befindet sich auf Integrin-Ketten, die jeweils nur in Anwesenheit ihrer Heterodimerpartner auf der Zelloberfläche präsentiert werden können. Daher musste bei der Generierung der HPA-Testzellen zunächst untersucht werden, ob die humanen thrombozytären Glykoproteine, die sich als Integrin-Heterodimere auf der Zelloberfläche zusammenfinden müssen, in ausreichend hoher Dichte und korrekter Konformation auf den murinen Zellen dargestellt werden können (Abbildung 19). Die

durchflusszytometrische Analyse mit einem gegen α IIb/ β 3-gerichteten PE-Antikörper zeigte, dass der Glykoprotein-Komplex in hoher Dichte auf den HPA-1a/3a Testzellen wiederzufinden war. Die Untersuchung ergab eine etwa viermal höhere Expression des GP-Komplexes auf den murinen Testzellen verglichen mit humanen Blutplättchen, was sich positiv auf die Sensitivität der Testzellen auswirken sollte. In vorangegangenen Studien wurde beschrieben, dass sich etwas 30.000-80.000 Moleküle des Fibrinogen-Rezeptors (α IIb/ β 3) auf der Oberfläche unstimulierter humaner Thrombozyten befinden^{150,151}. Davon ausgehend ist die HNA-1a/3a-Expression auf den xenogenen Testzellen vergleichbar mit der Antigendichte auf den primären humanen Zellen. Das nicht-hämatopoetische Integrin-Heterodimer α V/ β 3, welches natürlicherweise auf Endothelzellen, glatten Muskelzellen oder auch Fibroblasten vorkommt, wird auf humanen Plättchen nicht bzw. nur sehr schwach exprimiert¹⁵². Die xenogenen Testzellen sind hingegen in der Lage, auch den α V/ β 3-GP-Komplex mit mindestens 90.000 Molekülen pro Zelle, also in sehr hoher Dichte, auf der Oberfläche zu exprimieren. Auch die Expression des HPA-5b Antigens sollte quantitativ untersucht werden. Allerdings war kein kommerzieller Antikörper erhältlich, der den α 2/ β 1-GP-Komplex detektiert. Deshalb wurde die Untersuchung der Komplexpartner getrennt voneinander durchgeführt. Die durchflusszytometrische Analyse mit einem gegen α 2-gerichteten Antikörper zeigte mit etwa 4.000 Molekülen pro Zelle eine dreimal höhere Integrin-Expression auf den xenogenen Testzellen verglichen mit den primären Thrombozyten. Laut Literatur liegt das Expressionsprofil von α 2/ β 1 auf humanen Plättchen bei etwa 900 bis 4.000 Molekülen pro Zelle¹⁵³. Weiterhin zeigte die durchflusszytometrische quantitative Untersuchung, dass auf den humanen Thrombozyten dreimal mehr Integrin β 1 vorhanden war als Integrin α 2. Das ungleiche Verhältnis der α 2- und β 1-Expression kann vermutlich darauf zurückgeführt werden, dass das Integrin β 1 auf den humanen Thrombozyten nicht nur mit Integrin α 2 dimerisieren muss, sondern auch mit den ebenfalls auf Thrombozyten exprimierten Integrinen α 5¹⁵⁴ und α 6¹⁵⁵, welche von unserer Testzelle nicht exprimiert werden. Neben der Herstellung von Testzellen mit den natürlich vorkommenden Varianten wie HPA-1a/3a, bietet das Testsystem weiterhin die Möglichkeit, nicht natürliche, immunologisch mutmaßlich indifferente Blutgruppenantigene zu erzeugen. Dadurch könnten Antikörper gegen Antigene, die auf demselben Protein exprimiert werden, separiert und somit leichter differenziert werden. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Testzellen generiert, welche die natürliche HPA-1a Variante auf dem β 3-Integrin exprimieren, auf dem α IIb-Integrin jedoch eine HPA-3 Mutation tragen, die phänotypisch

weder HPA-3a noch -3b entspricht. Das als HPA-3~ bezeichnete Antigen wurde mit dem Antigen HPA-1a in den xenogenen Zellen co-exprimiert und war in der Lage, ein funktionales Heterodimer auszubilden. Abbildung 20 zeigt, dass die Bindung der anti-HPA-1a Antikörper durch die Mutation in der α -Kette nicht beeinflusst wurde. Da jedoch nur eine einzige Patientenprobe mit anti-HPA-3a Antikörpern verfügbar war und diese keinen eindeutigen Rückschluss auf die Funktionalität des mutierten Polymorphismus zuließ, müssen zunächst weitere Patientenproben mit vordiagnostizierten anti-HPA-3a Antikörpern gesammelt und getestet werden. Generell gestaltet sich der serologische Nachweis von HPA-3 Antikörpern schwierig, da die Antikörperbindung stark von der Sialylierung des α IIb/ β 3-GP-Komplexes abhängig ist¹⁵⁶. Ob die Stabilität des sialylierten Komplexes, insbesondere auch bei längerer Lagerung der murinen Testzellen, gegeben ist, muss erst noch untersucht werden.

Nachdem sich die xenogenen Testzellen mit den humanen Plättchenantigenen 1a/3a, 1a/ α V und 5b/ β 1 als geeignet für den Nachweis der korrespondierenden Antikörper erwiesen haben, sollte die Sensitivität des Testsystems genauer betrachtet werden (Abbildung 21). In der HPA-Diagnostik sind besonders niedrig-affine anti-HPA-1a Antikörper problematisch, die mit den aktuellen Testverfahren bei der Geburt nicht nachweisbar sind¹⁵⁷. Selbst wenn bei einem Neugeborenen dann ein klinischer Verdacht auf eine FNAIT besteht, kann dieser nicht diagnostisch bestätigt werden. Dass die anti-HPA-1a und anti-HPA-5b Antikörper auch bei 100-facher Verdünnung der Proben noch eindeutig identifiziert werden konnten zeigt, dass das durchflusszytometrische Testsystem extrem sensitiv ist. Die Verdünnung des Plasmas führte zudem zu einer Minimierung unspezifischer Reaktionen mit den Referenzzellen. Da jedoch niedrigtitrige Antikörper bei zu hoher Verdünnung des Plasmas unter Umständen übersehen werden könnten, sollte die Probe, wie es auch in den Standard-Testverfahren üblich ist, unverdünnt bis maximal 1:10 verdünnt für die durchflusszytometrische Untersuchung eingesetzt werden. Weiterhin muss bedacht werden, dass für die eindeutige durchflusszytometrische Trennung der Testzell-Population, an welche der Fluorochromgekoppelte Detektionsantikörper gebunden hat, von den restlichen Panelzellen sowie den parentalen Referenzzellen eine gewisse Menge von Antikörpern auf der Oberfläche der Testzelle gebunden haben muss. Dies gilt für die xenogenen Testzellen genauso wie auch für die primären Testzellen in konventionellen diagnostischen Assays. Die Antigenexpression auf den Testzellen muss demnach hoch genug sein, dass eine detektierbare Menge an Antikörpern pro Zelle gebunden werden kann und eine deutliche Rechtsverschiebung der Population auftritt. Mutmaßlich ist für die Sensitivität des

Testsystems das numerische Verhältnis zwischen den im Reaktionsansatz vorhandenen Antikörpern und Antigenträgern entscheidend. Es kann davon ausgegangen werden, dass eine höhere Antigendichte auf den xenogenen Testzellen ab einem bestimmten Expressionsniveau nicht mehr zwangsläufig von Vorteil im Sinne einer erhöhten Sensitivität ist. Konzeptionell lässt sich das Antigen zu Antikörper Verhältnis durch Erhöhung des Plasmavolumens bzw. Reduktion der Testzelldosis in dem Reaktionsansatz zu Gunsten einer höheren Sensitivität optimieren. Ein gewisses Minimum an Testzellen pro Ansatz sollte dabei allerdings nicht unterschritten werden, um die Validität der Analyse nicht zu gefährden. Dezierte systematische Untersuchungen zu diesem Aspekt der Testentwicklung, sowohl für HPA-Testzellen als auch für die Testzellen mit erythrozytären Blutgruppenantigenen, stehen noch aus.

Aus den hergestellten xenogenen HPA-Testzellen wurde das in Abbildung 22 dargestellte Mini-Testzell-Panel generiert, welches zum Nachweis der FNAIT-verursachenden Antikörper anti-HPA-1a und anti-HPA-5b eingesetzt werden könnte. In allen untersuchten Proben mit vorbeschriebenen HPA-1a Antikörpern konnte das Vorhandensein durch die durchflusszytometrische Analyse bestätigt werden (Tabelle 23). Die zusätzliche Information über die Kreuzreaktivität mit den $\alpha V/\beta 3$ -Testzellen könnte zukünftig für eine Risikobewertung bei gegen HPA-1a immunisierten Schwangeren eingesetzt werden. Während niedrige Thrombozytenkonzentrationen, ausgelöst durch anti-HPA-1a Antikörper, die nur den $\alpha IIb/\beta 3$ -Komplex erkennen, von Neugeborenen meist überraschend gut toleriert werden und teilweise sogar symptomfrei verlaufen, stören Antikörper mit zusätzlicher $\alpha V/\beta 3$ -Reaktivität die Endothelintegrität und können schwerwiegende hämorrhagische Komplikationen verursachen⁹⁰⁻⁹². Von den uns zur Verfügung stehenden Plasmen, bei denen im Rahmen der Abklärung einer FNAIT anti-HPA-1a Antikörper diagnostiziert worden waren, zeigten 60 % eine Kreuzreaktivität mit dem $\alpha V/\beta 3$ -Komplex. Außerdem ergab überraschenderweise die Untersuchung in 5 von 10 Proben einen Hinweis auf das Vorhandensein eines zusätzlichen anti-HPA-5b Antikörpers. Da leider keine weiterführenden Patientendaten verfügbar waren, konnte dies jedoch nicht tiefergehend überprüft werden. Eine Genotypisierung des HPA-5-Merkmals der betreffenden Spenderinnen wäre an dieser Stelle interessant gewesen. Grundsätzlich wird das Vorhandensein mehrerer HPA-spezifischer Antikörper zunehmend beobachtet und ist somit durchaus als plausibel zu betrachten⁷⁵⁻⁷⁷.

Durch die Unabhängigkeit von frisch isolierten humanen Thrombozyten und der Antigenverteilung in der Spenderpopulation könnte das HPA Mini-Testzell-Panel die Diagnose einer FNAIT erheblich vereinfachen und vor allem beschleunigen, was den Einsatz im immunhämatologischen Notfalllabor begünstigen würde. Da Neugeborene mit schwerer Thrombozytopenie postnatal im Idealfall mit Antigen-negativen Thrombozyten versorgt werden sollten, wäre ein zeitnah durchführbares Testverfahren, welches eine unmittelbare Diagnose des zugrundeliegenden Antikörpers ermöglicht, absolut wünschenswert. Außerdem kann auch der schnelle Ausschluss des Vorliegens von anti-HPA Antikörpern bei neonataler Thrombozytopenie informativ sein, da dadurch die Suche nach der Ursache auf andere, nicht-immunologische Diagnosen gelenkt werden kann, welche auch interventionswürdig sind, jedoch einer völlig anderen Therapie bedürfen als die FNAIT. Zusätzlich zu dem HPA Mini-Testzell-Panel könnte eine HPA-Screening Zelllinie hergestellt werden, die alle klinisch relevanten HPA-Merkmale exprimiert. Eine solche Testzelle könnte die HPA Antikörper Diagnostik konzeptionell um ein *Screening Tool* bereichern, welches ein pränatales Schwangerscreening auf anti-HPA Antikörper ermöglichen würde.

4.5 Alternative Anwendung der xenogenen Testzellen: Selektive Depletion panagglutinierender Antikörper

Neben der Verwendung der xenogenen Testzellen zur Identifikation und Spezifikation von Antikörpern besteht weiterhin die Möglichkeit, die generierten Zellen für die spezifische Depletion von Antikörpern einzusetzen, da die Antigenexpression auf den Zellen auf das gewünschte Niveau skaliert werden kann. Diese Anwendung ist besonders bei therapeutischen Antikörpern wie Daratumumab (anti-CD38) oder Magrolimab (anti-CD47), die zu starken Interferenzen in der immunhämatologischen Diagnostik führen, von potentieller Bedeutung. Die ubiquitäre Expression von CD38 und CD47 auf den Test-Erythrozyten verursacht eine Panagglutination, wodurch die differenzielle Agglutination, die zur Diagnostik irregulärer Antikörper herangezogen wird, nicht mehr beobachtet werden kann. Der indirekte Anti-Humanglobulin-Test ist somit bei Patienten, die mit den therapeutischen Antikörpern behandelt wurden, blind. Folglich müssen Blutprodukte ohne Verträglichkeitstestung ausgegeben werden. Eine spezifische Antikörperdepletion kann außerdem von großem Nutzen sein, wenn Antikörper gegen häufige oder hochfrequente Antigene vorliegen. Bereits ein anti-e oder anti-k Antikörper reduziert die Zahl der verbleibenden informativen Test-Erythrozyten auf

1-2 pro Panel und kann einer Identifizierung weiterer Antikörper dadurch im Wege stehen. Allerdings kommen solche Antikörper vergleichsweise sehr selten vor. Die Behandlung mit humanisierten, monoklonalen Antikörpern hingegen kommt bei hämatologischen oder soliden Krebserkrankungen immer häufiger zum Einsatz¹⁵⁸. Viele dieser therapeutischen Antikörper binden Zielantigene, die auch auf Erythrozyten vorhanden sind, was nicht nur zur Agglutination der Test-Erythrozyten im Antikörper-suchtest, sondern auch der Spender-Erythrozyten in der Kreuzprobe führt. Als letzter Schritt in der diagnostischen Kette dient die Kreuzprobe normalerweise dazu, möglicherweise relevante Antikörper vor der Transfusion zu entdecken. Dementsprechend ist es von großem Interesse, die aktuell verfügbaren Testverfahren diesbezüglich zu optimieren oder gegebenenfalls das immunhämatologische Repertoire zu erweitern, um Verzögerungen bei den Laboruntersuchungen zu vermeiden.

Die sicherste und effektivste derzeit verfügbare Transfusionsstrategie bei Patienten, die mit einem monoklonalen anti-CD38 Antikörper wie Daratumumab behandelt wurden, basiert auf einer erweiterten Immunphänotypisierung oder auch Genotypisierung vor Behandlungsbeginn^{31,32,44}, wodurch die Identifikation kompatibler Blutprodukte deutlich vereinfacht wird¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Allerdings wird es nie möglich sein, alle klinisch relevanten Blutgruppenantigene zu berücksichtigen, weshalb Sensibilisierungen also nicht ausgeschlossen werden können. Außerdem ist die Versorgung mit erweitert blutgruppenkompatiblem Blut logistisch herausfordernd und für kleinere Einrichtungen meistens nicht realisierbar. Zusätzlich sind diese Verfahren zeit- und kostenintensiv¹⁶². Derzeit wird Plasma von Patienten unter Daratumumab-Therapie mit DTT-behandelten Test-Erythrozyten auf das Vorhandensein irregulärer Antikörper untersucht. Um das CD38 Antigen auf den Testzellen zu eliminieren, werden die Test-Erythrozyten eines AKS-Panels mit 0,2 M DTT-Lösung inkubiert. Damit das immunhämatologische Labor auch auf spontane Anforderungen von Blutkonserven für Daratumumab-Patienten vorbereitet ist, findet diese ca. zweistündige Aufarbeitung alle zwei Tage statt, danach müssen die DTT-behandelten Panelzellen verworfen werden. Daraus resultiert nicht nur ein zusätzlicher Arbeitsaufwand, sondern auch ein erhöhter Verbrauch an Panelzellen. Ein erheblicher Nachteil der DTT-Methode ist, dass bei der Behandlung der Test-Erythrozyten auch Antigene anderer klinisch relevanter Blutgruppensysteme verloren gehen, insbesondere KEL, DO, JMH, LU, IN und YT⁴². Der wesentliche Vorteil einer prä-analytischen Plasmabehandlung mit Depletionszellen gegenüber der Vorbehandlung der Test-Erythrozyten mit DTT ist somit vor allem, dass die DTT-sensitiven Antigene auf den Test-Erythrozyten nicht beeinflusst werden (siehe

Abbildung 24). Zudem bleibt die Validierung der Test-Erythrozyten und somit auch der Registrierungsstatus des Testpanels bestehen. Ein alternativer Vorschlag zum Umgang mit analytischen Plasmen von Daratumumab-Patienten ist die Vorbehandlung der Test-Erythrozyten mit dem Reagenz DaraEX®, welches mittels Pepsin von Daratumumab abgespaltene F(ab')₂-Fragmente enthält¹⁶³. Die F(ab')₂-Fragmente, die im IAT nicht vom Anti-IgG gebunden werden, besetzen die CD38-Bindungsstellen auf den Erythrozyten, wodurch das Daratumumab nicht mehr mit den Testzellen interferiert¹⁶⁴. Auch die Neutralisation von freiem anti-CD38 Antikörper durch Zugabe von löslichem Antigen wird in Erwägung gezogen³¹. Die Herstellung und Stabilisierung großer Mengen des rekombinanten Membranproteins, die für die Neutralisation der hohen anti-CD38 Plasmakonzentrationen notwendig wären, gestaltet sich allerdings technisch deutlich aufwändiger als die Expression in einer murinen Zelllinie. Außerdem sollte bedacht werden, dass die Zugabe eines Neutralisierungsreagenzes zur Verdünnung der Probe führen kann, wodurch niedrigtitrige irreguläre Antikörper wohlmöglich übersehen werden könnten. Ein potentieller Verdünnungseffekt muss auch bei wiederholten Absorptionszyklen mit den *Darasorb* Zellen in Betracht gezogen werden. Allerdings zeigten unsere Untersuchungen, dass auch sehr schwache Antikörper in den meisten Fällen nach multipler Absorption noch quantitativ wiedergefunden werden konnten (Abbildung 26).

Zum Umgang mit Plasmen von Magrolimab-Patienten wurden bisher keine konkreten Methoden identifiziert. Weder eine Behandlung der Test-Erythrozyten mit DTT noch mit Ficin, Papain, Trypsin oder α -Chymotrypsin konnte die Reaktivität mit den im Patientenplasma enthaltenen anti-CD47 Antikörpern aufheben.¹¹⁴ Als einzige Alternative für die immunhämatologische Diagnostik wird das CAPTURE® System der Firma Immucor diskutiert, welches relativ unempfindlich gegenüber Magrolimab sein sollte, da für die Antikörper-Detektion ein monoklonaler Anti-IgG Antikörper (Gamma-clone®), verwendet wird, der nicht mit Immunglobulinen der Subklasse IgG4 reagiert. Auch Absorptionsstudien mit allogenen Erythrozyten und gepoolten Thrombozyten wurden bereits durchgeführt, wobei nach viermaliger Inkubation eine CD47 Antikörperdepletion erreicht werden konnte¹¹⁴. Allerdings können dabei natürlich auch irreguläre Antikörper absorbiert werden, so dass sich der diagnostische Nutzen nicht unmittelbar erschließt. Eine hochexprimierende xenogene anti-CD47 Depletionszelllinie könnte nicht nur den Erhalt anderer im Plasma enthaltener erythrozytärer oder thrombozytärer Antikörperspezifitäten sicherstellen, sondern den gesamten Arbeitsaufwand erheblich verringern und so das Testverfahren beschleunigen. Die xenogenen Depletionszellen könnten das

konventionelle Antikörperscreening dadurch sinnvoll ergänzen. Weitere Depletionszelllinien, beispielsweise für Antikörper gegen häufige oder hochfrequente Antigene, könnten in ähnlicher Weise erzeugt werden und die immunhämatologische Diagnostik irregulärer Antikörper erheblich erleichtern.

4.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die nicht-humanen Testzellen die humanen Blutgruppenantigene in korrekter Konformation auf ihrer Oberfläche darstellen können und dadurch in der Lage sind, spezifisch und sensitiv irreguläre erythrozytäre, thrombozytäre und granulozytäre Antikörperspezifitäten zu differenzieren. Zusätzlich konnten die xenogenen Zellen für die Abreicherung therapeutischer Antikörper verwendet werden, um panagglutinierende Patientenplasmen für die konventionelle Diagnostik vorzubereiten. Da die aktuellen Testverfahren zur Detektion und Spezifikation irregulärer Antikörper in den meisten Fällen außerordentlich robust und zugleich kostengünstig sind, müssen die diagnostischen Nischen für die xenogenen Testzellen sorgfältig identifiziert werden. Potential besitzt die Technologie vor allem im Hinblick auf die Optimierung der HPA und HNA Antikörperdiagnostik, sowie bei den prä-analytischen Absorptionsreagenzien. Allerdings sind weitere im wesentlichen biotechnologische Entwicklungsschritte erforderlich, um die Technologie flächendeckend für immunhämatologische Labore zugänglich machen zu können. Dies schließt unter anderem die Etablierung von Protokollen für die Langzeitstabilisierung ein. Derzeitig kann durch die Verwendung des kommerziell erhältlichen Stabilisatorreagenzes TransFix® eine Haltbarkeit von mindestens zwei Wochen bei nur geringem Verlust der Wirksamkeit erreicht werden (Abbildung 27). Neben der einfachen Anwendung spricht vor allem die CE-Kennzeichnung für die *in vitro* Diagnostik für die Verwendung dieses Stabilisators. Neben der Fixierung wird auch die Skalierung der Chargengröße entscheidend sein. Während für die Antikörperspezifikation nur 1×10^5 Zellen pro Ansatz benötigt werden, sind für die Depletion von therapeutischen Antikörpern aus Patientenplasmen weitaus größere Zelldosen erforderlich. Die Vergrößerung der Produktionschargen würde nicht nur die Kosten für das Reagenz senken, sondern auch die Qualitätskontrollen und die Produktfreigabe erheblich vereinfachen. Um große Chargen herstellen zu können, ist eine Expansion der xenogenen Zellen in einem Bioreaktor vorgesehen. Damit die Technologie auch für Labore zugänglich wird, die nicht mit einem Durchflusszytometer ausgestattet sind, und

um die Technologie von speziellen Analysegeräten unabhängig zu machen, wäre der nächste entscheidende Entwicklungsdurchbruch die Übertragung des Testsystems auf andere, konventionellere Testformate. Hierfür wäre ein Festphasen-Assay denkbar, welches den herkömmlichen immunhämatologischen Sehgewohnheiten entspricht. Statt eines Fluorochrom-gekoppelten Detektionsantikörpers könnten Anti-human-IgG-beschichtete Indikatorzellen, die mittels Lumineszenz oder über eine Pigmentierung markiert sind, zum Nachweis der irregulären Antikörper verwendet werden. Nicht zuletzt bietet sich die Möglichkeit, auch nicht-hämatopoetische Antigene auf den Zellen darzustellen, wodurch die Technologie auf Anwendungen außerhalb der Immunhämatologie erweitert werden könnte.

5. Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt (Die Gesundheitsberichterstattung des Bundes). Verbrauch von Blutprodukten durch Transfusionen. *Verbrauch von Blutprodukten durch Transfusionen* https://www.gbe-bund.de/gbe/pkg_isgbe5.prc_menu_olap?p_uid=gast&p_aid=9800485&p_sprache=D&p_help=3&p_indnr=687&p_indsp=&p_ityp=H&p_fid= (2021).
2. Telen, M. J., Rosse, W. F., Parker, C. J., Moulds, M. K. & Moulds, J. J. Evidence That Several High-Frequency Human Blood Group Antigens Reside on Phosphatidylinositol-Linked Erythrocyte Membrane Proteins. *Blood* 75, 1404–1407 (1990).
3. Nance, S. *et al.* International rare donor panels: a review. *Vox Sang.* 110, 209–218 (2016).
4. Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie). *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz* 47, 207–207 (2004).
5. ISBT. Table of blood group systems v. 9.0 03-FEB-2021. 2–4 (2021).
6. Reid, M. E. & Mohandas, N. Red Blood Cell Blood Group Antigens: Structure and Function. *Semin. Hematol.* 41, (2004).
7. Westhoff, C. M. The Structure and Function of the Rh Antigen Complex. *Semin. Hematol.* 44, (2007).
8. Huang, C. H., Liu, P. Z. & Cheng, J. G. Molecular biology and genetics of the Rh blood group system. *Semin. Hematol.* 37, (2000).
9. Avent, N. D. & Reid, M. E. The Rh blood group system: A review. *Blood* vol. 95 (2000).
10. Wagner, F. F. & Flegel, W. A. RHD gene deletion occurred in the Rhesus box. *Blood* 95, (2000).
11. Reid, M. E., Lomas-Francis, C. & Olsson, M. L. The Blood Group Antigen. The Blood Group Antigen. *Elsevier Ltd*, (2012).
12. Flegel, W. A. & Wagner, F. F. Molecular biology of partial D and weak D: Implications for blood bank practice. *Clinical Laboratory* vol. 48 (2002).

13. Tippett, P., Lomas-Francis, C. & Wallace, M. The Rh antigen D: Partial D antigens and associated low incidence antigens. *Vox Sanguinis* vol. 70 (1996).
14. Flegel, W. A. Molecular genetics of RH and its clinical application: Génétique moléculaire sur système RH et ses applications cliniques. *Transfus. Clin. Biol.* 13, 4–12 (2006).
15. Cherif-Zahar, B. *et al.* Molecular cloning and protein structure of a human blood group Rh polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, (1990).
16. Ridgwell, K. *et al.* Isolation of cDNA clones for a 50 kDa glycoprotein of the human erythrocyte membrane associated with Rh (Rhesus) blood-group antigen expression. *Biochem. J.* 287, (1992).
17. Avent, N. D. *et al.* Immunochemical analysis of the human erythrocyte Rh polypeptides. *J. Biol. Chem.* 271, (1996).
18. Conroy, M. J., Bullough, P. A., Merrick, M. & Avent, N. D. Modelling the human rhesus proteins: Implications for structure and function. *Br. J. Haematol.* 131, (2005).
19. Bruce, L. J. *et al.* A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane. *Blood* 101, (2003).
20. Mouro, I. *et al.* Molecular basis of the RhCW (Rh8) and RhCX (Rh9) blood group specificities. *Blood* 86, (1995).
21. Nicolas, V. *et al.* Functional interaction between Rh proteins and the spectrin-based skeleton in erythroid and epithelial cells. *Transfus. Clin. Biol.* 13, (2006).
22. Coombs, R. R. A., Mourant, A. E. & Race, R. R. Detection of weak and 'incomplete' rh agglutinins: a new test. *Lancet* 246, (1945).
23. Coombs, R. R. A., Mourant, A. E. & Race, R. R. A new test for the detection of weak and incomplete Rh agglutinins. *Br. J. Exp. Pathol.* 26, (1945).
24. Pogo, A. O. & Chaudhuri, A. The Duffy protein: A malarial and chemokine receptor. *Semin. Hematol.* 37, (2000).
25. Iwamoto, S., Omi, T., Kajii, E. & Ikemoto, S. Genomic organization of the glycoprotein D gene: Duffy blood group Fya/Fyb alloantigen system is associated with a polymorphism at the 44- amino acid residue. *Blood* 85, (1995).

26. MALLINSON, G., Soo, K. S., Schall, T. J., Pisacka, J. M. & Anstee, D. J. Mutations in the erythrocyte chemokine receptor (Duffy) gene: the molecular basis of the Fya/Fyb antigens and identification of a deletion in the Duffy gene of an apparently healthy individual with the Fy(a – b–) phenotype. *Br. J. Haematol.* 90, (1995).
27. Tournamille, C., Le Van Kim, C., Gane, P., Cartron, J. P. & Colin, Y. Molecular basis and PCR-DNA typing of the Fya/fyb blood group polymorphism. *Hum. Genet.* 95, (1995).
28. Neote, K., Mak, J. Y., Kolakowski, L. F. & Schall, T. J. Functional and biochemical analysis of the cloned Duffy antigen: Identity with the red blood cell chemokine receptor. *Blood* 84, (1994).
29. Kulkarni, H. *et al.* The Duffy-null state is associated with a survival advantage in leukopenic HIV-infected persons of African ancestry. *Blood* 114, (2009).
30. Ramsuran, V. *et al.* Duffy-null-associated low neutrophil counts influence HIV-1 susceptibility in high-risk South African black women. *Clin. Infect. Dis.* 52, (2011).
31. Chapuy, C. I. *et al.* Resolving the daratumumab interference with blood compatibility testing. *Transfusion* 55, (2015).
32. Oostendorp, M. *et al.* When blood transfusion medicine becomes complicated due to interference by monoclonal antibody therapy. *Transfusion* 55, (2015).
33. McKeage, K. Daratumumab: First Global Approval. *Drugs* 76, (2016).
34. Dhillon, S. Isatuximab: First Approval. *Drugs* 80, (2020).
35. Lin, P., Owens, R., Tricot, G. & Wilson, C. S. Flow Cytometric Immunophenotypic Analysis of 306 Cases of Multiple Myeloma. *Am. J. Clin. Pathol.* 121, (2004).
36. Santonocito, A. M. *et al.* Flow cytometric detection of aneuploid CD38++ plasmacells and CD19+ B-lymphocytes in bone marrow, peripheral blood and PBSC harvest in multiple myeloma patients. *Leuk. Res.* 28, (2004).
37. Albeniz, I. *et al.* Erythrocyte CD38 as a prognostic marker in cancer. *Hematology* 12, 409–414 (2007).
38. Mehta, K., Shahid, U. & Malavasi, F. Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions. *FASEB J.* 10, 1408–1417 (1996).

39. Zocchi, E. *et al.* A Single Protein Immunologically Identified as CD38 Displays NAD⁺ Glycohydrolase, ADP-Ribosyl Cyclase and Cyclic ADP-Ribose Hydrolase Activities at the Outer Surface of Human Erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196, 1459–1465 (1993).
40. NV, J.-C. I. *Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels DARZALEX.* (2016).
41. Tzogani, K. *et al.* EMA Review of Daratumumab for the Treatment of Adult Patients with Multiple Myeloma. *Oncologist* 23, (2018).
42. Chapuy, C. I. *et al.* International validation of a dithiothreitol (DTT)-based method to resolve the daratumumab interference with blood compatibility testing. *Transfusion* 56, (2016).
43. Bub, C. B. Dithiothreitol treatment of red blood cells. *Immunohematology* vol. 33 (2017).
44. Quach, H. *et al.* Considerations for pre-transfusion immunohaematology testing in patients receiving the anti-CD38 monoclonal antibody daratumumab for the treatment of multiple myeloma. *Intern. Med. J.* 48, (2018).
45. Zhang, W. *et al.* Advances in Anti-Tumor Treatments Targeting the CD47/SIRP α Axis. *Frontiers in Immunology* vol. 11 (2020).
46. Lalezari, P. & Bernard, G. E. Identification of a Specific Leukocyte Antigen: Another Presumed Example of 5b. *Transfusion* 5, (1965).
47. Flesch, B. K., Curtis, B. R., De Haas, M., Lucas, G. & Sachs, U. J. Update on the nomenclature of human neutrophil antigens and alleles. *Transfusion* vol. 56 (2016).
48. Bux, J. Nomenclature of Granulocyte Alloantigens. Short Report. ISBT Working Party on Platelet and Granulocyte Serology, Granulocyte Antigen Working Party1. *Vox Sang.* 77, (1999).
49. Storch, E. K., Hillyer, C. D. & Shaz, B. H. Spotlight on pathogenesis of TRALI: HNA-3a (CTL2) antibodies. *Blood* 124, (2014).
50. Bux, J. & Chapman, J. Report on the Second International Granulocyte Serology Workshop. in *Transfusion* vol. 37 (1997).

51. Nguyen, X. D., Dengler, T., Schulz-Linkholt, M. & Klüter, H. A novel tool for high-throughput screening of granulocyte-specific antibodies using the automated flow cytometric granulocyte immunofluorescence test (Flow-GIFT). *ScientificWorldJournal*. 11, (2011).
52. Simtong, P. *et al.* Improvement of monoclonal antibody–immobilized granulocyte antigen assay for the detection of anti-HNA-1 alloantibodies. *Transfusion* 58, (2018).
53. Nguyen, X. D., Scherpf, R., Sassenhof, F., Flesch, B. & Klüter, H. Detection of granulocyte antibodies using simultaneous analysis of specific granulocyte antibodies assay (SASGA). *Vox Sang.* 101, (2011).
54. Bux, J. Challenges in the determination of clinically significant granulocyte antibodies and antigens. *Transfus. Med. Rev.* 10, (1996).
55. Boxer, L. A., Greenberg, M. S., Boxer, G. J. & Stossel, T. P. Autoimmune Neutropenia. *N. Engl. J. Med.* 293(15), 748–53 (1995).
56. Lalezari, P., Jiang, A.-F., Yegen, L. & Santorineou, M. Chronic Autoimmune Neutropenia Due to Anti-NA2 Antibody. *N. Engl. J. Med.* 293, (1975).
57. Farruggia, P. & Dufour, C. Diagnosis and management of primary autoimmune neutropenia in children: Insights for clinicians. *Therapeutic Advances in Hematology* vol. 6 (2015).
58. BUX, J., Jung, K. D., Kauth, T. & Mueller-Eckhardt, C. Serological and clinical aspects of granulocyte antibodies leading to alloimmune neonatal neutropenia. *Transfus. Med.* 2, (1992).
59. Lalezari, P., Nussbaum, M., Gelman, S. & Spaet, T. H. Neonatal Neutropenia Due to Maternal Isoimmunization. *Blood* 15, (1960).
60. Porcelijn, L. & De Haas, M. Neonatal Alloimmune Neutropenia. *Transfus. Med. Hemotherapy* 45, 311–316 (2018).
61. Bux, J. Transfusion-related acute lung injury (TRALI): A serious adverse event of blood transfusion. *Vox Sanguinis* vol. 89 (2005).

62. Klumpp, T. R., Herman, J. H., Schnell, M. K., Goldberg, S. L. & Mangan, K. F. Association between antibodies reactive with neutrophils, rate of neutrophil engraftment, and incidence of post-engraftment neutropenia following BMT. *Bone Marrow Transplant.* 18, (1996).
63. Reil, A., Sachs, U. J., Siahianidou, T., Flesch, B. K. & Bux, J. HNA-1d: A new human neutrophil antigen located on Fcγ receptor IIIb associated with neonatal immune neutropenia. *Transfusion* 53, (2013).
64. Bux, J. *et al.* Characterization of a new alloantigen (SH) on the human neutrophil fcyreceptor IIIb. *Blood* 89, (1997).
65. Huizinga, T., Kleijer, M., Tetteroo, P., Roos, D. & von dem Borne, A. Biallelic neutrophil Na-antigen system is associated with a polymorphism on the phosphoinositol-linked Fc gamma receptor III (CD16). *Blood* 75, (1990).
66. Ravetch, J. V. & Perussia, B. Alternative membrane forms of FcγRIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J. Exp. Med.* 170, (1989).
67. Ravetch, J. V. & Kinet, J. P. Fc receptors. *Annual Review of Immunology* vol. 9 (1991).
68. Chu, H. T. *et al.* Genotyping of human neutrophil antigens (HNA) from whole genome sequencing data. *BMC Med. Genomics* 6, (2013).
69. Flesch, B. K. & Reil, A. Molecular Genetics of the Human Neutrophil Antigens. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* vol. 45 (2018).
70. Borne, A. E. G. vo. dem & Decary, F. Nomenclature of platelet-specific antigens. *Transfusion* vol. 30 (1990).
71. Santoso, S. & Kiefel, V. Human platelet-specific alloantigens: Update. in *Vox Sanguinis* vol. 74 (1998).
72. Versiti. HPA Database. <https://www.versiti.org/hpa> (2020).
73. Novotny, V. M. J. Prevention and management of platelet transfusion refractoriness. *Vox Sanguinis* vol. 76 (1999).
74. Kaplan, C. Le purpura post-transfusionnel. *Hematologie* vol. 12 (2006).

75. Mueller-Eckhardt, C. *et al.* 348 cases of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia. *The Lancet* vol. 333 (1989).
76. Kroll, H., Yates, J. & Santoso, S. Immunization against a low-frequency human platelet alloantigen in fetal alloimmune thrombocytopenia is not a single event: Characterization by the combined use of reference DNA and novel allele-specific cell lines expressing recombinant antigens. *Transfusion* 45, (2005).
77. Davoren, A., Curtis, B. R., Aster, R. H. & McFarland, J. G. Human platelet antigen-specific alloantibodies implicated in 1162 cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion* 44, (2004).
78. Curtis, B. R. & Mcfarland, J. G. Human platelet antigens - 2013. *Vox Sang.* 106, (2014).
79. Kiefel, V. Transfusionsmedizin und Immunhämatologie. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie* (2011).
80. Kamphuis, M. M. *et al.* Screening in pregnancy for fetal or neonatal alloimmune thrombocytopenia: Systematic review. *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* 117, (2010).
81. Winkelhorst, D. & Oepkes, D. Foetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology* vol. 58 (2019).
82. Kamphuis, M. M., Paridaans, N. P., Porcelijn, L., Lopriore, E. & Oepkes, D. Incidence and consequences of neonatal alloimmune thrombocytopenia: A systematic review. *Pediatrics* vol. 133 (2014).
83. Vadasz, B. *et al.* Platelets and plateletalloantigens: Lessons from human patients and animal models of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Genes Dis.* 2, 173–185 (2015).
84. Blanchette, V. S., Johnson, J. & Rand, M. The management of alloimmune neonatal thrombocytopenia. *Bailliere's Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 13, (2000).
85. Chen, P. *et al.* Animal model of fetal and neonatal immune thrombocytopenia: Role of neonatal Fc receptor in the pathogenesis and therapy. *Blood* 116, (2010).

86. Lieberman, L. *et al.* Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: recommendations for evidence-based practice, an international approach. *Br. J. Haematol.* 185, (2019).
87. Kjeldsen-Kragh, J. Foetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia—A rare, potentially serious and often underdiagnosed bleeding condition. *Transfusion and Apheresis Science* vol. 59 (2020).
88. Kiefel, V., Santoso, S., Weisheit, M. & Mueller-Eckhardt, C. Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): A new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood* 70, (1987).
89. de Vos, T. W., Winkelhorst, D., de Haas, M., Lopriore, E. & Oepkes, D. Epidemiology and management of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion and Apheresis Science* vol. 59 (2020).
90. Sachs, U. J. & Santoso, S. Antiendothelial α v β 3 antibodies as a major cause of intracranial bleeding in FNAIT. *Vox Sang.* 112, (2017).
91. Santoso, S. *et al.* Antiendothelial α v β 3 Antibodies Are a Major Cause of Intracranial Bleeding in Fetal/Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 36, (2016).
92. Sachs, U. J. Prospects for risk stratification of anti-HPA-1a alloimmunized pregnant women. *Transfusion and Apheresis Science* vol. 59 (2020).
93. Saiki, R. K. *et al.* Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* (80-.). 239, (1988).
94. Weber, K., Bartsch, U., Stocking, C. & Fehse, B. A multicolor panel of novel lentiviral 'gene ontology' (LeGO) vectors for functional gene analysis. *Mol. Ther.* 16, (2008).
95. Sanjana, N. E., Shalem, O. & Zhang, F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nature Methods* vol. 11 (2014).
96. Shalem, O. *et al.* Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* (80-.). 343, (2014).
97. Jeong, J. Y. *et al.* One-step sequence-and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics Studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, (2012).

98. Singer, D., Cooper, M., Maniatis, G. M., Marks, P. A. & Rifkind, R. A. Erythropoietic differentiation in colonies of cells transformed by Friend virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71, (1974).
99. Watanabe, T., Kondo, K. & Oishi, M. Induction of in Vitro Differentiation of Mouse Erythroleukemia Cells by Genistein, an Inhibitor of Tyrosine Protein Kinases. *Cancer Res.* 51, (1991).
100. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, (1977).
101. Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L. & Baltimore, D. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, (1993).
102. Canonico, B. *et al.* Flow cytometric profiles, biomolecular and morphological aspects of transfixed leukocytes and red cells. *Cytom. Part B - Clin. Cytom.* 78, (2010).
103. Sandner, N. Entwicklung eines neuartigen Durchflusszytometrie-basierten Systems zum Nachweis humaner Antikörper gegen Neutrophilen-Blutgruppenantigene am Beispiel des Blutgruppenmerkmals HNA-1. (Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, 2019).
104. Ehrend, E. *et al.* Preanalytic depletion of medicinal anti-CD38 antibody from patient plasma for immunohematology testing. *Blood* 138, 814–817 (2021).
105. Brecher, M. E. *Technical Manual Program Unit.* (AABB, 2005).
106. Datta, S. S., Mukherjee, S., Bhattacharya, P. & Mukherjee, K. Anti-JK-a antibody in a case of SLE patient with Plasmodium falciparum malaria infection. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* 29, (2013).
107. Giovannetti, G. *et al.* Severe warm autoimmune haemolytic anaemia due to anti-Jka autoantibody associated with Parvovirus B19 infection in a child. *Blood Transfusion* vol. 11 (2013).
108. Use, I. F. O. R. TansFix Cellular Antigen Stabilising Reagent. <https://www.cytomark.co.uk/transfix/> (2020).

109. Olsson, M., Bruhns, P., Frazier, W. A., Ravetch, J. V. & Oldenborg, P. A. Platelet homeostasis is regulated by platelet expression of CD47 under normal conditions and in passive immune thrombocytopenia. *Blood* 105, (2005).
110. Oldenborg, P. A. *et al.* Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* (80-.). 288, (2000).
111. Mouro-Chanteloup, I. *et al.* Evidence that the red cell skeleton protein 4.2 interacts with the Rh membrane complex member CD47. *Blood* 101, (2003).
112. Dahl, K. N., Westhoff, C. M. & Discher, D. E. Fractional attachment of CD47 (IAP) to the erythrocyte cytoskeleton and visual colocalization with Rh protein complexes. *Blood* 101, (2003).
113. Agoram, B. *et al.* Pharmacokinetics of Hu5F9-G4, a first-in-class anti-CD47 antibody, in patients with solid tumors and lymphomas. *J. Clin. Oncol.* 36, 2525 (2018).
114. Velliquette, R. W. *et al.* Monoclonal anti-CD47 interference in red cell and platelet testing. *Transfusion* 59, (2019).
115. Samsel, R. W. & Perelson, A. S. Kinetics of rouleau formation. I. A mass action approach with geometric features. *Biophys. J.* 37, (1982).
116. Samsel, R. W. & Perelson, A. S. Kinetics of rouleau formation. II. Reversible reactions. *Biophys. J.* 45, (1984).
117. Fabry, T. L. Mechanism of erythrocyte aggregation and sedimentation. *Blood* 70, (1987).
118. Bain, B. J. Diagnostic Pathology Blood and Bone Marrow, Second Edition. FoucarK, Chabot-RichardsD, CzuchlewskiDR, KarnerKH, ReichardKK, VasefMA, WilsonCS, ZhangQ-Y and CulbreathK. Elsevier: Philadelphia; 2018. ISBN 978-0-323-39254-9. *Br. J. Haematol.* 190, (2020).
119. Trometer, C. & Falson, P. Mammalian membrane protein expression in baculovirus-infected insect cells. *Methods Mol. Biol.* 601, (2010).
120. Kosmoliaptsis, V., O'Rourke, C., Bradley, J. A. & Taylor, C. J. Improved Luminex-based human leukocyte antigen-specific antibody screening using dithiothreitol-treated sera. *Hum. Immunol.* 71, (2010).

121. In, J. W., Rho, E. Y., Shin, S., Park, K. U. & Song, E. Y. False-positive reactions against HLA class II molecules detected in luminex single-antigen bead assays. *Annals of Laboratory Medicine* vol. 34 (2014).
122. Chow, P. K. *et al.* Antibody against compound antigen ce (f). *JHKMTA* 7, 19–21. (1997/98).
123. An, X., Schulz, V. P., Mohandas, N. & Gallagher, P. G. Human and murine erythropoiesis. *Current Opinion in Hematology* vol. 22 (2015).
124. Pasini, E. M. *et al.* Deep Coverage Mouse Red Blood Cell Proteome: A First Comparison with the Human Red Blood Cell. *Mol. Cell. Proteomics* 7, (2008).
125. Balabanian, K. *et al.* The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 280, (2005).
126. Gautier, E. F. *et al.* Comprehensive proteomic analysis of murine terminal erythroid differentiation. *Blood Adv.* 4, (2020).
127. Wurm, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology* vol. 22 (2004).
128. Novotny, A. Use of trypsin in serologic investigation. *Immunohematology* vol. 35 (2020).
129. Marini, A. M. *et al.* The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast. *Nat. Genet.* 26, (2000).
130. Westhoff, C. M., Ferreri-Jacobia, M., Mak, D. O. D. & Kevin Foskett, J. Identification of the erythrocyte Rh blood group glycoprotein as a mammalian ammonium transporter. *J. Biol. Chem.* 277, (2002).
131. Benjelloun, F. *et al.* Expression of the human erythroid Rh glycoprotein (RhAG) enhances both NH₃ and NH₄⁺ transport in HeLa cells. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 450, (2005).
132. Westhoff, C. M., Schultze, A., From, A., Wylie, D. E. & Silberstein, L. E. Characterization of the mouse Rh blood group gene. *Genomics* 57, (1999).
133. Yamamoto, M. *et al.* Murine Equivalent of the Human Histo-blood Group ABO Gene Is a cis-AB Gene and Encodes a Glycosyltransferase with Both A and B Transferase Activity. *J. Biol. Chem.* 276, (2001).

134. Hossler, P., Khattak, S. F. & Li, Z. J. Optimal and consistent protein glycosylation in mammalian cell culture. *Glycobiology* vol. 19 (2009).
135. Butler, M. & Spearman, M. The choice of mammalian cell host and possibilities for glycosylation engineering. *Current Opinion in Biotechnology* vol. 30 (2014).
136. Wang, Q., Yin, B., Chung, C. Y. & Betenbaugh, M. J. Glycoengineering of CHO cells to improve product quality. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1603 (2017).
137. Schimmel, V. Methodenentwicklung zur durchflusszytometrischen Detektion irregulärer Blutgruppenantikörper im MNS-System. (Dissertation, Goethe Universität Frankfurt am Main, 2021).
138. Desruelles, L. Flow cytometry-based innovative system for detection, specification and depletion of human antibodies in the Kidd blood group system. (Bachelorarbeit, Goethe University Frankfurt am Main, 2021).
139. Li, M. S. Durchflusszytometrie-basiertes, innovatives System für Nachweis und Depletion von Humanantikörpern im Kell-Blutgruppensystem. (Dissertation, Goethe Universität Frankfurt am Main, unveröffentlicht).
140. Narimatsu, Y. *et al.* An Atlas of Human Glycosylation Pathways Enables Display of the Human Glycome by Gene Engineered Cells. *Mol. Cell* 75, (2019).
141. Simtong, P., Puapairoj, C., Leelayuwat, C., Santoso, S. & Romphruk, A. V. Assessment of HNA alloimmunisation risk in Northeastern Thais, Burmese and Karen. *Transfus. Med.* 28, (2018).
142. Curtis, B. R., Reno, C. & Aster, R. H. Neonatal alloimmune neutropenia attributed to maternal immunoglobulin G antibodies against the neutrophil alloantigen HNA-1c (SH): A report of five cases. *Transfusion* 45, (2005).
143. Gramatges, M. M., Fani, P., Nadeau, K., Pereira, S. & Jeng, M. R. Neonatal alloimmune thrombocytopenia and neutropenia associated with maternal human leukocyte antigen antibodies. *Pediatr. Blood Cancer* 53, (2009).
144. Reil, A. & Bux, J. Nachweis von granulozytären Antigenen und Antikörpern. in *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie* (2010).
145. Chun, H., Cipolone, K., Procter, J. & Stroncek, D. F. Granulocyte storage and antigen stability. *Transfusion* 39, (1999).

146. Shander, A. *et al.* Patient blood management in Europe. *British Journal of Anaesthesia* vol. 109 (2012).
147. Meybohm, P. *et al.* Patient Blood Management Bundles to Facilitate Implementation. *Transfusion Medicine Reviews* vol. 31 (2017).
148. Mueller, M. M. *et al.* Patient Blood Management: Recommendations from the 2018 Frankfurt Consensus Conference. in *JAMA - Journal of the American Medical Association* vol. 321 (2019).
149. Li, Y., Mair, D. C., Schuller, R. M., Li, L. & Wu, J. Genetic Mechanism of Human Neutrophil Antigen 2 Deficiency and Expression Variations. *PLoS Genet.* 11, (2015).
150. Wagner, C. L. *et al.* Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood* 88, (1996).
151. Fischer, T. H. *et al.* Thrombus formation with rehydrated, lyophilized platelets. *Hematology* 7, (2002).
152. Bennett, J. S., Chan, C., Vilaire, G., Mousa, S. A. & Degrado, W. F. Agonist-activated $\alpha\beta_3$ on platelets and lymphocytes binds to the matrix protein osteopontin. *J. Biol. Chem.* 272, (1997).
153. K. Poddar, M. & Banerjee, S. Molecular Aspects of Pathophysiology of Platelet Receptors. in *Platelets* (2020).
154. Janus-Bell, E. *et al.* Characterization of the Role of Integrin $\alpha_5\beta_1$ in Platelet Function, Hemostasis, and Experimental Thrombosis. *Thromb. Haemost.* (2021)
155. Schaff, M. *et al.* Integrin $\alpha_6\beta_1$ is the main receptor for vascular laminins and plays a role in platelet adhesion, activation, and arterial thrombosis. *Circulation* 128, (2013).
156. Socher, I., Zwingel, C., Santoso, S. & Kroll, H. Heterogeneity of HPA-3 alloantibodies: Consequences for the diagnosis of alloimmune thrombocytopenic syndromes. *Transfusion* 48, (2008).
157. Peterson, J. A. *et al.* Prevalence and clinical significance of low-avidity HPA-1a antibodies in women exposed to HPA-1a during pregnancy. *Transfusion* 53, (2013).

158. Liossis, S. N. C. & Tsokos, G. C. Monoclonal antibodies and fusion proteins in medicine. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* vol. 116 (2005).
159. Fun Yi Lau *et al.* Provision of phenotype-matched blood units: No need for pre-transfusion antibody screening. *Haematologica* 86, (2001).
160. Flegel, W. A., Gottschall, J. L. & Denomme, G. A. Integration of red cell genotyping into the blood supply chain: A population-based study. *Lancet Haematol.* 2, (2015).
161. Anstee, D. J. Red cell genotyping and the future of pretransfusion testing. *Blood* vol. 114 (2009).
162. Anani, W. Q. *et al.* Practical approaches and costs for provisioning safe transfusions during anti-CD38 therapy. *Transfusion* 57, (2017).
163. Schneeweiß, C., Grüger, D. & Heuft, H.-G. DaraEx verhindert Daratumumab-Interferenz im indirekten Antihumanglobulintest. *Transfusionsmedizin - Immunhämatologie, Hämotherapie, Immungenetik, Zelltherapie* 7, (2017).
164. Tenorio, M. *et al.* Validation of Daraex to Resolve Daratumumab-Induced Interferences in Pre-Transfusion Screen Tests. *Blood* 134, (2019).

6. Abkürzungsverzeichnis

A	AKS	Antikörpersuchtest
	Amp	Ampicillin-Natriumsalz
	AmpR	Ampicillin-Resistenzgen
	Anti-IgG	Anti-Humanglobulin
	APC	Allophycocyanin
	AS	Aminosäure
B	BSA	Bovines Serumalbumin
	bp	Basenpaare
	bzw.	beziehungsweise
C	C3d	dritten Komplementkomponente
	ca.	circa
	CD	<i>Cluster of differentiation</i>
	CDS	codierende Sequenz
	cDNA	<i>complementary DNA</i>
	CE	<i>Communauté Européenne</i>
	CHE	Schweiz
	CHO	Chinesische Hamster Ovarialzellen
	CO	Colton
	cPPT	zentraler Polypurintrakt
	CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
D	DARA	Daratumumab
	DAT	Direkter Anti-Humanglobulin-Test
	DARC	Duffy-Antigen-Rezeptor für Chemokine
	DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
	DMSO	Dimethylsulfoxid
	DNA	Desoxyribonukleinsäure
	dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
	DO	Dombrock
	DPBS	<i>Dulbecco's Phosphat Buffered Saline</i>
	DTT	Dithiothreitol
E	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
	ect.	<i>et cetera</i>
	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
	EFS	Elongationsfaktor-1 α Kurzpromotor

	eGFP	<i>enhanced GFP</i>
	EK	Erythrozytenkonzentrat
	<i>et al.</i>	<i>et alia</i>
F	F(ab') ₂	<i>fragment antigen binding</i>
	FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
	Fc	kristallisierbares Fragment
	FcRn	neonataler Fc-Rezeptor
	FCS	Fötales Kälberserum
	FSC	<i>Forward Scatter</i>
	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
	FNAIT	Fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie
	FY	Duffy
G	GAT	Granulozyten-Agglutinationstests
	GER	<i>Germany</i>
	GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
	GIFT	Granulozyten-Immunfluoreszenztest
	GP	Glykoprotein
	GPA	Glykophorin A
	GPB	Glykophorin B
	GPI	Glykosylphosphatidyl-inositol
	gRNA	<i>guide RNA</i>
H	h	human
	H ₂ O	Wasser
	H-Substanz	Heterogenetischen Substanz
	HCl	Chlorwasserstoff
	HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
	HF	<i>High Fidelity</i>
	HLA	Humanes Leukozytenantigen
	HNA	Humanes Neutrophilenantigen
	HPA	Humanes Plättchenantigen
I	IAT	Indirekter Anti-Humanglobulin-Test
	IgG	Immunglobulin-G
	IgM	Immunglobulin-M
	IN	Indian
	IRES	Interne ribosomale Eintrittsstelle

	ISBT	<i>International Society of Blood Transfusion</i>
	ITP	Immunthrombozytopenie
J	JK	Kidd
	JMH	John Milton Hagen
	JPN	Japan
K	KCl	Kaliumchlorid
	KEL	Kell
L	LB	<i>Lysogeny broth</i>
	LE	Lewis
	LeGO	<i>Lentiviral Gene Ontology</i>
	LTR	<i>Long terminal repeat</i>
	LU	Lutheran
	LW	Landsteiner-Wiener
M	m	murin
	MAIGA	Monoklonale Antikörper-Immobilisierung von Granulozytenantigenen
	MAIPA	Monoklonaler Antikörper-spezifischer Immobilisationstest für Plättchen-spezifische Antigene
	MCS	<i>Multiple cloning site</i>
	MEL	<i>Murine erythroleukaemia</i>
	MFI	Mediane Fluoreszenzintensität
	MHN	<i>Morbus haemolyticus neonatorum</i>
	mRNA	<i>messenger RNA</i>
N	NaCl	Natriumchlorid
	NEB	<i>New England Biolabs</i>
	NIN	Neonatale Immunneutropenien
O	OLR	Offener Leserahmen
P	P	P1PK
	P2A	2A selbstspaltendes Peptid
	PAM	<i>Protospacer adjacent motif</i>
	PBM	<i>Patient Blood Management</i>
	PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
	PE	Polyethylen
	PEI	Polyethylenimin
	Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
	PNK	Polynukleotid Kinase

	PTP	Posttransfusionelle Purpura
	Puro	Puromycin
	PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	qRT	quantitative <i>real time</i>
R	RBC	<i>Red blood cell</i> , Erythrozyt
	Rh / RH	Rhesus
	RhAG / RHAG	Rhesus-assoziierten Glykoprotein
	RNA	Ribonukleinsäure
	RNase	Ribonuklease
	RPMI	<i>Rosewell Park Memorial Institute-1640</i> Medium
	RRE	<i>Rev response</i> Element
S	SASGA	Simultane Analyse von spezifischen Granulozytenantikörpern
	SFFV	<i>Spleen focus-forming virus</i>
	sgRNA	<i>single guide</i> RNA
	SIN	Selbst-inaktivierend
	SLIC	<i>sequence- and ligation-independent cloning</i>
	SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
	SpCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9
	SSC	<i>Side Scatter</i>
	SSP	Sequenzspezifische Primer
T	TAE	TRIS-Acetat-EDTA
	Test-RBCs	Test-Erythrozyten
	TK	Thrombozytenkonzentrat
	TRALI	Transfusions-assoziierte akute Lungeninsuffizienz
	TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	USA	United States of America
	UV	Ultraviolett
V	V	Volt
	VSV-G	<i>Vesicular stomatitis virus G</i>
	vWF	von Willebrand Faktor
W	wPRE	Woodchuck Hepatitis Virus post-transkriptionales regulatorisches Element
Y	YT	Cartwright
Z	z. B.	zum Beispiel

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung relevanter Blutgruppensystemen auf der Membran humaner Erythrozyten.....	6
Abbildung 2: Das Rh Blutgruppensystem als Teil eines Makroproteinkomplexes in der Erythrozyten-Membran.....	8
Abbildung 3: Schematisches Prinzip des indirekten Anti-Humanglobulin-Tests zum Nachweis erythrozytärer Antikörper mit der Gelkarten-Technik und Bewertung des Schweregrades der Agglutinationsreaktion.....	11
Abbildung 4: Schematische Darstellung des neuen immunhämatologischen Testsystems und Nachweis des Prinzips am Beispiel des Duffy (FY) Blutgruppensystems.	15
Abbildung 5: Alternative Verwendung der xenogenen Zellen zur spezifischen Depletion von Antikörpern.....	16
Abbildung 6: Interferenz monoklonaler anti-CD38 Antikörper im indirekten Anti-Humanglobulin-Test und therapeutisches Behandlungsschema des Medikaments.....	18
Abbildung 7: Schematische Darstellung des HNA-1 Glykoproteins in der Membran neutrophiler Granulozyten.....	21
Abbildung 8: Alloantigene auf humanen Thrombozyten.....	23
Abbildung 9: Entstehung einer fetalen/neonatalen Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT).....	24
Abbildung 10: Aufbau eines LeGO Vektors der dritten Generation für die cDNA Expression.....	39
Abbildung 11: Aufbau des lentiCRISPRv2 Vektors zur Co-Expression von <i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9 und einer <i>single guide</i> RNA.....	40
Abbildung 12: Amplifikation der Signalintensität zur Detektion humaner Antikörper..	51
Abbildung 13: Allgemeine <i>Gating</i> Strategie zur Differenzierung der Zellen nach Expression des fluoreszierenden Marker-Proteins.	52
Abbildung 14: Lineare Regression zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Antigendichte auf der Zelloberfläche.....	53
Abbildung 15: Testzell-Panel zum Nachweis und zur Spezifikation von Antikörpern gegen Antigene des Rh Blutgruppensystems.....	56

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 16: Nachweis der murinen RhD Expression in MEL-745A Zellen und Homologieanalyse zwischen murinen und humanen Rh Proteinen....	58
Abbildung 17: Sequenzanalyse des murinen RhD Blutgruppenantigens in MEL-745A Zellen.	60
Abbildung 18: Testpanel zur Detektion und Spezifikation von Antikörpern gegen HNA-1.....	62
Abbildung 19: Oberflächenexpression humaner, thrombozytärer Glykoproteine.....	65
Abbildung 20: Expression von natürlichen und nicht-natürlichen HPA-Varianten auf xenogenen Testzellen zur Spezifikation von anti-HPA Antikörpern.	67
Abbildung 21: Sensitivität der xenogenen Testzellen zur Prüfung der Empfindlichkeit des Testsystems.	69
Abbildung 22: Generierung eines HPA Mini-Testzell-Panels zur Detektion der klinisch relevanten anti-HPA-1a und anti-HPA-5b Antikörper.	71
Abbildung 23: Schematischer Überblick und Charakterisierung der <i>Darasorb</i> Zellen.	75
Abbildung 24: Depletion von anti-CD38 Antikörpern aus Patientenplasma mit <i>Darasorb</i> Zellen.	77
Abbildung 25: Ausschluss weiterer Panagglutinine in Patientenplasmaproben, die nach zwei <i>Darasorb</i> Depletionszyklen weiterhin panagglutinierend waren.....	78
Abbildung 26: Erhalt der Antikörper-Reaktivität nach Abreicherung von anti-CD38 Antikörpern aus Patientenplasma mit <i>Darasorb</i> Zellen.....	83
Abbildung 27: Depletion von anti-CD38 Antikörpern mit stabilisierten <i>Darasorb</i> Zellen.....	84
Abbildung 28: Bestimmung der Oberflächenexpression des humanen CD47 Antigens.....	85
Abbildung 29: Interferenz des therapeutischen Antikörpers Magrolimab (anti-CD47) im IAT und Charakterisierung von <i>Magrosorb</i> Zellen.	86

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht aller verwendeten Reagenzien und Chemikalien.....	27
Tabelle 2: Übersicht aller verwendeten Antikörper.....	29
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten kommerziellen Anti-Seren.	30
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Kits.....	30
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Geräte.....	31
Tabelle 6: Übersicht der verwendete Software.	33
Tabelle 7: Reaktionsansatz für die reverse Transkription.....	35
Tabelle 8: Reaktionsschema für die reverse Transkription.....	35
Tabelle 9: Reaktionsschema für die PCR mit der <i>Phusion</i> HF DNA-Polymerase.	35
Tabelle 10: Reaktionsansatz für die PCR.	36
Tabelle 11: Reaktionsschema für die Mutagenese-PCR mit der <i>PfuUltra</i> HF DNA-Polymerase.	37
Tabelle 12: Reaktionsansatz für die Mutagenese-PCR.....	37
Tabelle 13: Zusammensetzung des Elektrophorese-Puffers.	38
Tabelle 14: Reaktionsansatz für die Phosphorylierung der Oligonukleotide.	40
Tabelle 15: Reaktionsschema für die Phosphorylierung und Hybridisierung der Oligonukleotide.....	41
Tabelle 16: Übersicht der verwendeten Ausgangsvektoren.	41
Tabelle 17: Übersicht der verwendeten Restriktionsenzyme.....	42
Tabelle 18: SLIC Reaktionsansatz.....	43
Tabelle 19: Charakterisierung kompetenter Bakterien für die Transformation.	44
Tabelle 20: Zusammensetzung des Komplexmediums für die Bakterienkultur.....	44
Tabelle 21: Charakterisierung der verwendeten Zelllinien.....	47
Tabelle 22: Ansatz für die Transfektion von HEK293T/17 in einer 10 cm TC-Schale.	48
Tabelle 23: Untersuchung von vordiagnostizierten Patientenproben mit anti-HPA Antikörpern im HPA Mini-Testzell-Panel.	72

8. Publikationen und Präsentationen

8.1 Publikationen

E. Ehrend, P. Manns, S. Harenkamp, E. Seifried, C. Geisen and H. Bönig (2021) "Pre-analytic depletion of medicinal anti-CD38 antibody from patient plasma for immunohematology testing." *Blood* 138:814-817.

Vorgestellt in „*This Week in Blood*: 2. September 2021". "*This Week in Blood*" ist eine Zusammenfassung der interessantesten Studien aus der wöchentlichen Ausgabe von *Blood*, der offiziellen Zeitschrift der *American Society of Hematology* (ASH), die von der Chefredakteurin von *Blood*, Nancy Berliner (MD) und dem stellvertretenden Herausgeber Andrew Roberts (MBBS, PhD) handverlesen werden.

8.2 Präsentationen

E. Ehrend, E. Wiercinska, E. Danner, N. Ryschka, K. Passek, E. Boss, V. Schäfer, N. Sandner, H. Jores-Koch, S. Kugelmann und H. Bönig. "Durchflusszytometrische Bestimmung von Blutgruppen-, Thrombozyten- und Neutrophilenantikörpern mittels transduzierten, nicht-humanen Testzellen." DRK Forschungsseminar, Nördlingen, November 2017.

E. Ehrend, E. Wiercinska, E. Danner, K. Hörster, K. Landwehr, N. Ryschka, K. Passek, V. Schäfer, N. Sandner, H. Jores-Koch, S. Milz und Halvard Bönig. "Innovatives Testsystem für die Detektion, Spezifikation und Depletion von RBC, HPA und HNA Antikörpern." DRK Forschungsseminar, Heidelberg, November 2019.

E. Ehrend, E. Wiercinska, E. Danner, K. Hörster, K. Landwehr, N. Ryschka, K. Passek, V. Schäfer, N. Sandner, H. Jores-Koch, S. Milz and H. Bönig. "Innovative test system for detection, specification and depletion of RBC-, HPA- and HNA- antibodies." IGLD, Frankfurt am Main, März 2020.

Best Abstract Award DGTI 2020

E. Ehrend, E. Wiercinska, E. Danner, K. Hörster, K. Landwehr, N. Ryschka, K. Passek, V. Schäfer, N. Sandner, H. Jores-Koch, S. Milz and H. Bönig. „Innovative test system for detection, specification and depletion of RBC-, HPA-, HNA- and medicinal antibodies.” DGTI, 53. Jahrestagung, Berlin, September 2020, Digital: Abstracts. Supplement Issue of: *Transfusion Medicine and Hemotherapy 2020*, Vol. 47, Suppl. 1. (2020)

Best Abstract Award DGTI 2021

E. Ehrend, P. Manns, S. Harenkamp, E. Seifried, C. Geisen and H. Bönig. “Pre-analytic depletion of medicinal anti-CD38 antibody from patient plasma for immunohematology testing.” DGTI, 54. Jahrestagung, Wien, September 2021, Digital: Abstracts. Supplement Issue of: *Transfusion Medicine and Hemotherapy 2021*, Vol. 48, Suppl. 1. (2021)

Best Abstract Award DRK Forschungsseminar 2021

E. Ehrend, P. Manns, S. Harenkamp, E. Seifried, C. Geisen and H. Bönig. “Prä-analytische Depletion von medizinischen anti-CD38 Antikörpern aus Patientenplasma für die immunhämatologische Diagnostik.” DRK Forschungsseminar, Frankfurt am Main, November 2021.

8.3 Poster

E. Ehrend, E. Danner, E. Wiercinska, N. Ryschka, K. Passek, E. Boss, V. Schäfer, N. Sandner, H. Jores-Koch, S. Kugelmann und H. Bönig. "Nachweis von Blutgruppen-, Thrombozyten- und Neutrophilenantikörpern mittels engineerter muriner Lymphozyten im Durchflusszytometer". DRK Forschungsseminar, Deidesheim, November 2016.

E. Ehrend, E. Wiercinska, E. Danner, K. Hörster, K. Landwehr, N. Ryschka, K. Passek, V. Schäfer, N. Sandner, H. Jores-Koch, S. Milz and H. Bönig. "A flow-cytometry based blood group assay for the detection of RBC-, HPA- and HNA- antibodies". DRK Forschungsseminar, Tübingen, November 2018.

P. Manns, **E. Ehrend** und H. Bönig. "Generierung und Validierung eines Reagenzes zur Depletion von CD38 Antikörpern in der Prä-Analytik von Plasmen Daratumumab-behandelter Patienten für die Immunhämatologie". DRK Forschungsseminar, Heidelberg, November 2019.

E. Ehrend, C. Geisen, T. Schulze, E. Seifried und H. Bönig. „Generierung von Testzellen zur Detektion thrombozytärer Antikörper.“ DRK Forschungsseminar, Frankfurt am Main, November 2021.

E. Ehrend, E. Bräuchle, C. Geisen, T. Schulze, E. Seifried, H. Bönig. „Development of a test cell-panel that provides the framework for fast, sensitive and reliable FNAIT-causing HPA antibody detection.“ DGTI, 55. Jahrestagung, Mannheim, September 2022, Digital: Abstracts. Supplement Issue of: Transfusion Medicine and Hemotherapy 2022, Vol. 49, Suppl. 1. (2022)

E. Bräuchle, M. Glück, **E. Ehrend**, E. Seifried und H. Bönig. „Immunhämatologisches Testreagenz zur präanalytischen Depletion von anti-CD47 Antikörper aus Patientenplasma.“ DRK Forschungsseminar, Hamburg, November 2022.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die mich während dieser Arbeit unterstützt und mich auf diesem Weg begleitet haben, ganz herzlich bedanken.

Zuerst möchte ich Dr. Elke Schleucher und Prof. Paul Dierkes für die Annahme und die interne Betreuung meiner Arbeit am Fachbereich 15 der Goethe Universität danken. Prof. Dierkes, ich bin sehr froh darüber, dass Sie ohne Weiteres offen und bereit dazu waren, sich des transfusionsmedizinischen Themas anzunehmen! Elke, ich danke dir für deine Unterstützung und dein unglaubliches Engagement, für die vielen netten Gespräche, die wir geführt haben und dein unbändiges Interesse an diesem Projekt!

Mein größter Dank gilt Prof. Halvard Bönig, der es mir ermöglicht hat, dieses spannende, facettenreiche Projekt in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Halvard, es war wohl eine der glücklichsten Fügungen überhaupt, dass ich in dein Labor gekommen bin und hier meine Doktorarbeit machen durfte! Von Anfang an hast du mich mit deiner Begeisterung für die Thematik angesteckt und inspiriert. Ich danke dir von Herzen für deine Motivation, dein großes Verständnis, deine Unterstützung in jeglicher Art und Weise und für alles, was du mir ermöglicht hast!

Außerdem möchte ich mich bei der Arbeitsgruppe für den Rückhalt und die Zusammenarbeit bedanken, besonders bei Dr. Benjamin Tast, der mich bereits als studentische Hilfskraft und später als Doktorandin mit offenen Armen in der Arbeitsgruppe aufgenommen hat. Seo-Youn und Katharina, es lag nicht zuletzt an euch, dass ich mich in der Arbeitsgruppe so wohl gefühlt habe. Sabine und Patricia, was würde ich nur ohne euch machen? Das wir einfach ein perfektes Team sind, zeigt nicht zuletzt unser gemeinsames Paper. Für eure Hilfe und dafür, dass ihr mir immer den Rücken freigehalten habt, bin ich sehr dankbar. Salim und Sophie, die Zusammenarbeit und die Gespräche mit euch haben nicht nur meinen Laboralltag bereichert, sie haben mir auch neue Perspektiven eröffnet. Ein liebes Dankeschön auch an Lisa-Marie und Steffi dafür, dass man euch einfach immer alles fragen kann und ihr für uns alle den Überblick behaltet!

Besonders die gruppenübergreifende Zusammenarbeit im Labor hat auf diese Arbeit und auf mich persönlich einen großen Einfluss gehabt. Steffi und Annekarin, vom ersten Tag an wart ihr immer für mich da und daran hat sich bis heute nicht geändert. Ihr alle seid wirklich außergewöhnliche Kollegen und zugleich unverzichtbare Freunde für mich.

Der Blutspendedienst, mit allen zugehörigen Instituten und den verschiedensten Abteilungen, ist ein außergewöhnlicher Arbeitsplatz für eine Doktorarbeit, weshalb ich mich besonders bei Prof. Erhard Seifried für diese Möglichkeit bedanken möchte. Lieber Herr Seifried, unter Ihrer Leitung hatte ich eine wunderbare Zeit am Blutspendedienst. Ich bin dankbar dafür, dass ich diese Arbeit hier am Institut absolvieren durfte und werde die etlichen gemeinsamen Forschungsseminare und Konferenzen, die ich im Laufe der Jahre besuchen durfte, immer in guter Erinnerung behalten!

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Ohne die kontinuierliche Unterstützung meiner Eltern und Großeltern wäre es mir nicht möglich gewesen, diesen Weg einzuschlagen. Ich bin froh und dankbar, dass ihr mich ermutigt und an mich geglaubt habt. Ihr unterstützt mich bedingungslos bei all meinen Plänen. Danke auch an Fabi, Ulrike und Steffi, dass ihr für mich da seid, wann immer ich euch brauche. Ihr habt mir den nötigen Halt gegeben. Ich kann nicht in Worte fassen, wie dankbar ich euch dafür bin.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Alle Stellen und Textpassagen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Quellen oder anderen fremden Texten entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht. Ebenso wurden alle Abbildungen, sofern nicht selbst von mir erstellt, mit entsprechenden Quellennachweisen versehen.

Diese Arbeit wurde noch nicht, auch nicht auszugsweise, für eine andere Studien- oder Prüfungsleistung verwendet.

01.12.2022

Datum



Unterschrift