

Humboldt-Universität zu Berlin

D i s s e r t a t i o n

Mechanismen der bimodalen Membran-PR3-Expression auf neutrophilen Granulozyten

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Diplom-Biochemikerin Claudia Eulenberg

Dekan: Prof. Dr. Andreas Herrmann

Gutachter: 1. Prof. Dr. Thomas Börner
2. Prof. Dr. Michael Bader
3. Prof. Dr. Ralph Kettritz

eingereicht: 12.06.2012

Datum der Promotion: 21.11.2012

Abstrakt

Anti-Neutrophile Cytoplasmatische Antikörper (ANCA) verursachen nekrotisierende Vaskulitiden kleiner Blutgefäße. Die Serinprotease Proteinase 3 (PR3) ist ein ANCA-Zielantigen, welches von zirkulierenden ANCA auf der Zellmembran erkannt wird. ANCA aktivieren neutrophile Granulozyten, die dann die nekrotisierende Vaskulitis verursachen. Das Membran-PR3 (mPR3) Expressionsmuster ist bimodal wobei mPR3-niedrig (mPR3^{niedrig}) und mPR3-hoch (mPR3^{hoch}) exprimierende Zellen existieren. Wir testeten die Hypothese, dass ein Membranrezeptor eine hohe mPR3-Expression vermittelt. Wir verwendeten humane neutrophile Granulozyten, neutrophil-differenzierte Stammzellen und transfizierte HEK293 Zellen. Wir identifizierten das Glykoprotein CD177 als einen mPR3-präsentierenden Rezeptor. CD177 zeigte eine spezifische Bindung von reifem PR3-Protein, nicht aber von einem unprozessierten PR3. Wir separierten die distinkten mPR3-Zellpopulationen und führten Durchflusszytometrie, Giemsa-Färbung, Western Blot-Experimente und RT-PCR für die *PR3* und *CD177* mRNA-Expression durch. Wir fanden, dass die mPR3^{hoch} neutrophilen Granulozyten PR3- und CD177-Protein enthielten, während in den mPR3^{niedrig} neutrophilen Granulozyten nur PR3, aber kein CD177 detektierbar war. Die *CD177*-Regulation vollzog sich auf transkriptioneller Ebene, da die Zellen, die negativ für das CD177-Protein waren auch keine mRNA transkribierten. Um die Grundlage der fehlenden *CD177*-Transkription zu analysieren, identifizierten wir den Transkriptionsstart von *CD177* für eine anschließende Mutations- und SNP-Analyse. Die *CD177*-Sequenzen der proteinkodierenden Regionen und der Intron-Exon-Übergänge der beiden Zellpopulationen waren identisch. Jedoch fanden wir, dass das *CD177*-Gen einer monoallelischen Expression unterliegt. Es wurde dabei maternale als auch paternale monoallelische Expression detektiert. In weiterführenden Untersuchungen soll der Regulationsmechanismus der monoallelischen *CD177*-Expression charakterisiert werden.

Anti-Neutrophile Cytoplasmatische Antikörper (ANCA)

CD177

bimodales Expressionsmuster

Zellpopulationen

mPR3^{niedrig}

mPR3^{hoch}

monoallelische Expression

Abstract

Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA) cause necrotizing small-vessel vasculitis. The serine protease proteinase 3 (PR3) provides a main ANCA target antigen and is recognized by circulating ANCA on the neutrophil cell surface. ANCA activate neutrophils and activated neutrophils cause vasculitis. The membrane-PR3 (mPR3) expression pattern is bimodal in that low- and high mPR3 expressing cells (mPR3^{low} and mPR3^{high}) can be distinguished. We tested the hypothesis that a membrane receptor mediates mPR3^{high} expression. We studied human neutrophils, neutrophilic differentiated CD34-positive hematopoietic stem cells and transfected HEK293 cells. We identified the glycoprotein CD177 as an mPR3 presenting receptor. CD177 demonstrated specific binding of mature, but not of unprocessed pro-PR3. We separated the two distinct mPR3 populations and performed cytometry analysis, Giemsa staining, western blot analysis and RT-PCR for *PR3* and *CD177* expression. We detected PR3 and CD177 protein in mPR3^{high} expressing neutrophils, whereas only PR3, but no CD177 was found in mPR3^{low} expressing cells. Regulation took place on a transcriptional level because cells that were negative for CD177 protein were also negative for mRNA. To further study this finding, we identified the *CD177* transcription start for a subsequent mutation and SNP analysis. *CD177* sequences of the protein-coding regions and the intron-exon regions did not differ in both populations. However, we found a monoallelic *CD177* expression and were able to detect maternal as well as paternal allele expression. Future experiments will elucidate the mechanisms that control monoallelic *CD177* gene expression.

Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA)

CD177

bimodal expression pattern

mPR3^{low}

mPR3^{high}

monoallelic expression

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt	1
Abstract	2
Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	9
1. Einleitung	14
1.1. Definition und Klassifizierung von Vaskulitis	14
1.2. ANCA-assoziierte Vaskulitiden	14
1.3. Klinische Aspekte der ANCA-assoziierte Vaskulitiden	15
1.3.1. Die Wegenersche Granulomatose	17
1.4. Rekrutierung neutrophiler Granulozyten bei Entzündungsvorgängen	19
1.5. ANCA-Zielantigene	24
1.5.1. Das ANCA-Zielantigen Myeloperoxidase	24
1.5.2. Das ANCA-Zielantigen Membran-Proteinase 3	25
1.6. Die Entstehung von ANCA	30
1.6.1. <i>In vitro</i> Untersuchungen der Interaktion von ANCA mit neutrophilen Granulozyten und Monozyten	31
1.6.2. <i>In vivo</i> Untersuchungen mit ANCA auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten	33
1.7. CD177 - Humanes Neutrophilen-spezifisches Antigen 2A	34
1.8. Zielstellung der Arbeit	36
2. Material und Methoden	37
2.1. Materialien	37
2.1.1. Zelllinien und Bakterienstämme	37
2.1.1.1. Zelllinien	37
2.1.1.2. Bakterienstämme (Derivate von <i>E. coli</i>)	37
2.1.2. Antikörper	37
2.1.3. Chemikalien, Reagenzien und Medien	38
2.1.4. Enzyme und Kits	40
2.1.5. Geräte und Laborhilfsmittel	41
2.1.6. Plasmidvektoren	41
2.1.7. Software / Internetseiten	42
2.1.8. Verbrauchsmaterialien	42
2.1.9 verwendete Primer	43
2.1.10 Puffer und Lösungen	43

2.1.10.1. Puffer und Lösungen DNA-Gelelektrophoresen	43
2.1.10.2. Puffer und Lösungen für Southern Blot-Methode	43
2.1.10.3. Puffer und Lösungen für mikrobiologische Methoden.....	44
2.1.10.4. Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden	44
2.2. Methoden.....	45
2.2.1. Bioinformatische Methoden	45
2.2.1.1. Oligonukleotiddesign.....	45
2.2.1.2. Sondendesign und -herstellung für die Southern Blot-Methode	46
2.2.2. Molekularbiologische Methoden	47
2.2.2.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Polymerase Chain Reaktion)	47
2.2.2.2. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus PCR-Ansätzen für Sequenzierungen.....	48
2.2.2.3. Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese.....	48
2.2.2.4. Restriktionsverdau von DNA.....	49
2.2.2.5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	49
2.2.2.6. Ligation von DNA-Fragmenten in einen Expressionsvektorvektor (Subklonierung)	50
2.2.2.7. TOPO-TA-Klonierung.....	50
2.2.2.8. DNA-Plasmidpräparation aus <i>E.coli</i> -Zellen.....	51
2.2.2.9. DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung	51
2.2.2.10. DNA-Sequenzierung	52
2.2.2.11. Aufreinigung der Sequenzreaktion.....	53
2.2.2.11.1. Ethanol-Präzipitation.....	53
2.2.2.11.2. Aufreinigung der Sequenzieransatzes mittels <i>Centi Sep Spin Columns</i> .	54
2.2.2.12. 5' RACE (<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>)–Methode	54
2.2.2.12.1. Erststrang cDNA-Synthese für die 5' RACE und Abbau der RNA	56
2.2.2.12.2. Aufreinigung der cDNA mittels <i>S.N.A.P.</i> ® Säulen	56
2.2.2.12.3. <i>TdT</i> (<i>Terminal desoxynucleotidyl transferase</i>)- <i>Tailing</i> der cDNA	56
2.2.2.12.4. <i>dC-tailed</i> cDNA–PCR.....	56
2.2.2.12.5. Nested-Amplifizierung der “ <i>dC-tailed</i> cDNA – PCR”	57
2.2.2.13. Ribonukleinsäuren (RNA)-Präparation	58
2.2.2.14. <i>DNase</i> -Verdau	59
2.2.2.15. Erststrang-cDNA-Synthese.....	59
2.2.2.16. Quantitative Real-Time-PCR (<i>TaqMan</i> ®-Analyse)	60
2.2.2.17. Präparation hochmolekularer DNA aus Vollblut oder neutrophilen Granulozyten	61
2.2.2.18. Einbettung von Zellen in Agaroseblöcke und Präparation hochmolekularer DNA für die Pulsfeldgelelektrophorese	62

2.2.2.19. Fragmentierung von hochmolekularer DNA in Agaroseblöcken mittels Restriktionsendonukleasen.....	62
2.2.2.20. Fragmentierung präparierter hochmolekularer DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	62
2.2.2.21. Aufreinigung von fragmentierter DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion.....	63
2.2.2.22. Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) mittels der CHEF-Methode (Clamped-Homogenous-Electric-Field).....	63
2.2.2.23. Southern Blot und Detektion mittels hybridisierter ³² P-markierter Sonden .	64
2.2.2.24. Strippen von Southern Blot-Membranen.....	65
2.2.3. Mikrobiologische Methoden	66
2.2.3.1. Transformation von TOP10 und TOP10F' chemisch kompetenten <i>E.coli</i> -Zellen.....	66
2.2.3.3. Blau-Weiß-Selektion transformierter Bakterienkolonien.....	66
2.2.3.2. Kultivierung und Lagerung von transformierten Bakterien.....	67
2.2.4. Proteinbiochemische Methoden.....	67
2.2.4.1. Herstellung von Proteinlysaten aus neutrophilen Granulozyten oder CD34-positive Stammzellen	67
2.2.4.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford.....	67
2.2.4.3. Natrium-Dodezyl-Sulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	68
2.2.4.4. Western Blot	68
2.2.4.5. Ponceau-S-Färbung und Blockierung des Western Blots.....	69
2.2.4.6. Proteindetektion eines Western Blots	69
2.2.4.7. Membran-Stripping	69
2.2.5. Zellbiologische Methoden	70
2.2.5.1. Bestimmung der Zellzahl nach Neubauer.....	70
2.2.5.2. Isolation von humanen neutrophilen Granulozyten aus Vollblut.....	70
2.2.5.3. Isolation von humanen CD34-positiver Stammzellen aus Nabelschnurblut .	70
2.2.5.4.1 Expandierung und Differenzierung von humanen CD34-positiven Stammzellen	72
2.2.5.5. Magnetische Sortierung von humanen neutrophilen Granulozyten bzw. differenzierten CD34-positive Stammzellen.....	72
2.2.5.6. Durchflusszytometrie von isolierten Fluoreszenzstoff-markierten Zellen und Fluoreszenzstoff-markierter Zellen in Vollblut.....	73
2.2.5.7. Giemsa-Stein-Färbung von humanen neutrophilen Granulozyten und CD34-positive Stammzellen	74
2.2.5.8. Kultivierung von HEK293 Zellen	74
2.2.5.9. Einfrieren und Auftauen von HEK293 Zellen	75

2.2.5.10. Transiente Transfektion von HEK293 Zellen	75
2.2.6. Statistische Analyse.....	76
3. Ergebnisse	77
3.1. Identifikation von CD177 als Membran-Proteinase 3 (mPR3)-Rezeptor	77
3.1.1. Untersuchung der CD177- und PR3-Oberflächenexpression auf neutrophilen Granulozyten.....	77
3.1.1.1. Messung der mCD177- und mPR3-Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie	77
3.1.1.2. Sortierung der neutrophilen Granulozyten nach dem Oberflächenmolekül mPR3 und die Analyse der Populationen mittels Durchflusszytometrie	78
3.1.1.3. Proteinexpressionsanalyse von PR3 und CD177 in den sortierten Populationen.....	79
3.1.2. Untersuchung der CD177- und PR3-Expression im HEK293-Zellsystem	80
3.2. Charakterisierung der mPR3 ^{hoch} /mCD177 ^{positiven} - und mPR3 ^{niedrig} /mCD177 ^{negativen} - granulozytären Populationen.....	86
3.2.1. Vergleich der mPR3 ^{hoch} /mCD177 ^{positiven} - mit den mPR3 ^{niedrig} /mCD177 ^{negativen} neutrophilen Granulozyten.....	86
3.2.1.1. Sortierungsanalyse der neutrophilen Granulozyten mittels Durchflusszytometrie	86
3.2.1.2. Giemsa-Färbungen von den neutrophilen Granulozyten vor und nach der Sortierung	87
3.2.1.3. Analyse der Proteinexpression von PR3 und CD177	88
3.2.1.4. Expressionsanalyse von <i>PR3</i> und <i>CD177</i> auf RNA-Ebene	89
3.2.2. Differenzierungsverlauf von CD34-positiven Zellen zu reifen neutrophilen Granulozyten.....	92
3.2.2.1. Analyse mittels Durchflusszytometrie während des Differenzierungsverlaufs	92
3.2.2.2. Genexpressionsanalyse von <i>CD177</i> und <i>PR3</i> während des Differenzierungsverlaufs	94
3.2.3. Vergleich der mPR3 ^{hoch} /mCD177 ^{positiven} - mit den mPR3 ^{niedrig} /mCD177 ^{negativen} CD34-positiven differenzierten Stammzellen	95
3.2.3.1. Sortierungsanalyse der CD34-positiven differenzierten Stammzellen mittels der Durchflusszytometrie.....	96
3.2.3.2. Giemsa-Färbungen der differenzierten mCD177 ^{positiven} - und mCD177 ^{negativen} neutrophilen Granulozyten.....	97
3.2.3.3. Analyse der Proteinexpression von PR3 und CD177 in differenzierten mCD177 ^{positiven} - und mCD177 ^{negativen} neutrophilen Granulozyten	97

3.2.3.4. mRNA-Genexpressionsanalyse von <i>PR3</i> und <i>CD177</i> in differenzierten mCD177 ^{positiven} - und mCD177 ^{negativen} neutrophilen Granulozyten	99
3.3. Charakterisierung der genetischen Regulation der <i>CD177</i> -Expression	100
3.3.1. Untersuchung der <i>CD177</i> -Genregion auf intrachromosomale Rekombination mit dem Pseudogen	100
3.3.2. Untersuchung der mCD177-Populationen auf Vorhandensein der Deletion 2244 auf genomischer Ebene	103
3.3.3. Untersuchung des Einflusses des Antisense-Transkriptes „ <i>Expressed</i> <i>Sequence Tag</i> “ (<i>EST</i>) <i>AA496144</i> auf die <i>CD177</i> -Gen- und Proteinexpression	106
3.3.3.1. Analyse der <i>EST</i> - und <i>CD177</i> -Genexpression in neutrophil-differenzierten CD34-positiven hämatopoetischen-Stammzellen aus Nabelschnurblut	107
3.3.4. Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des <i>CD177</i> -Gens	108
3.3.5. Untersuchung der genomischen DNA im Bereich des <i>CD177</i> -Gens in Bezug auf Mutationen und damit auf die Expression eines (funktionellen) <i>CD177</i> - Proteins	111
3.3.6. Allel-abhängige Transkription führt zur differentiellen Expression von <i>CD177</i> in den neutrophilen Granulozyten	111
4. Diskussion	128
4.1. Die Charakterisierung von <i>CD177</i> als Membran- <i>PR3</i> -Rezeptor	128
4.2. Charakterisierung der distinkten m <i>PR3</i> ^{niedrig} /mCD177 ^{negativen} und m <i>PR3</i> ^{hoch} /mCD177 ^{positiven} Populationen neutrophiler Granulozyten und neutrophil differenzierter hämatopoetischer Stammzellen	131
4.3. Genetische Regulation der <i>CD177</i> Genexpression	135
5. Zusammenfassung	141
6. Literaturverzeichnis	142
7. Anhang	158
7.1. Vektorkarten	158
7.1.1. pCMV-Sport 6-Vektor (von Invitrogen, Karlsruhe, DE)	158
7.1.2. pCR II-TOPO-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe, DE)	159
7.1.3. pCR 2.1-TOPO-Vektor	160
7.1.4. pcDNA4-Vektor Frame B und C	161
7.1.5. pDrive	162
7.2. Oligonukleotide	163
7.3. Übersicht der analysierten SNPs der SNP-Analyse	165

7.4. Haplotypenanalyse am CD177-Locus der Familie G (Abb. 46).....	166
8. Tabellenverzeichnis.....	167
9. Abbildungsverzeichnis	169
Danksagung.....	172
Selbständigkeitserklärung.....	173
Publikationsliste	174

Abkürzungsverzeichnis

∞	unendlich
Λ	griech. lambda (Wellenlänge)
%	Prozent
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
'	Minute
''	Sekunde
3', 5'	Orientierung eines DNA/RNA Stranges; am 3. Kohlenstoff der Desoxyribose ist eine Hydroxyl-Gruppe, am 5. Kohlenstoffatom eine Phosphatgruppe
α-dCTPs ³² P	³² Phosphor-markiertes Desoxycytosintriphosphat
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ad	lat.: bis zu, bis auf
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
aqua bidest	zweifach destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	engl. basic local alignment search tool (Programm für Sequenzvergleiche)
bp	engl. base pair (Basenpaar)
Bq	Becquerel
BSA	engl. bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CD	engl. Cluster of Differentiation („Unterscheidungsgruppen“; bezeichnet Gruppen immunphänotypischer Oberflächenmerkmalen von Zellen)
Chr.	Chromosom
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
cDNA	engl. copy desoxynucleic acid (Duplikat der Desoxynukleinsäure)
cfu	engl. colony forming units (Kolonie-bildenden Einheiten)
C-Terminus	Carboxyterminus
CTP	Cytosintriphosphat

cycl.	Zyklus einer PCR
ddNTP	Didesoxynukleotid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	engl. dulbecco's modified eagles medium (Zellkulturmedium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. desoxynucleic acid (Desoxynukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ds	engl. double strand (Doppelstrang)
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-Aminoethylether)-N, N'-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Enzymimmuntest)
EtOH	Ethanol
Ext.	Extensionszeit am Ende eines PCR Zyklus
FCS	engl. fetal calf serum (fötales Kälberserum)
fw	forward Primer
g	Gramm / Gravitationskonstante (9,81 m/s ²)
G	Guanin
GTT	Guanidintriphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HRP	engl. horse radish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	engl. kilo base (Kilobasen)
kBq	Kilobecquerel
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LB Medium	Luria – Bertani Medium (Bakterienmedium)
LRM	Low Range Marker (Molekulargewichtsmarker)

m	Meter
M	Molarität (mol/l)
mA	Milliampere
Mb	Megabase
mba	Millibar
Mg ²⁺	Magnesiumion
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MCS	engl. multiple cloning site (multiple Klonierungsstelle)
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mol	Mol
mRNA	engl. messenger ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
MW	engl. molecular weight (Molekulargewicht)
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	di-Natriumhydrogenphosphat
NaN ₃	Natriumazid
Na ₂ SO ₄	Natriumsulfat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NP-40	Nonidet P40
nt	Nukleotid
N-Terminus	Aminoterminus
OD	Optische Dichte
Ohm (Ω)	Einheit des elektrischen Widerstandes
p	kurzer Arm eines Chromosoms
pA	Poly-A-Signal
PBS	engl. phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pg	Pikogramm
pH Wert	engl. potentia hydrogenii = Wasserstoffionenkonzentration
PMA	engl. phorbol 12-myristate 13-acetate (Phorbol -12-myristat -13-acetat)
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

P/S	Penizillin / Streptomycin
q	langer Arm eines Chromosoms
RCF	engl. relative centrifugal force (relative Zentrifugalkraft)
rpm	engl. rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
rv	reverse Primer
S	Svedberg Konstante ribosomaler Untereinheiten
s.	siehe
s ²	Sekunde im Quadrat
SDS	engl. sodium docecylsulfate (Natriumdodezylsulfat)
SDS-PAGE	SDS-Polyakrylamid-Gelelektrophorese
sek	Sekunde
SFM	serumfreies Medium
SOC Medium	Derivat von SOB (engl. super optimal broth)-Medium
β-Gal	β-Galactosidase-Gen (lacZ)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-ETDA Puffer
TBST	Tris-Borat-Kochsalzlösung Puffer mit Tween 20
TE	Tris-ETDA Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TFBS	Transkriptionsfaktorbindungsstelle
Trizma Base	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
U	engl. unit (Einheit der enzymatischen Aktivität)
UV	Ultraviolett
V	Volt (Einheit der elektrischen Spannung)
v/v	Volumenanteil pro Volumen
v/w	Volumenanteil pro Masse
WB	Western Blot
wt	Wildtyp
w/w	Masseanteil pro Masse

X-Gal 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

Genesymbole, sowie englisch- und lateinsprachige Ausdrücke sind kursiv geschrieben

1. Einleitung

1.1. Definition und Klassifizierung von Vaskulitis

Vaskulitiden sind entzündliche Erkrankungen der Blutgefäße, die zu einer verminderten Blutversorgung der Organe führen. In der Folge entstehen Organschäden bis hin zum kompletten Organversagen. Die Einteilung der Vaskulitiden kann nach verschiedenen Gesichtspunkten erfolgen. Primäre Vaskulitiden stellen eigenständige Krankheiten dar, während sekundäre Vaskulitiden als ein Begleitphänomen im Rahmen anderer Krankheitsentitäten wie Infektionen, bösartige Tumorerkrankungen und medikamentenbedingt vorkommen. Die derzeit gültige Klassifizierung der primären Vaskulitiden basiert auf der Größe der betroffenen Gefäße und wurde 1992 auf der Chapel Hill Consensus Konferenz erstellt (Jennette u. a. 1994). Man unterscheidet entsprechend Vaskulitiden der großen, mittleren und kleinen Gefäße. Beispiele für Vaskulitiden großer Gefäße sind die Takayasu-Arteriitis und die Riesenzellerarteriitis, während das Kawasaki-Syndrom und die Polyarteriitis nodosa (PAN) zu den Vaskulitiden mittelgroßer Gefäße zählen. Kleingefäßvaskulitiden befallen Arteriolen und weiter distal gelegene Abschnitte, wie beispielsweise die Kapillaren und Venolen. Aus diesem Grunde wird die Erkrankungsgruppe auch als so genannte „*small-vessel-Vasculitis*“ bezeichnet.

Eine wichtige Untergruppe der primären Vaskulitiden kleiner Blutgefäße stellen die „Anti-Neutrophilen Cytoplasmatischen Antikörper“ (ANCA)-assoziierte Vaskulitiden, wie beispielsweise die Wegenerschen Granulomatose (WG) und die mikroskopische Polyangiitis (MPA) dar. Beispiele von Kleingefäßvaskulitiden ohne ANCA-Beteiligung sind die kutane leukozytoklastische Angiitis (KLA), die Kryoglobulinämie, das Hypokomplementämische Urtikaria-Vaskulitis-Syndrom (HUVS) und die Purpura Schönlein-Henoch (PSH).

1.2. ANCA-assoziierte Vaskulitiden

Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag in ANCA-assoziierten Vaskulitiden. Hierbei handelt es sich um systemische nekrotisierende Entzündungen von kleinen Blutgefäßen und deren umliegenden Gefäßbetten. ANCA spielen eine wichtige Rolle als diagnostischer Marker. Sie sind aber auch direkt an der Krankheitsentstehung beteiligt. Die ANCA-assoziierten Vaskulitiden sind histologisch durch eine leukozytäre Entzündung und die Abwesenheit von Immunglobulinablagerungen gekennzeichnet.

Im Jahre 1982 wurden von Davis erstmalig bislang unbekannte Antikörper im Serum von Patienten mit nekrotisierender und immunhistologisch negativer Glomerulonephritis beschrieben (Davies u. a. 1982). Diese Antikörper interagierten mit cytoplasmatischen Bestandteilen neutrophiler Granulozyten und Monozyten und führten zu einer indirekten Immunfluoreszenz der Zellen. Ausgehend von einer Studie von van der Woude und anderen im Jahre 1985 wurden diese ANCA bei Patienten mit der Wegenerschen

Granulomatose zunächst als diagnostisches Mittel und als Marker der Krankheitsaktivität etabliert (van der Woude u. a. 1985). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass es zwei verschiedene ANCA Typen gibt, die sich in ihrem Immunfluoreszenzmuster an Ethanol-permeabilisierten neutrophilen Granulozyten unterscheiden. Die unterschiedlichen Immunfluoreszenzmuster sind allerdings durch die Ethanolfixierung verursachte Artefakte, die sich jedoch aufgrund ihrer engen Assoziation mit den beiden distinkten ANCA-Zielantigenen als klinisch hilfreiches Standardverfahren erwiesen hat (Falk & Jennette 1988). Man unterscheidet die sogenannten p (perinukleären)-ANCA, welche eine dominante Kernmembranfärbung aufzeigen, und zum anderen die c (cytoplasmatischen)-ANCA, die nur eine cytoplasmatische, jedoch keine perinukleäre Immunfluoreszenz verursachen. In der Abbildung 1 wurde jeweils ein Beispiel für eine typische p- und c-ANCA-Färbung für den direkten Vergleich abgebildet (Savige u. a. 1998).

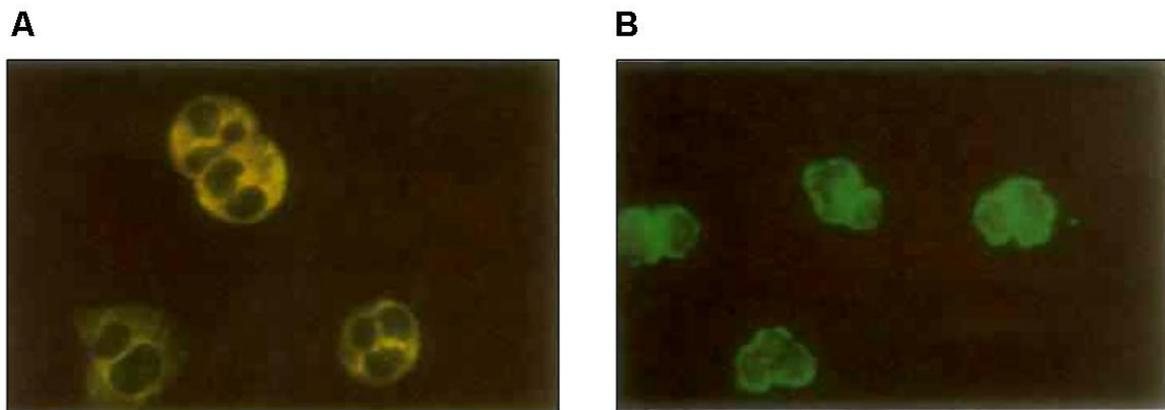


Abb. 1: Immunfluoreszenzmuster von c- und p-ANCA in Ethanol-permeabilisierten Granulozyten eines Patienten mit Wegenerscher Granulomatose. In der Grafik A wurde eine Färbung für c-ANCA mit dem typisch fluoreszierenden Cytoplasma dargestellt. Hierbei sind die Kerne nicht angefärbt und erscheinen daher dunkel. In der Grafik B hingegen wurde eine typische p-ANCA-Färbung abgebildet, bei der die perinukleären Membranen und nicht das Cytoplasma angefärbt ist (Savige u. a. 1998).

1.3. Klinische Aspekte der ANCA-assoziierte Vaskulitiden

Vor dem Ausbruch der Krankheit berichten Patienten von unspezifischen grippeähnlichen Symptomen wie beispielsweise Gelenk- und Muskelschmerzen, sowie Kopf- und Gliederschmerzen, allgemeinem Unwohlsein und erhöhten Körpertemperaturen. Zahlreiche klinische Untersuchungen zeigten, dass der vaskulitische Entzündungsprozess jedes Organ im Körper betreffen kann. In der folgenden Abbildung 2 sind beispielhaft einige klinische Manifestationen dargestellt.

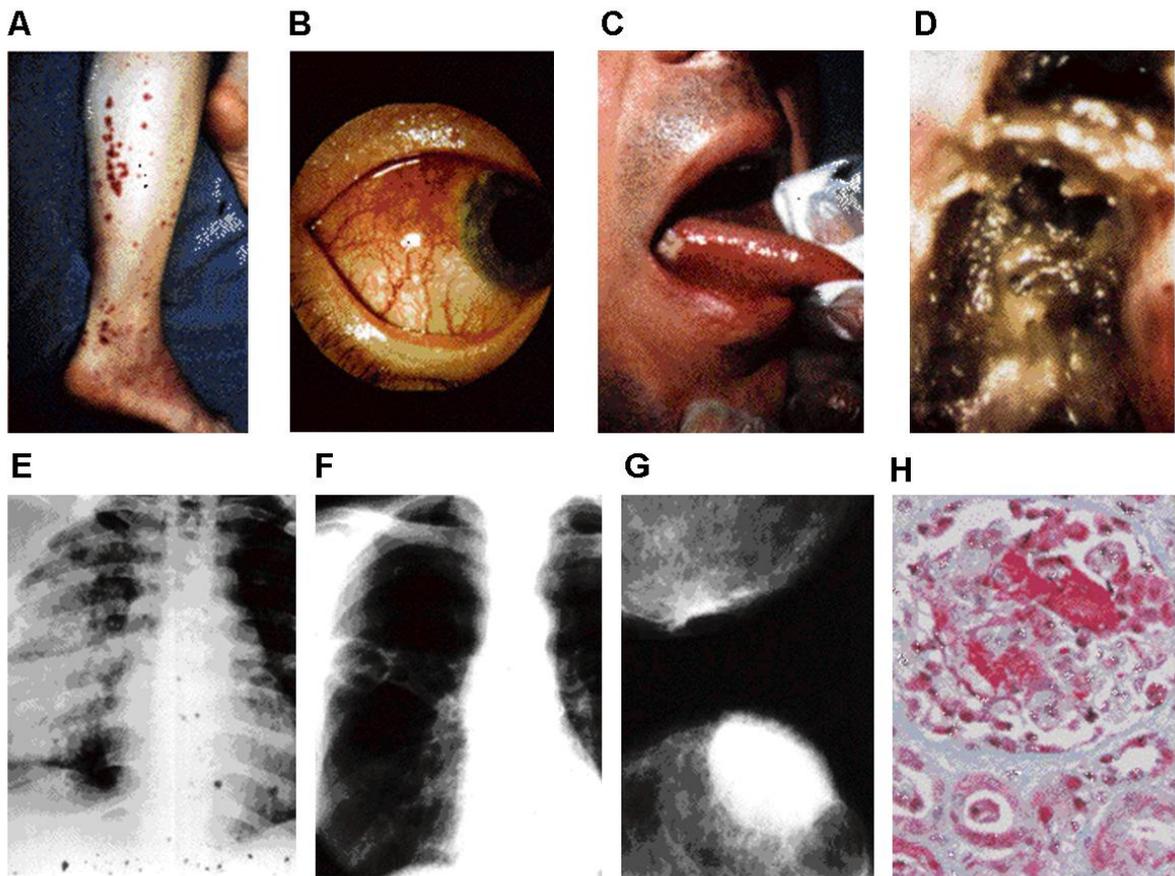


Abb. 2: Beispiele für klinische Manifestationen der ANCA-assoziierten Vaskulitiden. Die Grafik A zeigt vaskulitische Hautveränderungen (Purpura), die Grafik B eine Entzündung der äußeren Abschnitte der Augenhaut (Episkleritis), die Grafik C ein Zungengeschwür (Zungenulkus) und die Grafik D borkige Nasenbelege. In der Grafik E und F sind Beispiele für infiltrative und kavernöse (höhlenbildende) Lungenveränderungen, in der Grafik G das Röntgenbild eines Befalls der weiblichen Brustdrüse und in der Grafik H eine Gewebsbiopsie einer Niere mit ANCA-assoziiierter Glomerulonephritis dargestellt. (MDC-ECRC Homepage von Prof. Dr. Kettritz http://www.mdc-berlin.de/en/ecrc/Research/group_Kettritz/index.html; modifiziert)

Die zur Krankheitsgruppe der ANCA-assoziierten Vaskulitiden gehörenden Erkrankungen wie die Wegenersche Granulomatose, die mikroskopische Polyangiitis und das Churg-Strauss-Syndrom weisen alle klinische und histologische Anzeichen einer Vaskulitis auf. Es gibt allerdings Unterschiede, die die einzelnen Entitäten voneinander abgrenzen. So können bei der Wegenerschen Granulomatose und beim Churg-Strauss-Syndrom, jedoch nicht bei der mikroskopischen Polyangiitis zusätzlich zur Vaskulitis Granulome auftreten. Der Unterschied zwischen der Wegenerschen Granulomatose und dem Churg-Strauss-Syndrom liegt darin, dass beim Churg-Strauss-Syndrom ein begleitendes Asthma mit ausgeprägter Eosinophilie auftritt.

Alle ANCA-assoziierten Vaskulitiden werden nach den drei Schweregraden in ein lokalisiertes und ein generalisiertes Stadium eingeteilt. Diese Einteilung hilft auch eine

optimale Therapiestrategie auszuwählen. Die derzeitigen Behandlungsoptionen sind unspezifisch und die Standardprotokolle umfassen die Gabe von hochdosierten Steroiden, Cytostatika und die Entfernung der Autoantikörper mittels Plasmaaustausch. Diese Protokolle sind mit einer hohen Nebenwirkungsrate, wie Infektionen und Krebserkrankungen verbunden. Spezifischere Therapieansätze erfordern ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden Krankheitsmechanismen. Dieser translationale Ansatz ist Gegenstand der in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Forschungsprojekte.

1.3.1. Die Wegenersche Granulomatose

Die Wegenersche Granulomatose ist die häufigste ANCA-assoziierte Erkrankung in Nordeuropa und damit auch in Deutschland. Die Erkrankung wurde 1936 vom Pathologen Friedrich Wegener erstmals als eigenständiges Krankheitsbild beschrieben (Wegener 1936). Die Autoimmunerkrankung Wegenersche Granulomatose, die auch als Morbus Wegener bezeichnet wird, ist eine chronische systemische Vaskulitis der kleineren bis mittelgroßen Blutgefäße (Johnsson 1948; Godman & Churg 1954). Die Bezeichnung Granulomatose leitet sich von den körnigen Gebilden ab, den Granulomen, die sich in und um die Gefäße bilden können.

Die Krankheit zeigt typischerweise ihre initialen Manifestationen in den oberen Atemwegen wie der Nase und den Nasennebenhöhlen. Es kann zu Geschwüren (Ulzerationen) der Mund- und Rachenschleimhaut und zur Rhinitis kommen. Des Weiteren können Entzündungen der Nasennebenhöhlen zu borkigen Nasenbelegen (s. Abb. 2) in der Nasenhöhle führen. Ein Fortschreiten der Erkrankung kann zur Zerstörung des nasalen Knorpels und damit zur Deformation der Nase in Form einer sogenannten „Sattelnase“ führen. Im weiteren Verlauf der Krankheit sind auch die unteren Atemwege wie die Lunge und häufig auch die Nieren betroffen. Dabei entstehen im fortgeschrittenen Stadium eine nekrotisierende Glomerulonephritis mit Halbmondausbildung (Abb. 2 Grafik H) und alveolare Einblutungen in der Lunge. Letzteres äußert sich klinisch als Bluthusten und Kurzatmigkeit. Neben den erwähnten Manifestationen können auch das Zentralnervensystem, die Augen, die Ohren, die Haut und weitere Organe betroffen sein. In der folgenden Abbildung 3 ist beispielhaft eine schematische Darstellung eines Nephrons mit seinem Glomerulus sowie Nierenbiopsien von einem gesunden Glomerulus im Vergleich zu einem Glomerulus mit Mikroaneurysmata einer Glomerulonephritis gezeigt.

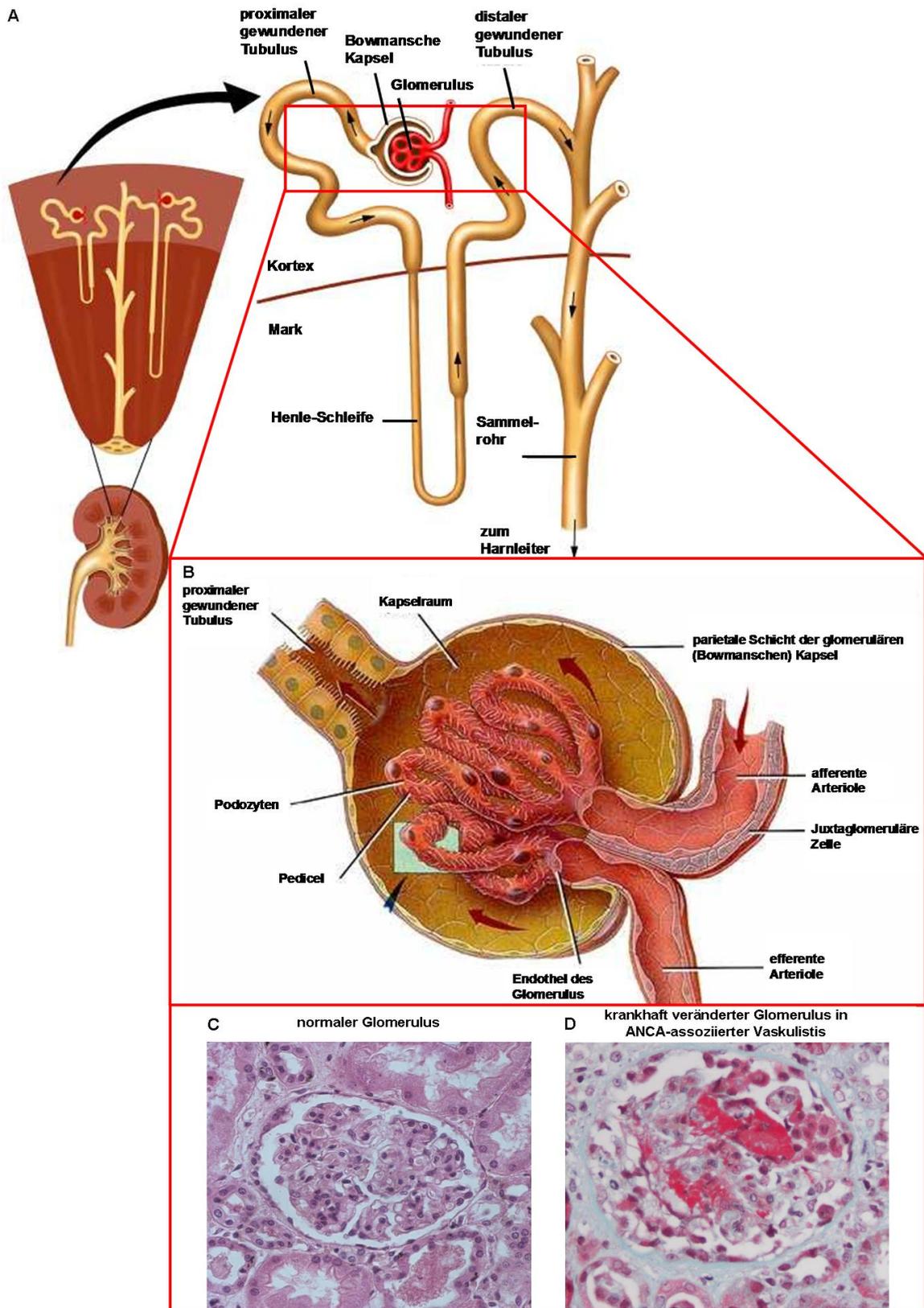


Abb. 3: Schematische Darstellung eines Nierenquerschnittes mit einem Nephron sowie dem Glomerulus und im direkten Vergleich die Histologie von Nierenbiopsien. Die Abbildung A zeigt den Querschnitt einer Niere sowie ein schematisches Nephron mit seinen Bestandteilen („BELTINA.org - encyclopedia of health“, <http://www.beltina.org/encyclopedia.html>; modifiziert). In der Abbildung B ist ein vergrößertes Glomerulus mit seinen einzelnen Strukturen dargestellt („BELTINA.org - encyclopedia of health“, <http://www.beltina.org/encyclopedia.html>; modifiziert).

Zum direkten Vergleich wurden darunter die Histologien eines gesunden Glomerulus (C) und eines Glomerulus von einem erkrankten Patienten mit ANCA-assoziiierter Vaskulitis (D) dargestellt. Man erkennt in der rechten Biopsie (D) sehr deutlich die fibrinoiden Gefäßnekrosen und die extrakapilläre Halbmondbildung (Die Biopsie des gesunden Glomerulum stammt von der Internetseite des Palomar Colleges, 1140 West Mission Road, San Marcos, California, USA, <http://www2.palomar.edu/users/ggushansky/histology> und die Biopsie des kranken Glomerulus stammt mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Kettritz (ECRC, Berlin).).

Die Wegenersche Granulomatose gehört mit einer Inzidenz von etwa zwei Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner pro Jahr zu den seltenen Krankheiten. Sie tritt typischerweise bei älteren Erwachsenen zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr auf. Frauen und Männer sind etwa gleichermaßen betroffen sind (Falk & Jennette 1997; Savage u. a. 1997). In der Mehrheit der betroffenen Personen handelt es sich um Kaukasier (Borgmann & Haubitz 2004).

1.4. Rekrutierung neutrophiler Granulozyten bei Entzündungsvorgängen

Neutrophile Granulozyten sind Blutzellen, die zur Gruppe der Leukozyten gehören. Leukozyten werden in die Gruppen der Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten aufgeteilt. Die Granulozyten können wiederum in drei verschiedene Untergruppen, aufgrund der unterschiedlichen Anfärbbarkeit ihrer cytoplasmatischen Granula, unterteilt werden. Bei den drei Untergruppen handelt es sich um neutrophile-, eosinophile- und basophile Granulozyten. Die neutrophilen Granulozyten machen etwa 50 bis 60 Prozent der Leukozyten aus. Sie differenzieren im Knochenmark innerhalb von fünf bis zehn Tagen zu reifen Zellen und werden anschließend ins Blut ausgeschüttet. Ihre Halbwertszeit im zirkulierenden Blut beträgt etwa 12 Stunden (Boggs 1967), wohingegen die Zellen im Gewebe von einem Tag bis hin zu fünf Tagen überleben können. Nur ein geringer Anteil an reifen neutrophilen Granulozyten gelangt ins Blut, wo 50 Prozent der Zellen zirkulieren, während der übrige Teil am Gefäßendothel als adhärenter Granulozytenpool existiert. Bei einem gesunden Menschen werden pro Tag ca. 10^9 reife neutrophile Granulozyten pro kg Körpergewicht aus dem Knochenmark ausgeschüttet. Bei Auftreten einer Infektion erhöht sich der Anteil an neutrophilen Granulozyten im Blut und im Gewebe (Demetri & Griffin 1991). Neben der wichtigen Rolle neutrophiler Granulozyten bei der Infektabwehr, sind diese Zellen auch in nicht-infektbedingte Entzündungsprozesse involviert. Hierzu gehören Autoimmunerkrankungen, wie die ANCA-assoziierten Vaskulitiden, aber auch Tumorerkrankungen.

Am Beispiel einer bakteriellen Infektion sollen zunächst Grundlegende Abläufe der neutrophilen Granulozyten-vermittelten Entzündung erklärt werden. Durch die zeitlich versetzte Expression von Chemokin-Rezeptoren, Selektinen und Integrinen werden innerhalb weniger Stunden neutrophile Granulozyten und langfristig von Tagen bis Wochen

Monozyten zum Infektionsherd rekrutiert. Diese Wanderung zum Infektionsort erfolgt von sehr kleinen Blutgefäßen aus, den sogenannten „postkapillaren Venolen“, die einen Durchmesser von 10-100 µm besitzen (Kubes & Kanwar 1994). Diese Wanderung der Zellen aus der Blutzirkulation in das Gewebe wird als Extravasation bezeichnet und wird in 4 Abschnitte eingeteilt (s. Abb. 4).

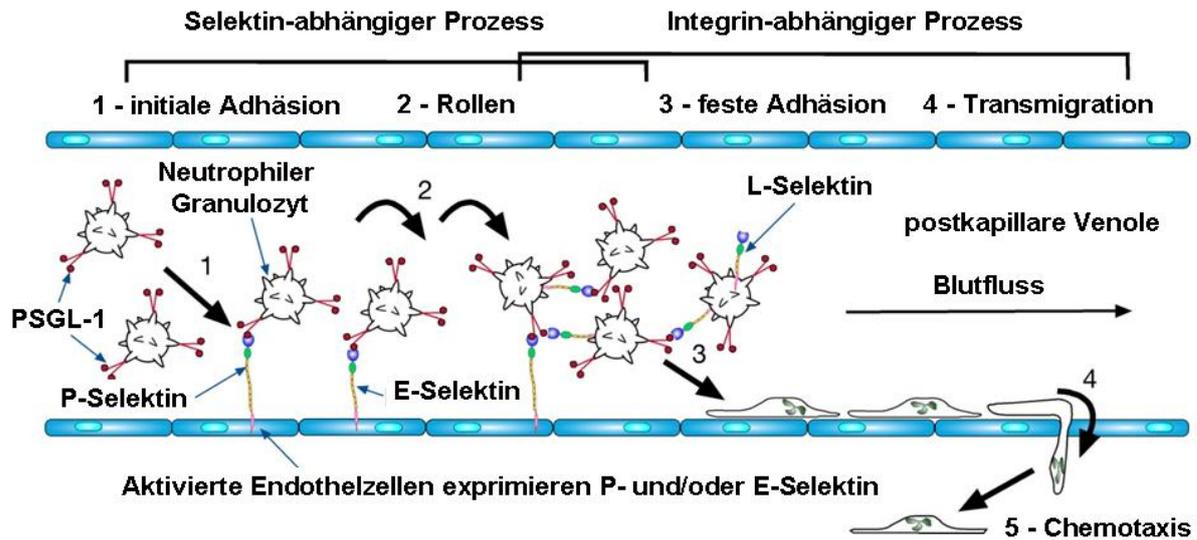


Abb. 4: Darstellung der Extravasation von Leukozyten. Die initiale Adhäsion (1) sowie das Rollen (2) der Leukozyten entlang des aktivierten Endotheliums sind durch die Bindungen von Selektinen der Endothelzellen an ihre spezifischen Interaktionspartner auf den Leukozyten (z.B. L-Selektin und PSGL-1) charakterisiert. Die feste Adhäsion (3) erfolgt über starke Bindung der Leukozyten-Integrine (z.B. CD11a/CD18 und CD11b/CD18) an die Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren (ICAM-1, ICAM-2) der aktivierten Endothelzellen. Nur durch die feste Adhäsion der Leukozyten an das Endothel wird die Transmigration (4) dieser Zellen aus der Blutzirkulation in das daruntergelegene Gewebe ermöglicht. PSGL-1 - P-Selektin Glykoproteinligand-1; ICAM-1 - intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1; VCAM-1 - vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1 (Varki u. a. 2009; modifiziert).

Im ersten Abschnitt wird anhand einer Histamin- und Thrombinfreisetzung ins umliegende Gewebe eine Vasodilatation hervorgerufen (Kubes & Kanwar 1994). Durch diese Erweiterung der Blutgefäße wird der Blutstrom im Inneren der Gefäße verlangsamt. Des Weiteren induzieren Endothelzellen Cytokin-vermittelt ihre P- und E-Selektinproduktion und präsentieren diese Moleküle dann auf ihrer Zelloberfläche (Bevilacqua u. a. 1989; Geng u. a. 1990; Kubes & Kanwar 1994; Enders u. a. 1995). Hierbei stammen die für die Stimulation benötigten Cytokine, wie beispielsweise der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) und Interleukin-1 (IL-1), von im Infektionsherd befindlichen Makrophagen (Vestweber & Blanks 1999). Zusätzliche Cytokine kommen auch von ortständigen Zellen sowie von eingewanderten Granulozyten. Da sowohl neutrophile Granulozyten als auch Monozyten die spezifischen Glykoprotein-Liganden (z.B. P-Selektin-Glycoprotein-Ligand-1 (PSGL-1)) (Bruehl

u. a. 1997) und E-Selektin-Ligand-1 (ESL-1) (Stegmaier u. a. 1997)) für die Zelladhäsionsmoleküle P- und E-Selektine besitzen sowie das Oberflächenmolekül L-Selektin für die Interaktion mit dem glykosylierungsabhängigen Zelladhäsionsmolekül-1 (GlyCAM-1), CD34 und dem Mucosa-Adressin-Zelladhäsionsmolekül-1 (MadCAM-1), sind sie in der Lage über transiente Interaktionen mit den Endothelzellen in Kontakt zu treten (Bruehl u. a. 1996). Diese schwachen Bindungen werden durch Scherkräfte des Blutstromes immer wieder unterbrochen, um anschließend über ein benachbartes Selektin wieder neu zu entstehen. Dieser Prozess führt zu einem Entlangrollen der Zellen am Blutgefäßendothelium. Im zweiten Abschnitt verstärkt sich die Bindung zwischen den neutrophilen Granulozyten sowie Monozyten und den Endothelzellen, wodurch das Rollen der Zellen über das Endothelium verlangsamt wird. Dieser Effekt erfolgt durch die Cytokin-induzierte Chemokinproduktion in Makrophagen und vor allem in Endothelzellen. Damit kommt es zur Interaktion zwischen den Chemokin-präsentierenden Endothelzellen und neutrophilen Granulozyten, welche Chemokinrezeptoren auf ihrer Zelloberfläche tragen. Gleichzeitig erhöht sich die Affinität und Avidität der Integrine. Integrine sind transmembrane Adhäsionsmoleküle, die aus zwei Glykoproteinketten (einer alpha und einer beta-Untereinheit) bestehen. Integrine können sich auf der Zelloberfläche zu größeren Komplexen zusammenlagern, wodurch sich die Bindung zwischen den neutrophilen Granulozyten bzw. Monozyten und den Endothelzellen verstärkt. Der dritte Abschnitt ist durch den Übergang des Rollens der neutrophilen Granulozyten und Monozyten in die Integrin-vermittelte Adhäsion dieser Zellen an die Endothelzellen charakterisiert. Hierzu präsentieren die Endothelzellen Chemokin-induziert Zellliganden wie beispielsweise das intrazelluläre Adhäsionsmolekül-1 und -2 (ICAM-1, CD54 und -2, CD102) und das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1, CD106) auf ihren Zelloberflächen. Diese Adhäsionsmoleküle können sehr feste Bindungen mit den Leukozytenintegrinen CD11a/CD18 (Lymphozyten funktionsassoziiertes Antigen-1, LFA-1), CD11b/CD18 (Makrophage-1-Antigen, Mac-1), $\alpha 4\beta 1$ (engl. *very late antigen-4*, VLA-4) und $\alpha 4\beta 7$ (Lymphozyten Peyer's patch hochendotheliales Venolen-Adhäsionsmolekül-1, LPAM-1) eingehen. ICAM-1 bindet sowohl CD11a/CD18 als auch CD11b/CD18, ICAM-2 bindet hingegen nur CD11a/CD18, VCAM-1 sowie die Integrine $\alpha 4\beta 1$ und $\alpha 4\beta 7$ (Diamond u. a. 1990; Diamond u. a. 1991; Strauch u. a. 1994). Ein weiterer Effekt bei der Festigung der Adhäsion von neutrophilen Granulozyten und Monozyten an das Endothelium ist das Abflachen der Zellen verursacht durch die Cytoskelettveränderung, die durch die ICAM-1-Bindung vermittelt wird (Wang & Doerschuk 2001; Yang u. a. 2005). Im vierten und letzten Abschnitt wandern die neutrophilen Granulozyten und Monozyten durch die Zwischenräume des Endothels entlang eines Chemokinkonzentrationsgradienten der Makrophagen zum Infektionsherd im Gewebe (Burns u. a. 1997). Zur sogenannten Transmigration nutzen die Zellen ihre zelleigenen Proteasen (Gelatinase B, Elastase), die über Degranulation ausgeschüttet werden. Diese Proteasen lösen im intrazellulären Raum die extrazelluläre

Matrix der Endothelzellen, wie beispielsweise die Laminin- und Kollagen TypIV- enthaltene Basalmembran, auf. Durch die entstandenen Lücken wird den Zellen die Durchwanderung der Endothelzellschicht ermöglicht (Delclaux u. a. 1996; Wang u. a. 2005). Weitere an der Transmigration beteiligte Proteine sind zum Beispiel das transmembrane Protein PECAM-1 (Plättchen endotheliale Zelladhäsionsmolekül-1, CD31) (Muller u. a. 1993; Vaporciyan u. a. 1993; Liao u. a. 1995; Yan u. a. 1995; Liao u. a. 1997), das in Desmosomen gelegene JAM-C (Junctionales Adhäsionsmolekül C) (Chavakis u. a. 2004; Zen u. a. 2004), $\alpha 6 \beta 1$ -Integrine (Dangerfield u. a. 2002; Wang u. a. 2005) und das auf Leukozyten und interendothelialen Kontaktflächen befindliche CD99 (Muller 2002; Schenkel u. a. 2002; Lou u. a. 2007). PECAM-1 ist ein 130kDa Glykoprotein und kommt in hohen Mengen in Zell-Zell-Kontakten (*Tight Junctions*) von Endothelzellen vor, aber auch auf neutrophilen Granulozyten, Thrombozyten, Monozyten und einigen T-Zelltypen (Stockinger u. a. 1990; Albelda u. a. 1991). Wohingegen JAM-C in den Desmosomen von Endothelzellen sowie auf einigen anderen Zelltypen, wie T-Zellen, Natürlichen Killer-Zellen und Thrombozyten, nachgewiesen werden konnte. Die transepitheliale Migration wird vom endothelialen JAM-C durch seine Bindung an das neutrophile Integrin CD11b/CD18 (Mac-1) vermittelt (Chavakis u. a. 2004; Zen u. a. 2004). Das $\alpha 6 \beta 1$ -Integrin ist ein Rezeptor für Laminin auf Leukozyten und wird in diesen Zellen verstärkt exprimiert und präsentiert, sofern es eine Interaktion zwischen dem PECAM-1 auf den Leukozyten und dem PECAM-1 auf den Endothelzellen gibt (Dangerfield u. a. 2002; Wang u. a. 2005). Die wichtige Rolle von PECAM-1 bei der Transmigration der neutrophilen Granulozyten durch das Endothel konnte anhand von Studien gezeigt werden, wo die Transmigration durch die Behandlung der endothelialen Zellen oder der neutrophilen Granulozyten mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen PECAM-1 oder mit löslichen, rekombinanten PECAM-1 inhibiert werden konnte (Muller 1995a; Muller 1995b).

Am Infektionsort werden die Pathogene von den Makrophagen und den neutrophilen Granulozyten mittels Ausbildung von Pseudopodien (Scheinfüßchen) umschlossen oder durch Invagination (Einstülpungsvorgang) in die Zellen aufgenommen und phagozytiert. Die Phagozytose wird hierbei durch die Bindung der sogenannten „PAMPs“ (Pathogen-assoziierte molekulare Muster, wie beispielsweise bestimmte Peptide, Lipopolysaccharide oder Nukleinsäuren) der Pathogene an die Muster-erkennende Rezeptoren (PRR) der Granulozyten und Makrophagen ausgelöst (Kogut u. a. 2003; Chalifour u. a. 2004). Ein wichtiges Beispiel für die PRR sind die Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR). Zu diesen Rezeptoren gehören zum Beispiel der Toll-ähnliche Rezeptor 4, welcher zusammen mit einem myeloiden Differenzierungsfaktor 2 Lipopolysaccharide erkennen kann, oder der Toll-ähnliche Rezeptor 2, welcher unter anderen Lipoproteine von Mykoplasmen und Bakterien detektiert. Bei der Phagozytose verschmilzt die Pathogen-enthaltene Vakuole (Phagosom) mit dem Lysosom, wobei das freigesetzte Lysozym die Bakterienwand auflöst, damit die ebenfalls freigesetzten Hydrolasen die restlichen Proteine, Lipide und Nukleinsäuren

hydrolysieren können. Des Weiteren nutzen neutrophile Granulozyten beim Abbau von Pathogenen ihre Fähigkeit kurzlebige, reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species; ROS) freizusetzen (Martins u. a. 2003). Dieser Vorgang wird als „respiratorischer Burst“ bezeichnet und dient dazu, die pathogenen Zellbestandteile mittels dieser Sauerstoffradikale zu oxidieren und pathogene Proteaseinhibitoren zu inhibieren. Beim „respiratorischen Burst“ wird molekularer Sauerstoff (2 O_2) mit Nikotinamadenindinukleotidphosphat (NADPH) in zwei reaktiven Hyperoxidanionen (auch Superoxidanionen genannt, 2O_2^-) sowie NADP^+ (oxidierte Form des Nikotinamadenindinukleotidphosphats) und einem Proton (H^+) umgewandelt. Diese Reaktion wird durch das Enzym NADPH-Oxidase katalysiert. Des Weiteren können diese zwei Hyperoxidanionen mit 2 Protonen (2H^+) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Sauerstoff (O_2) disproportionieren. Diese Reaktion wird wiederum mit Hilfe der Superoxiddismutase katalysiert. Das Wasserstoffperoxid wird bei Anwesenheit von Sauerstoffradikalen und Chloridionen mittels der Myeloperoxidase in hypochlorämische Säure (HOCL) umgewandelt. Nach der vollständigen Phagozytose des Erregers oder nach Ablauf einer bestimmten Lebensdauer im Blut gehen die neutrophilen Granulozyten in den programmierten Zelltod (Apoptose) mit terminaler Phagozytose durch Makrophagen über. Durch diesen Schritt soll das umliegende Gewebe oder die Blutgefäße nicht durch die Freisetzung der cytotoxischen Inhaltsstoffe der neutrophilen Granulozyten zerstört werden (Savill u. a. 1989). Anhand von zahlreichen Chemokinen wie beispielsweise Interleukin-4 (IL-4) (Girard u. a. 1997), Interleukin-6 (IL-6) (Biffi u. a. 1996) und Interleukin-8 (IL-8) (Kettritz u. a. 1998), aber auch durch Cytokine wie Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF) (Escribano u. a. 1998; Yasui u. a. 2002), Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF) (Yamamoto u. a. 1993) und Interferon-alpha und -gamma (INF- α und γ) (E. Sakamoto u. a. 2005) kann diese Apoptose verzögert werden. Dies ist ein wichtiger Punkt, denn so können die neutrophilen Granulozyten im entzündeten Gewebe verweilen und weitere Zellen zur Entzündungsbekämpfung rekrutieren und dort anreichern.

Die für die unspezifische Immunabwehr neutrophiler Granulozyten benötigten Enzyme sind in intrazellulären Granula gespeichert. Dabei unterscheidet man die Granula aufgrund ihrer gespeicherten Proteine in primäre (azurophile), sekundäre (spezifische), Gelatinase-haltige (tertiäre) und sekretorische Granula. In den primären Granula sind neben der Myeloperoxidase auch Lysozym, Proteasen wie Elastase und Proteinase 3, Defensine, Hydrolasen und Kathepsin G gespeichert. Wohingegen die sekundären Granula unter anderem Laktoferrin, alkalische Phosphatasen und Proteinasen sowie Fc γ -Rezeptoren, Komplement-Rezeptoren und wiederum Lysozym enthalten. Ebenso beinhalten die sekundären Granula das in dieser vorliegenden Arbeit behandelte Neutrophilen Antigen 1 (NB1, CD177) (Stroncek u. a. 1990; Goldschmeding u. a. 1992). In der dritten Form der Granula, den tertiären Granula, sind unter anderem Gelatinase, Lysozyme und andere

Proteine wie beispielsweise Cytochrom b_{558} und CD11b gespeichert (Lehrer & Ganz 1990; Borregaard & Cowland 1997; Hampton u. a. 1998). Die in den verschiedenen Granula gespeicherten Proteine können bei Bedarf von den neutrophilen Granulozyten in kürzester Zeit zur Zelloberfläche rekrutiert werden, wo sie spezifische Funktionen übernehmen. Es ist der Zelle auch möglich, den gesamten Inhalt der Granula in das extrazelluläre Milieu abzugeben. Dieser Prozess wird als Degranulation bezeichnet. Die sezernierten Proteine sollen dort im umliegenden Milieu Pathogenabwehrfunktionen erfüllen.

Zusätzlich zu den durch verschiedene Pathogene ausgelösten neutrophilen Granulozyten-vermittelten Entzündungen gibt es toxische Ursachen und solche, die im Rahmen immunologischer Reaktionen auftreten. Zur letzten Kategorie gehört die ANCA-induzierte neutrophilen-vermittelte Inflammation. Die Besonderheiten dieser Entzündungsabläufe werden im den folgenden Abschnitten beschrieben.

1.5. ANCA-Zielantigene

ANCA-assoziierte Vaskulitiden sind durch das Auftreten von Anti-Neutrophiler cytoplasmatischer Autoantikörper charakterisiert, die sich in ihrem Immunfluoreszenzmuster an Ethanol-permeabilisierten neutrophilen Granulozyten in p (perinukleäre)-ANCA und c (cytoplasmatische)-ANCA unterscheiden lassen. Beide ANCA-Muster gehen in der Immunfluoreszenz mit distinkten Antigenspezifitäten einher. Die Hauptzielantigene der ANCA sind Myeloperoxidase (MPO) und Membran-Proteinase 3 (mPR3). Kürzlich wurde über ein weiteres ANCA-Antigen berichtet, das lysosomale Membranenglykoprotein-2 (LAMP-2) (Kain u. a. 1995; Kain u. a. 2008). Die klinische Bedeutung von LAMP-2 wird derzeit allerdings noch kontrovers diskutiert und weitere Untersuchungen bleiben abzuwarten (Roth u. a. 2012; Kain u. a. 2012).

1.5.1. Das ANCA-Zielantigen Myeloperoxidase

Falk und Jennette zeigten 1988, dass das hauptsächliche Zielantigen der p-ANCA die Myeloperoxidase (MPO) ist (Falk & Jennette 1988). Darüber hinaus existieren seltene, klinisch jedoch unbedeutende, granulozytäre Proteine, wie beispielsweise Elastase, Laktoferrin und Cathepsin G (Falk & Jennette 1988). Die p-ANCA treten bei der mikroskopischen Polyangiitis, beim Churg-Strauss-Syndrom und bei der isolierten pauci-immunen extrakapillär-proliferativen Glomerulonephritis auf.

MPO ist ein 745 Aminosäuren langes Protein in neutrophilen Granulozyten und Monozyten. Das *MPO*-Gen ist auf dem Chromosom 17 lokalisiert und kodiert für ein 150kDa-Protein, welches aus 2 kleinen 15kDa- und 2 großen 60kDa-Untereinheiten zusammengesetzt ist. MPO macht etwa ein bis fünf Prozent des gesamten Zellproteins aus. Das Protein wird in den primären Granula der Zellen gespeichert und erst bei Zellaktivierung zur Membran transloziert und dort präsentiert. Neben der wichtigen Rolle vom MPO bei der Regulation von

Entzündungsprozessen spielt das Enzym eine katalytische Rolle beim Prozess der reaktiven Sauerstoffradikalbildung in neutrophilen Granulozyten. Hierbei oxidiert MPO Chloridionen (Cl^-) sowie Bromidionen (Br^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu Hypochlorit (HOCl) bzw. Hypobromit (HOBr) und Wasser (H_2O). Das dabei entstandene reaktive Hypochlorit bzw. Hypobromit kann wiederum andere Moleküle oxidieren, wodurch diese funktionell zerstört werden können. Des Weiteren können vom MPO neben den Chlorid- und Bromidionen auch Tyrosin, Stickstoffmonoxid (NO), Nitrit (NO_2) und Thiocyanat (SCN^-) oxidiert und chloriniert werden (Arnhold u. a. 2001).

1.5.2. Das ANCA-Zielantigen Membran-Proteinase 3

Beim Zielantigen der c-ANCA hingegen handelt es sich um die Membran-Proteinase 3 (mPR3) (Lesavre u. a. 1991; Gross u. a. 1993). Die c-ANCA kommen hauptsächlich bei der Wegenerschen Granulomatose, selten auch bei der mikroskopischen Polyangiitis und dem Churg-Strauss-Syndrom vor.

Das Gen für die Serinprotease PR3 liegt mit seinen fünf Exons auf dem Chromosom 19 und umfasst eine Länge von ca. 7,2 Kilobasen. Das *PR3*-Transkript kodiert für insgesamt 256 Aminosäuren, wovon die ersten 25 Aminosäuren für ein Signalpeptid, die Aminosäure 26. und 27. für ein Prodiptid und die letzten acht Aminosäuren des Proteins für ein Propeptid kodieren. Nach erfolgter Abspaltung dieser Proteinabschnitte, faltet sich PR3 zu einem enzymatisch aktiven Protein. Das reife PR3 enthält zwei N-Glykosylierung an den Aminosäuren 129 und 174 und besitzt bei einer Gesamtlänge von 221 Aminosäuren eine molare Masse von 29kDa (Uniprot-Eintrag P24158; Ensembl-Eintrag ENST00000234347). PR3 wurde erstmalig von Ohlsson und Olsson im Jahr 1973 beschrieben (Ohlsson & Olsson 1973). Es ist auch unter dem Namen Myeloblastin bekannt. Diese Namensgebung stammt von der frühzeitigen mPR3-Expression in neutrophilen Granulozyten und seiner großen Bedeutung bei der Differenzierung und Ausreifung dieser Zellen (Bories u. a. 1989). PR3 wird von den neutrophilen Granulozyten nach der Proteinsynthese in den primären und sekundären Granula gespeichert. Es konnte aber auch in sekretorischen Vesikeln nachgewiesen werden (Goldschmeding u. a. 1989). Das Protein PR3 kommt vorwiegend intrazellulär und in geringen Mengen extrazellulär auf der Zellmembran von neutrophilen Granulozyten vor (Halbwachs-Mecarelli u. a. 1995). Die Präsentation des Proteins auf der Zellmembran stellt sich bei der Detektion mittels Durchflusszytometrie als bimodales Muster dar (Halbwachs-Mecarelli u. a. 1995). Die Bezeichnung bimodales Muster beschreibt eine Konstellation eines durchflusszytometrischen Bildes bei dem zwei verschiedene Peaks für einen Zelloberflächenmarker detektiert werden (s. Abb. 5).

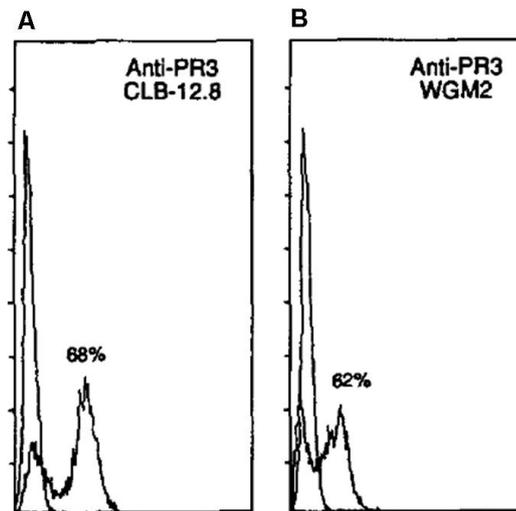


Abb. 5: Darstellung der bimodalen Expression von mPR3 auf der Zelloberfläche von frisch isolierten neutrophilen Granulozyten. Die durchflusszytometrische Analyse wurde mit zwei verschiedenen Antikörpern (A: Anti-PR3 CLB-12.8; B: Anti-PR3 WGM2) gegen das Protein PR3 durchgeführt. Zur Kontrolle wurde jeweils eine Färbung mit dem Maus IgG1-Antikörper mitgeführt (Halbwachs-Mecarelli u. a. 1995).

Dabei stellt der linke Peak in der Abbildung 5 die Population an Zellen dar, die negativ für mPR3 sind. Der weiter rechts befindliche Peak charakterisiert eine zweite Population von Zellen, die mPR3 auf ihrer Zelloberfläche tragen. Dieses bimodale Muster ist spezifisch für mPR3 und konnte bei keinem anderen Oberflächenmolekül nachgewiesen werden (Bangalore & Travis 1994; Schreiber u. a. 2004). Der Prozentsatz an mPR3-positiven neutrophilen Granulozyten (mPR3^{hoch}) variiert in der Bevölkerung zwischen null und 100 Prozent und er ist innerhalb einer gesunden Person ein Leben lang stabil (Halbwachs-Mecarelli u. a. 1995; Schreiber u. a. 2003; von Vietinghoff u. a. 2006). Aus der Literatur ist weiterhin bekannt, dass Patienten mit ANCA-assoziiertes Vaskulitis einen erhöhten Prozentsatz an mPR3^{hoch} exprimierenden neutrophilen Granulozyten aufweisen (Witko-Sarsat, Lesavre, u. a. 1999). Es wurde auch gezeigt, dass ein erhöhter mPR3-Prozentsatz mit einem schlechteren klinischen Verlauf und einer erhöhten Rezidivrate verbunden ist (Witko-Sarsat u. a. 1999; Rarok u. a. 2002; Schreiber u. a. 2005; Abdgawad u. a. 2006). mPR3 ist eine Serinprotease und spaltet beispielsweise Fibronectin, Laminin, Vitronectin, Elastin, Kollagen Typ IV und Hämoglobin (Rao u. a. 1991). Anhand dieser Funktion wird den neutrophilen Granulozyten eine Wanderung durch das Endothel und durch Gewebe erleichtert. Des Weiteren spielt mPR3 eine wichtige Rolle bei der myeloiden Zellreifung und bei der Abtötung von Bakterien (z.B. *Escherichia coli*) und Hefen (z.B. *Candida albicans*) (Scocchi u. a. 1992). Die Inhibitoren alpha-1-Antitrypsin und beta-2-Makroglobulin sind in der Lage die PR3-Funktion zu hemmen (Rao u. a. 1991). Die Aktivierung der neutrophilen

Granulozyten anhand von Cytokinen, wie z.B. mit TNF- α , führt zu einer erhöhten Menge an mPR3 auf dem einzelnen neutrophilen Granulozyten.

Der mögliche Einfluss der bimodalen mPR3-Expression als Risikofaktor für die ANCA-Entstehung und als Modulator des Krankheitsverlaufes wurde an mehreren Patientenkohorten untersucht. In Untersuchungen von Rarok und anderen im Jahr 2002 konnte gezeigt werden, dass in 89 untersuchten Patienten mit ANCA-assoziiierter Vaskulitis ein signifikant höherer Prozentsatz an mPR3^{hoch} exprimierenden neutrophilen Granulozyten im Gegensatz zu dem Prozentsatz in 72 gesunden Kontrollpersonen zu verzeichnen war (Rarok u. a. 2002). In Studien unserer Arbeitsgruppe, konnte gezeigt werden, dass es eine Korrelation zwischen dem Prozentsatz der mPR3-positiven neutrophilen Granulozyten und der Nierenfunktion bei Patienten mit Wegenerschen Granulomatose besteht. Ein hoher Kreatininwert konnte als ein Risikofaktor für das Auftreten der Krankheit, aber auch für die Nierenfunktion nach fünf Jahren Krankheitsverlauf identifiziert werden (Schreiber u. a. 2005). Schreiber und andere konnten weiterhin 2004 eine stärkere Aktivierung der mPR3^{hoch} exprimierenden neutrophilen Granulozyten durch eine *in vitro* Inkubation mit PR3-ANCA im direkten Vergleich zu den mPR3^{niedrigen} Zellen nachweisen (Schreiber u. a. 2004). Die stärkere Aktivierung äußerte sich in einer höheren Superoxidproduktion, einer verstärkten Degranulation und einer gesteigerten Aktivierung des Phosphoinositid-3-Kinase/Akt (Proteinkinase B)-Signalweges.

In weitergehenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten wir eine deutliche Korrelation zwischen den mPR3-Expressionen der neutrophilen Granulozyten in eineiigen (monozygotischen) Zwillingen nachweisen (Schreiber u. a. 2003), was auf einen starken genetischen Einfluss dieses Phänomens hindeutet. Dieser Zusammenhang der mPR3-Expression konnte im Gegensatz dazu in zweieiigen (dizygotischen) Zwillingen nicht gezeigt werden (s. Abb. 6).

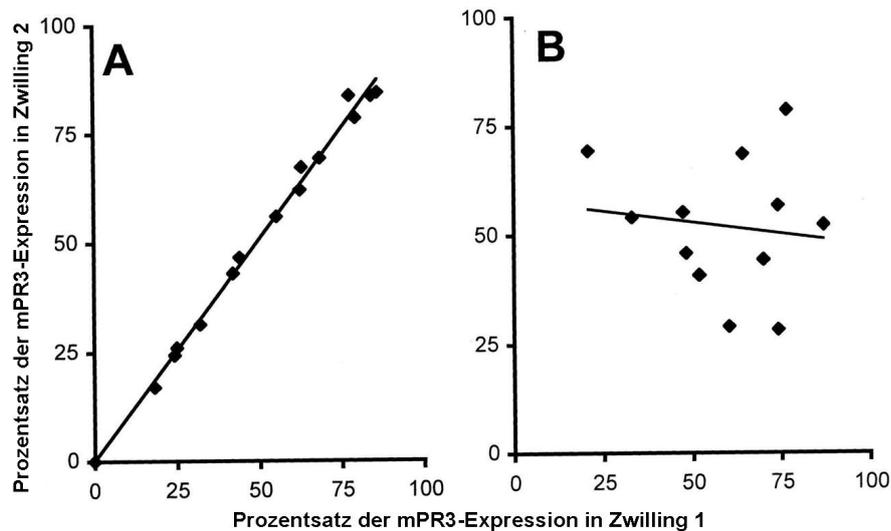


Abb. 6: Analyse des Prozentsatzes der mPR3 exprimierenden neutrophilen Granulozyten in eineiigen und zweieiigen Zwillingen. Der Prozentsatz der mPR3-Expression des ersten Zwilling (x-Achse) wurde gegen den mPR3-Expressionsprozentsatz des zweiten Zwilling (y-Achse) aufgetragen. Die Grafik A gibt die Untersuchung von 15 eineiigen Zwillingspaaren und die Grafik B die Untersuchung von 12 zweieiigen Zwillingspaaren wieder. In den eineiigen Zwillingen wurde eine signifikante Korrelation beider mPR3-Expressionsprozentsätze ($R=0,99$) nachgewiesen im Gegensatz zu den zweieiigen Zwillingen, die keine Korrelation ($R=0,06$) aufzeigten (Schreiber u. a. 2003).

Unsere Arbeitsgruppe untersuchte basierend auf diesen Ergebnissen 17 Geschwisterpaare, die in ihrem humanen Leukozytenantigen-System (HLA) sehr ähnlich waren. Die Typisierung der Geschwisterpaare für ihre Leukozytenantigene erfolgte im Zusammenhang für eine autologe Knochenmarktransplantation, wobei ein Geschwisterteil dem anderen Stammzellen spenden sollte. Die Ergebnisse zeigten, dass die Prozentsätze an mPR3-Expression der neutrophilen Granulozyten in den HLA-ähnlichen Geschwistern signifikant korrelierten und der mPR3-Phänotyp mit den HL-Antigenen im Zusammenhang stand (von Vietinghoff u. a. 2006; s. Abb. 7).

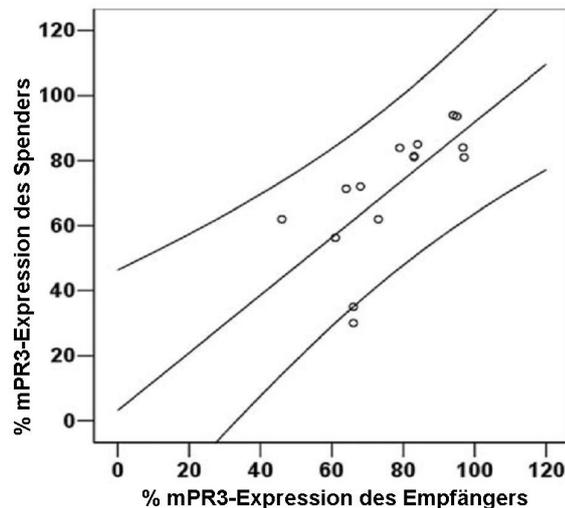


Abb. 7: Vergleich der Prozentsätze von mPR3-Expressionen auf neutrophilen Granulozyten von Geschwisterpärchen (Stammzellspender und Empfänger), die nach ihrer hohen Ähnlichkeit des HLA-Systems bei Knochenmarksspenden ausgewählt wurden. Die Bestimmung der Zellmembranenexpression von mPR3 auf den neutrophilen Granulozyten erfolgte im Vorfeld der Stammzelltransplantation mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Auf der x-Achse wurde der gemessene Prozentsatz der mPR3-Expression des Empfängers und auf der y-Achse der mPR3-Prozentsatz des Stammzellspenders festgehalten. Es konnte eine signifikante Beziehung zwischen den mPR3-Prozentsätzen mit der HLA-Ähnlichkeit festgestellt werden ($R=0.67$) (von Vietinghoff u. a. 2006).

Die statistische Betrachtung der Ergebnisse zeigte, dass das Stadium der Wegenerschen Granulomatose nicht durch einen einzelnen, sondern durch eine Kombination von 5 HL-Antigenen zuverlässig bestimmt werden konnte (s. Abb. 8).

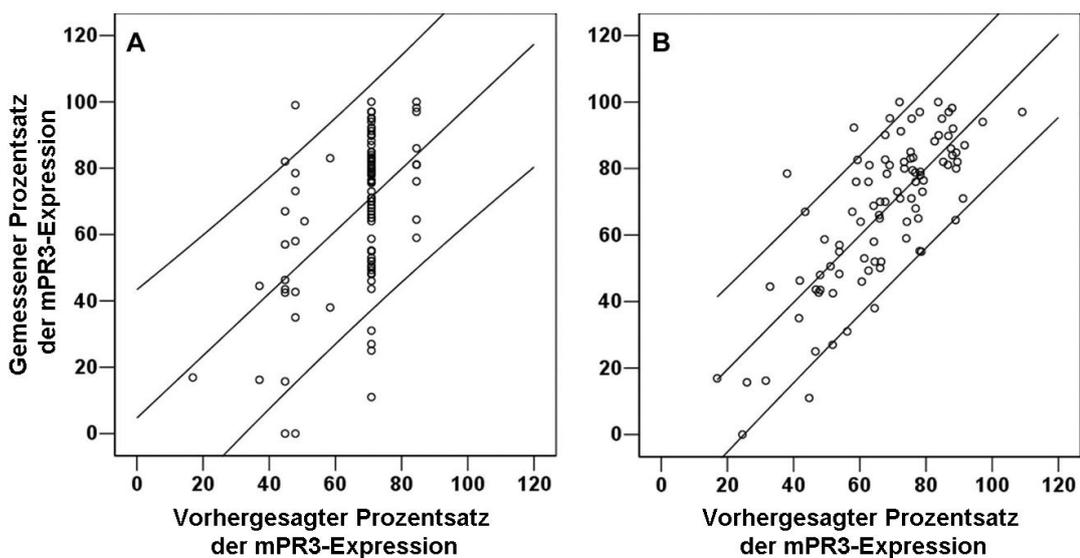


Abb. 8: Vergleich der gemessenen mit den vorhergesagten mPR3-Prozentsätzen von 51 Patienten mit Wegenerschen Granulomatose und 49 Kontrollpersonen. Es wurde mit Hilfe der HL-Antigene der vorhergesagte Prozentsatz an mPR3^{hoch} exprimierenden neutrophilen

Granulozyten (x-Achse) gegen den tatsächlich gemessenen mPR3-Prozentsatz (y-Achse) aufgetragen. Die Grafik A gibt die Ergebnisse der Vorwärtsregression ($r^2=0.28$, $P<0.001$) und die Grafik B die Ergebnisse der Rückwärtsregression ($r^2=0.64$, $P=0.001$) wieder (von Vietinghoff u. a. 2006).

Diese Befunde wiesen auf eine große klinische Bedeutung der bimodalen mPR3-Expression der neutrophilen Granulozyten hin. Bis zum Beginn dieser Arbeit war jedoch wenig darüber bekannt wie mPR3 auf der Zellmembran von neutrophilen Granulozyten präsentiert wird. Eine Arbeit von Goldmann und anderen im Jahr 1999 beschrieb, dass aufgereinigtes humanes PR3 über hydrophobe Interaktionen an einer *in vitro* hergestellten Lipiddoppelschicht haften konnte (Goldmann u. a. 1999). David und andere zeigten weiterhin 2003 in Lokalisationsstudien und Coimmunpräzipitationen, dass mPR3 mit dem Integrinkomplex CD11b/CD18 auf der Zellmembran von neutrophilen Granulozyten in Interaktion tritt (David u. a. 2003).

1.6. Die Entstehung von ANCA

Der Grund, warum die Toleranz gegen MPO und mPR3 durchbrochen wird und Autoantikörper im menschlichen Organismus gebildet werden, ist bislang noch ungeklärt. Es wurden jedoch Risikofaktoren, die das Auftreten der ANCA begünstigen, identifiziert. Hierzu gehören bestimmte genetische Hintergründe, wie das Auftreten einer bestimmten genetischen Konstellation des *alpha1-Antitrypsin*-Gens. Das Gen kodiert für den alpha1-Protease-Inhibitor. Der Inhibitor dient der Hemmung von Serinproteasen wie PR3, Elastase und Trypsin. Das Gen besitzt unterschiedliche polymorphe Ausprägungen, die zu zwei verschiedenen Phänotypen führen. Es wird von einem Phänotypen M, der für „normal“ steht, und von einem Phänotypen Z, der für die defiziente Form steht, gesprochen. Aufgrund der erhöhten Disposition des ZZ-Typs des *alpha1-Antitrypsin*-Gens bei Patienten mit einem positiven Nachweis für PR3-ANCA wurde ein Einfluss auf die Krankheit vermutet. Dieser Verdacht wurde jedoch kontrovers diskutiert (Elzouki u. a. 1994; Esnault u. a. 1997).

Pendergraft und andere versuchten hingegen 2002 die ANCA-assoziierte Vaskulitis durch eine ganz andere Hypothese zu erklären. Sie hypothesierten in ihrer Publikation (Pendergraft u. a. 2004), dass neben dem PR3 vom sense Strang der genomischen DNA ein weiteres komplementäres PR3-Protein (cPR3; engl. *complementary* PR3) vom antisense Strang der genomischen DNA kodiert wird. Diese beiden Proteine sollten miteinander in Interaktion treten. Sie zeigten anhand eines Mausmodells die Produktion von anti-idiotypischen Antikörpern gegen die variablen Strukturen der cPR3-Antikörper, welche wiederum mPR3 erkannten. Durch diese Interaktion der anti-idiotypischen Antikörper mit mPR3 auf neutrophilen Granulozyten sollte, nach Aussage der Autoren, ANCA-assoziierte

Vaskulitis ausgelöst werden. Diese Daten konnten von anderen Arbeitsgruppen bisher nicht bestätigt werden.

Neben den genetisch bedingten Risikofaktoren und der Theorie des cPR3 gibt es jedoch auch andere Einflüsse, bei denen gezeigt werden konnte, dass ANCA-assoziierte Vaskulitiden begünstigt werden können (de Lind van Wijngaarden u. a. 2008). So spielen Infektionen im Vorfeld der Erkrankung häufig eine wichtige Rolle. Stegemann und andere beschrieben im Jahre 1994 an 57 Patienten mit Wegenerscher Granulomatose (Stegeman u. a. 1994), dass in 60 bis 70 Prozent der Patienten chronisch das gram-positive Bakterium *Staphylococcus aureus* im Nasenraum nachgewiesen werden konnte und dass die Träger dieser Erreger eine höhere Rückfallquote (Rezidiv) für die Krankheit zeigten. In weiterführenden Studien von Stegemann und anderen wurde in 82 Prozent der 41 vorsorglich behandelten Patienten der Wegenerschen Granulomatose mit Cotrimoxazol eine deutlich Verringerung von Rezidiven nachgewiesen (Stegeman u. a. 1996). Cotrimoxazol ist ein Kombinationsmedikament von zwei Antibiotika, Trimethoprim und Sulfamethoxazol, zur Behandlung von Infektionen der oberen und unteren Atemwege. Damit wurde die Hypothese bestätigt, dass Infektionen ein Risikofaktor für die Krankheitsentstehung bzw. Rezidive sind. Des Weiteren wurde eine Infektion, verursacht durch den Parvovirus B19, als möglicher Risikofaktor für die Entstehung von ANCA-assoziiierter Vaskulitis diskutiert. In mehreren Studien konnte ein analoges Auftreten von akuten B19-Infektionen mit Wegenerscher Granulomatose beobachtet werden (Finkel u. a. 1994; Nikkari u. a. 1994; Corman & Staud 1995). Während der B19-Infektionen konnte auch das Auftreten von c- und p-ANCA nachgewiesen werden, deren Konzentration beim Abklingen der Infektionen ebenfalls zurückgingen (Chou u. a. 2000; Lehmann u. a. 2003; Hermann u. a. 2005). In den folgenden Jahren wurden weitere Risikofaktoren für das Auftreten von ANCA-assoziierten Vaskulitiden herausgearbeitet. Hierbei handelt es sich um Umwelteinflüsse wie eine hohe Exposition mit Quarzstäuben in der Industrie (Hogan u. a. 2001), Kokainmissbrauch (Trimarchi u. a. 2003), aber auch Nebenwirkungen von Medikamenten wie Propylthiourazil, die zur Behandlung einer Schilddrüsenüberfunktion eingesetzt werden (Yu u. a. 2007).

Insgesamt blieb die ANCA-Entstehung bislang jedoch unklar und daher sind weitere Studien notwendig, um die zugrunde liegenden Mechanismen zu identifizieren.

1.6.1. *In vitro* Untersuchungen der Interaktion von ANCA mit neutrophilen Granulozyten und Monozyten

ANCA stellen nicht nur ein Krankheitsmarker dar, sondern sind auch an der Krankheitsentstehung beteiligt. Erste Hinweise stammten aus *in vitro* Untersuchungen zur Interaktion der ANCA mit neutrophilen Granulozyten und Monozyten, die die Antigene MPO und mPR3 exprimieren. Diese Antigene werden vorrangig intrazellulär gespeichert und werden erst bei Zellaktivierung auf der Zellmembran präsentiert. Eine Ausnahme stellt

dabei mPR3 dar, denn für dieses Protein konnte bereits vor der Zellvoraktivierung eine geringe basale (bimodale) Zellmembranexpression nachgewiesen werden (Halbwachs-Mecarelli u. a. 1995). Csernok und andere zeigten 1994, dass eine Zellvoraktivierung durch Stimulation mit bereits niedrigen Konzentrationen an Cytokinen (z.B. TNF- α oder IL-8) oder mit Lipopolysacchariden (LPS) erzielt wird (Csernok u. a. 1994). Dabei werden die Proteine MPO und mPR3 über einen p38-mitogenaktivierten Proteinkinase (p38 MAPK)-regulierten Weg zur Zellmembran transloziert und dort präsentiert (Kettritz u. a. 2001). Zirkulierende ANCA können so ihre Zielantigene binden und die Zellen weiter aktivieren. Diese Aktivierung der neutrophilen Granulozyten wird bei mPR3 durch Fc γ -Rezeptoren, wie z.B. Fc γ RIIIa und Fc γ RIIIb, sowie durch eine Antigenquervernetzung auf der Zelloberfläche vermittelt (Porges u. a. 1994; Kettritz u. a. 1997; Kocher u. a. 1998). Falk und andere zeigten in ihrer Studie 1990, dass ANCA-aktivierte neutrophile Granulozyten reaktive Sauerstoffradikale produzieren, dosis-abhängig toxische Proteine aus ihren primären Granula degranulieren und eine erhöhte Adhäsion sowie eine veränderte Apoptose zeigen (Falk u. a. 1990). Lu und andere beschrieben 2006 die Freisetzung von Adenosin bei der Adhäsion von ANCA-aktivierten neutrophilen Granulozyten an Endothelzellen, wodurch reaktive Sauerstoffradikale vermindert produziert wurden (Lu u. a. 2006). Sie wiesen allerdings keinen inhibitorischen Effekt von Adenosin auf die Degranulation nach.

Des Weiteren wiesen Johnson und andere 1997 eine gesteigerte Expression des Adhäsionsmoleküls CD11b (engl. *adhesion molecule-1*; *Mac1*) nach. Anhand dieser Prozesse können die neutrophilen Granulozyten besser adhären, migrieren und phagozytieren. Zwei weitere Arbeitsgruppen zeigten 2001 bzw. 2004, dass ANCA auch einen Einfluss auf die Apoptose haben. Sie wiesen bei der *in vitro* Inkubation von ANCA mit neutrophilen Granulozyten eine erhöhte Apoptoserate, verursacht durch eine vermehrte Sauerstoffradikalbildung, nach (Harper u. a. 2001; Deutsch u. a. 2004). Die verstärkte Apoptoserate war von einer proinflammatorische Phagozytose durch Monozyten begleitet. Auf apoptotischen neutrophilen Granulozyten wurde des Weiteren eine verstärkte mPR3-Expression dokumentiert, wodurch die Zellen von zirkulierenden ANCA vermehrt erkannt und opsoniert wurden. Als Folge wurde eine gesteigerte Phagozytoserate dieser apoptotischen ANCA-opsonierten neutrophilen Granulozyten als auch eine vermehrte Produktion von proinflammatorischen Cytokinen durch die phagozytierenden Zellen (Makrophagen und Granulozyten) nachgewiesen (Moosig u. a. 2000; Harper u. a. 2001).

Anhand dieser vielfältigen *in vitro* Daten wurde eine ursächliche Rolle der ANCA im Entzündungsgeschehen der Vaskulitis vermutet. Diese Hypothese benötigt allerdings eine Bestätigung in der komplexen *in vivo* Situation. Im folgenden Abschnitt werden beispielgebende *in vivo* Daten diskutiert.

1.6.2. *In vivo* Untersuchungen mit ANCA auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten

Das ANCA anhand der Interaktion mit neutrophilen Granulozyten an der Entstehung von Vaskulitis beteiligt sind, konnten Xiao und andere erstmalig 2002 in einem Mausmodell bestätigen (Xiao u. a. 2002). Im Modell wurden Mäusen, bei denen das *MPO*-Gen ausgeschaltet wurde, mit Maus-MPO immunisiert. Die immunisierten Mäuse entwickelten anti-MPO Antikörper. In einem weiteren Schritt wurden Milzzellen (Splenozyten) von diesen Mäusen als auch von Kontrollmäusen in immuninkompetente *RAG2* (engl. *recombinase-activating gene-2*)-defiziente Mäuse intravenös injiziert. Die Splenozyten der MPO-immunisierten Tiere verursachten eine schwere nekrotisierende und proliferierende Glomerulonephritis, granulomatöse Entzündungen und eine systemische nekrotisierende Vaskulitis. Diese Befunde entsprachen denen der Patienten mit aktiver ANCA Vaskulitis. Um das pathologische Potential der anti-MPO-Antikörper allein zu untersuchen, wurden diese Antikörper aus immunisierten MPO-defizienten Mäusen isoliert und aufgereinigt. In Form eines passiven Mausmodells wurden diese Antikörper anschließend in Wildtyp-Mäuse (wt-Mäuse), mit intaktem MPO-Protein, intravenös injiziert. Als Folge bekamen auch diese Mäuse eine nekrotisierende und proliferierende Glomerulonephritis. Somit konnte die pathogenetische Rolle bzw. die Induktion von Vaskulitis und Glomerulonephritis durch die Anwesenheit von ANCA eindeutig nachgewiesen werden. Von dieser Arbeitsgruppe konnte in nachfolgenden Studien auch gezeigt werden, dass neutrophilen Granulozyten eine sehr wichtige Rolle bei der Entstehung der Krankheit einnehmen (Xiao u. a. 2005). Hierfür wurde im Vorfeld der Applikation von anti-MPO-Antikörpern eine Depletion der zirkulierenden neutrophilen Granulozyten an den Mäusen durchgeführt. Das Ergebnis zeigte, dass ohne die zirkulierenden neutrophilen Granulozyten die ANCA keine Vaskulitis mehr hervorrufen konnten.

Im gleichen Jahr wurde von Schlieben und anderen die Entstehung einer ANCA-assoziierten Vaskulitis sowie einer Glomerulonephritis, verursacht durch passiven anti-MPO-Antikörpertransfer beim Menschen, dokumentiert (Schlieben u. a. 2005). Es wurde ein Fall einer Frau beschrieben, die während ihrer Schwangerschaft ein Rezidiv ihrer ANCA-assoziierten Vaskulitis erlitt. Bei der Untersuchung des Nabelschnurblutes nach der Geburt des Kindes wurde ein ähnlicher MPO-ANCA-Titer wie bei der Mutter detektiert, wodurch ein passiver Antikörpertransfer von der Mutter auf das ungeborene Kind über die Plazenta nachgewiesen wurde. Es zeigte sich, dass 48 Stunden nach der Geburt beim Kind eine systematische Vaskulitis mit Lungeneinblutungen sowie Anzeichen einer Glomerulonephritis auftraten.

Die bestehenden Mausmodelle wurden von Adrian Schreiber, einen Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe, weiterentwickelt. Hierfür immunisierte er MPO-defiziente Mäuse mit Maus-MPO. Die Tiere entwickelten daraufhin anti-MPO-Antikörper. Im Gegensatz zum vorherigen

Model wurden diese Mäuse anschließend bestrahlt und bekamen Knochenmark von wt-Mäusen transplantiert. Da das Knochenmark der wt-Mäuse MPO-positive Knochenmarkzellen enthielten, bildeten die ursprünglich MPO-defizienten Mäuse nun MPO-positive neutrophile Granulozyten und Monozyten. Durch die Interaktion der MPO-ANCA mit den MPO-positiven neutrophilen Granulozyten entwickelten die Mäuse eine Albuminurie, eine Hämaturie, eine Leukozyturie und eine Proteinurie. In der histologischen Untersuchung zeigten alle Mäuse eine nekrotisierende und proliferierende Glomerulonephritis sowie eine systemische Vaskulitis (Schreiber u. a. 2006). In nachfolgenden Studien konnte auch eine Beteiligung des Anaphylatoxins C5a, einem Protein des Komplementsystems, bei der Entstehung von ANCA-assoziiierter Vaskulitis nachgewiesen werden (Schreiber u. a. 2009). Es konnte gezeigt werden, dass durch die Interaktion von C5a mit seinem Rezeptor (C5aR; engl. *complement component 5a receptor 1* bzw. CD88) auf neutrophilen Granulozyten, die ANCA-verursachte Zellaktivierung verstärkt wird. So entwickelten die im Mausmodell beschriebenen Tiere, die Knochenmark von C5a Rezeptor-defizienten Mäuse erhielten, keine nekrotisierende und proliferierende Glomerulonephritis und waren somit vor der Erkrankung geschützt.

Pfister und andere verfolgten 2004 analog zu Xiao einen anderen Versuchsansatz, indem sie PR3- als auch Elastase-doppeldefiziente Mäuse mit rekombinanten PR3 immunisierten (Pfister u. a. 2004). Die sich in diesen Tieren entwickelten PR3-ANCA wurden isoliert und in wt-Mäuse intravenös injiziert. Im Kontrast zum MPO-ANCA-Mausmodell entwickelten diese Mäuse keine pathologischen Befunde der Niere oder der Lunge. Der Grund für dieses Ergebnis ist bis heute noch unbekannt. Es kann spekuliert werden, dass die mPR3-Präsentation auf den Granulozyten der Maus nicht der des Menschen entspricht. Eine überzeugende mPR3-Positivität auf Mausgranulozyten konnte bisher nicht dargestellt werden. Pfister und andere konnten in dieser Studie lediglich durch die intradermale Applikation von TNF- α eine verstärkte Entzündung im Injektionsbereich dokumentieren.

Mit Hilfe der Tiermodelle, in Ergänzung zu den zahlreichen *in vitro* Daten, konnte eine kausale Beteiligung von anti-MPO Antikörpern an der Entstehung einer nekrotisierenden und proliferativen Glomerulonephritis und einer Vaskulitis nachgewiesen werden. Der *in vivo* Beweis zur pathogenetischen Rolle von anti-PR3 Antikörpern steht bisher noch aus.

1.7. CD177 - Humanes Neutrophilen-spezifisches Antigen 2A

Die Serinprotease PR3 ist ein Hauptzielantigen für cANCA und wird in einem bimodalen Muster auf der Zelloberfläche von neutrophilen Granulozyten präsentiert. In der Literatur konnte jedoch nicht geklärt werden, wie mPR3 auf der Zellmembran von neutrophilen Granulozyten präsentiert wird und welchem Mechanismus mPR3 dabei unterlegen ist. Temerinac u.a. beschrieben im Jahr 2000 CD177, einen Glykosyl-phosphatidylinositol (GPI)-verankerten Membranrezeptor, der ausschließlich von neutrophilen Granulozyten

exprimiert wird und ein Mitglied der Leukozyten-Antigen 6 Superfamilie ist (Temerinac u. a. 2000). CD177 ist auch unter den Namen „Humanes Neutrophilen-spezifisches Antigen-2A“, kurz HNA-2A, oder NB1 bekannt. Das Protein wurde erstmalig 1971 von Lalezari und anderen in Fällen mit neonataler alloimmuner Neutropenie beschrieben (Lalezari u. a. 1971). In der Studie wurden die Fälle von vier Familien mit 7 betroffenen Kindern beschrieben. Hierbei entwickelten die Mütter, die das CD177-Protein nicht in ihren neutrophilen Granulozyten exprimierten, während der Schwangerschaft Autoantikörper gegen die neutrophilen Granulozyten ihres ungeborenen Kindes. Diese Antikörper wurden diaplazentar übertragen und depletierten die neutrophilen Granulozyten des Kindes, wobei andere Blutzellen nicht betroffen waren. Nach der Geburt wurde bei den Kindern eine Neutropenie diagnostiziert, die jedoch nach spontanem Verschwinden der Antikörper reversibel war. Das CD177-Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 19 lokalisiert. Bekannt sind zwei polymorphe Allelausführungen, die in der Literatur als Proteinisoformen CD177 (NB1) und Polyzythämie rubra vera-1 (PRV-1) bekannt sind (Caruccio u. a. 2006). Das CD177-Protein zeigte ebenfalls ein bimodales Zellmembranenmuster auf den neutrophilen Granulozyten. Das Muster erinnerte an das von mPR3. Es konnte von Stroncek und anderen gezeigt werden, dass durch die Gabe des Peptidhormons Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (engl. *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*, G-CSF) die Membranexpression von CD177 (mCD177) pro Zelle als auch der Prozentsatz der mCD177-positiven neutrophilen Granulozyten (mCD177^{positiv}) erhöht werden kann (Stroncek u. a. 1998). Eine erhöhte Expression wurde auch während der Schwangerschaft beschrieben, wo der Einfluss von Hormonen wie Östrogen und Progesteron vermutet wird. Des Weiteren konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass 95 bis 100 Prozent der Patienten mit Polyzythämie rubra vera (PRV) eine erhöhte CD177-Genexpression aufwiesen (Temerinac u. a. 2000; Teofili u. a. 2002; Kralovics u. a. 2003; Liu u. a. 2003). Eine funktionelle Bedeutung dieses Befundes konnte bei der PRV bisher nicht nachgewiesen werden.

Insbesondere das bimodale Membranverteilungsmuster war mit einer Rolle von mCD177 als möglicher Rezeptorkandidat für mPR3 auf der Zellmembran von neutrophilen Granulozyten zu vereinbaren und stellte einen wichtigen Fokus unserer Untersuchungen in dieser Arbeit dar.

1.8. Zielstellung der Arbeit

Die Hypothese dieser Arbeit war es, dass ein mPR3-präsentierender Rezeptor für die hohe mPR3-Expression auf einer Teilmenge der neutrophilen Granulozyten verantwortlich ist.

1) Im ersten Teil der Arbeit sollte der Rezeptor für die mPR3-Präsentation identifiziert und mit Hilfe eines transienten Zelltransfektionsmodells verifiziert werden. Aufgrund der bisherigen Untersuchungen von unserer Arbeitsgruppe wurde CD177 als potentieller Rezeptorkandidat ausgewählt.

2) Im sich anschließenden Teil sollten die beiden Untergruppen der neutrophilen Granulozyten, mPR3^{hoch}/mCD177^{positive}- und mPR3^{niedrig}/mCD177^{negative} Zellen, charakterisiert werden. Dabei sollten die Merkmale Zellmorphologie, Proteinverteilung von mPR3 und seinem Rezeptor sowie die Genexpression untersucht werden. Die Charakterisierung sollte an zirkulierenden reifen neutrophilen Granulozyten und in einem Zellmodell neutrophil-differenzierter CD34-positiver hämatopoetischer Stammzellen erfolgen.

3) Im letzten Teil der Arbeit sollte die Charakterisierung der genetischen Expressionsregulation des mPR3-Rezeptors vorgenommen werden. Hierbei sollten verschiedene Hypothesen wie eine intrachromosomale Rekombination mit dem Rezeptor-Pseudogen, die Suche nach einer in der Literatur beschriebenen Deletion (engl. *copy number variation*), der Einfluss eines antisense-Transkriptes auf die Rezeptorgenexpression sowie der genomische Rezeptor-Bereich in Bezug auf Mutationen untersucht werden. Auch das Vorhandensein einer allelabhängigen Transkription, die möglicherweise zu einer differentiellen Rezeptorexpression in den neutrophilen Granulozyten führen könnte, sollte getestet werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Zelllinien und Bakterienstämme

2.1.1.1. Zelllinien

HEK293 Fibroblasten-ähnliche humane embryonale Nierenzellen, die in adhärenenten Monolayern wachsen; transformiert mit fragmentierter DNA von Adenovirus Typ5 (DSMZ).

2.1.1.2. Bakterienstämme (Derivate von *E.coli*)

Tabelle 1:

Stamm:	Genotyp: ^a	Hersteller:
TOP10	$F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \Phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74$ $recA1 araD139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R)$ $endA1 nupG$	Invitrogen, Karlsruhe, DE
TOP10F'	$F' \{lacI^q Tn10 (Tet^R)\} mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi 80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74 recA1 araD139 \Delta(ara-leu)7697$ $galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG$	Invitrogen, Karlsruhe, DE

^aGenotyp-Abkürzungen für *E.coli*: siehe Bachmann (1987)

2.1.2. Antikörper

Tabelle 2:

Antikörpername:	Klonalität:	Wirt: ^a	Methode: ^b	verwendete Verdünnung:	Hersteller:
Anti-CD177 (IgG1, Klon MEM166)	monoklonal	M	WB F Z	1µg/ml 5µg/ml 0,5µg/ 1x10 ⁷ Zellen	Exbio, Vestec, CZ
FITC-Anti-CD177 (IgG1, Klon MEM166)	monoklonal	M	F	5µg/ml	Biozol, Eching, DE
PE-Anti-CD177 (IgG1, Klon MEM166)	monoklonal	M	Z	5µg/ml 10µl/ 1x10 ⁷ Zellen	Santa Cruz, Santa Cruz, US
Anti-PR3 (IgG1, Klon 4A5)	monoklonal	M	WB F	0,1µg/ml 5µg/ml	Wieslab, Malmö, SE
Anti-PR3 (IgG1, Klon MCPR3-2)	monoklonal	M	F	5µg/ml	Dianova GmbH, Hamburg, DE
Anti-PR3 (IgG1, Klon CLB 12.8)	monoklonal	M	F Z	5µg/ml 1µg/ 1x10 ⁷ Zellen	Sanquin Reagents, Amsterdam, NL
Anti-mouse-IgG HPR	polyklonal	R	WB	0,25µg/ml	Dako, Hamburg, DE

Anti-rabbit-IgG HPR	polyklonal	G	WB	0,25µg/ml	Dako, Hamburg, DE
Anti-IgG1/RPE	monoklonal	M	F	5µg/ml	Dako, Hamburg, DE
FITC-Anti-IgG1	monoklonal	M	F	5µg/ml	Dako, Hamburg, DE
PE-Anti-IgG1	monoklonal	M	F	5µg/ml	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE
FITC-Anti-CD66b (IgG1, Klon 80H3)	monoklonal	M	F Z	5µg/ml 4,8µl/ 1x10 ⁷ Zellen	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, DE
Anti-CD16 (IgG1, Klon DJ130C)	monoklonal	M	F,Z	5µg/ml	Dako, Hamburg, DE

^a G = Ziege, M = Maus, R = Kanninchen, ^b F = FACS, Z = Zellsortierung, WB = Western Blot

2.1.3. Chemikalien, Reagenzien und Medien

Tabelle 3:

Produktname:	Hersteller:
1kb DNA Leiter	Invitrogen, Karlsruhe, DE
2-Propanol (Isopropanol)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Agarose LE	Biozym, Hamburg, DE
Agarose (Low Melting)	GIBCO/ Invitrogen, Karlsruhe, DE
Agarose (ultra pure)	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Acrylamid 30%/Bisacrylamid (37,5:1)	BioRad, München, DE
Alconox	Alconox, New York, US
Ammoniumperoxosulfat (APS)	BioRad, München, DE
Ampicillin	Sigma Aldrich, München, DE
Betain	Sigma Aldrich, München, DE
BigDye® Terminator v1.1, v3.1 5x Sequencing Buffer	Applied Biosystems, Foster City, US
blauer Dextran-EDTA-Ladepuffer	Applied Biosystems, Foster City, US
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Bradfordstammlösung	BioRad, München, DE
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, München, DE
BSA (Zellkulturqualität)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Chloroform:Isoamylalkohol (24:1)	Sigma Aldrich, München, DE
COT Human DNA	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Deoxycholate	Sigma Aldrich, München, DE
Deoxyribonucleic acid single stranded from human placenta	Sigma Aldrich, München, DE
DEPC behandeltes Wasser	Ambion/ Applied Biosystems, Foster City, US
Destilliertes Wasser	Merck, Darmstadt, DE
Destilliertes Wasser (RNase und DNase frei)	Sigma Aldrich, München, DE
Dextran T500	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
DMEM (Dulbecco's modified eagle Medium)	PAA, Pasching, AU
DMSO	Carl Roth, Karlsruhe, DE
dNTP Set Ultra pure (Desoxynukleosid-Triphosphat)	Promega, Mannheim, DE
DTT	BioRad, München, DE
EDTA	Sigma Aldrich, München, DE

EDTA-Lösung (0,5M, pH8,0)	GIBCO/ Invitrogen, Karlsruhe, DE
EGTA	Sigma Aldrich, München, DE
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethidiumbromidlösung 1%	Merck, Darmstadt, DE
Fetales Kälberserum (FCS, Fetal Calf Serum)	Biochrom, Berlin, DE
fms-ähnliche Tyrosinkinase-Rezeptor-3 (rekombinanter humaner FLT3)	Peptotech, London, UK
Formamid Ultra pure High Grade (Hi-Di)	Applied Biosystems, Foster City, US
FuGENE HD Transfektionsreagenz	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Gentamycin	PAA, Pasching, AU
Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (G-CSF)	Cell System, St Katharinen, DE
Giemsalösung	Sigma Aldrich, München, DE
Glycerin	Sigma Aldrich, München, DE
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Hank's Buffered Salt Solution (1x HBSS) mit Kalzium und Magnesium	PAA, Pasching, AU
Harnstoff	Sigma Aldrich, München, DE
Heringssperma DNA	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Hexanukleotid-Mix (10 x)	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
High Molecular Weight (MW) DNA Marker	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Histopaque-1083	Sigma Aldrich, München, DE
Lambda Leiter	BioRad, München, DE
L-Glutamin	PAA, Pasching, AU
Luria Broth Base	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Lymphozytenseparationsmedium LSM 1077	PAA, Pasching, AU
Magermilchpulver	BioRad, München, DE
Magnesiumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Magnesiumsulfat	Sigma Aldrich, München, DE
May-Grünwald-Lösung	Sigma Aldrich, München, DE
Natriumacetat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumcarbonat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumhydroxid Plätzchen	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natronlauge	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Nonidet P-40	Sigma Aldrich, München, DE
Orange G	Sigma Aldrich, München, DE
PBS (1x) ohne Kalzium und Magnesium	PAA, Pasching, AU
Penicillin / Streptomycin	PAA, Pasching, AU
Phenol	Sigma Aldrich, München, DE
Phenol/Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Phenol:Chloroform:Isoamyl Alkohol (25:24:1)	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), 1x konzentriert	PAA, Pasching, AU
PMSF	Sigma Aldrich, München, DE
Ponceau S-Lösung	Sigma Aldrich, München, DE
Protein Precision Plus Dual Color Standard	BioRad, München, DE
Random Primer	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Restriktionspuffer 1-4	NEB, Frankfurt a. M., DE
RNase Away®	Invitrogen, Karlsruhe, DE
RPMI 1640 mit Glutamin	PAA, Pasching, AU
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Sarkosyl (N-Lauroylsarcosine)	Sigma Aldrich, München, DE
Select Agar	Invitrogen, Karlsruhe, DE
SDS-Lösung 10% (Natriumdodezylsulfat)	GIBCO – Invitrogen, Karlsruhe, DE

S.O.C. Medium	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Stammzellfaktor (rekombinanter humaner SCF)	Peptech, London, UK
Stem-Spam-Medium	Cell System, St Katharinen, DE
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	BioRad, München, DE
Thrombopoietin (rekombinantes humanes TPO)	Peptech, London, UK
Tris	Sigma Aldrich, München, DE
Triton X 100	Sigma Aldrich, München, DE
Trizol® Reagent	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Tween 20	Sigma Aldrich, München, DE
X-Gal	Sigma Aldrich, München, DE
Zellwaschlösung	BD Biosciences, Heidelberg, DE
α-dCTPs 32P	NEN, Waltham, US

2.1.4. Enzyme und Kits

Tabelle 4:

Enzymname bzw. Kitname:	Hersteller:
<i>5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0</i>	Invitrogen, Karlsruhe, DE
A-Additionskit	QIAGEN, Hilden, DE
<i>Advantage-GC 2 PCR Kit</i>	Clontech, Mountain View, US
<i>BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit</i>	Applied Biosystems, Foster City, US
<i>BamH I, EcoR I, Hind III, Not I, Sac I, Sma I, Xba I</i>	NEB, Frankfurt a. M., DE
CD34-Antikörper-gekoppelte magnetische Beads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE
<i>DNase (RNase-frei)</i>	Promega, Mannheim, DE
<i>DNase (RNase-frei)</i>	QIAGEN, Hilden, DE
<i>Easy Pure DNA Purification Kit</i>	Biozym, Hamburg, DE
<i>ECL™ Western Blotting Analysis System</i>	GE Healthcare, München, DE
<i>Endotoxin free MAXI Prep Kit</i>	QIAGEN, Hilden, DE
<i>Exonuklease I (E.coli)</i>	NEB, Frankfurt a. M., DE
Fc-Block-Lösung	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE
<i>Klenow (Exonuclease-Free)</i>	USB, Cleveland, US
<i>QIAprep® Spin Miniprep Kit</i>	QIAGEN, Hilden, DE
<i>QIAGEN Plasmid Maxi Kit</i>	QIAGEN, Hilden, DE
<i>EndoFree Plasmid Maxi Kit</i>	QIAGEN, Hilden, DE
<i>Proteinase K</i>	Sigma Aldrich, München, DE
<i>Real-Time PCR Master Mix Plus</i>	Eurogentec, Köln, DE
<i>RNaseOUT</i>	Invitrogen, Karlsruhe, DE
<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>	USB Products Affymetrix, Cleveland, US
<i>SuperScript® III Reverse Transcriptase Kit</i>	Invitrogen, Karlsruhe, DE
<i>T4 DNA Ligase</i>	Invitrogen, Karlsruhe, DE
<i>TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing</i>	Invitrogen, Karlsruhe, DE
<i>pCR® 2 Vektor</i>	

2.1.5. Geräte und Laborhilfsmittel

Tabelle 5:

Gerät oder Laborhilfsmittel:	Hersteller:
Bakterieninkubator	Heraeus Instruments GmbH, Berlin, DE
CO ₂ Inkubator	Heraeus Instruments GmbH, Berlin, DE
Cytospin	Hettrich Universal, Düsseldorf, DE
ELISA-Reader Model 680	BioRad, München, DE
Entwicklungsmaschine	Kodak, Genf, CH
FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Feinwaage	Sartorius, Göttingen, DE
Gel Fotoeinrichtung BioDoc Analyze	Biometra, Göttingen, DE
Gießvorrichtung Agaroseblöcke Plug Mold	Biozym, Hamburg, DE
Heizrührer	IKA Labortechnik, Staufen, DE
Mikroskop-Nikon	Pegasus Scientific Inc., Rockville, US
Minigelelektrophoresekammer	BioRad, München, DE
Mini- und Midi Agarosegel-Elektrophorese-kammer	Biometra, Göttingen, DE
Nanodrop ND-1000	Thermo Scientific, Waltham, US
PCR System GeneAmp [®] 9700	Applied Biosystems, Foster City, US
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin, DE
Power Pac 200	BioRad, München, DE
Pulsfeldgelelektrophorese CHEF Mapper™	BioRad, München, DE
Cooling Module, Variable Speed Pump, Electrophoresis Cell	
Quantitative Real-Time-PCR: ABI Prism [®] 7700 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Foster City, US
Schüttelinkubator 3031 mit Heizfunktion	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, DE
Sequenzer 377	Applied Biosystems / Hitachi, Foster City, US
Sequenzer 3130xl Genetic Analyser	Applied Biosystems / Hitachi, Foster City, US
Semidry Blot Apparatur, Tank Blot	BioRad, München, DE
Speed Vac Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg, DE
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, DE
Vortex-Mixer	Scientific, New York, US
Vakuumentrifuge	Eppendorf, Hamburg, DE
Waage 444-45	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, DE
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, DE
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, DE
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, DE
Biofuge Fresco	Heraeus Instruments GmbH, Berlin, DE

2.1.6. Plasmidvektoren

Tabelle 6:

Plasmidvektor:	Hersteller:
pCMV-Sport6	Invitrogen, Karlsruhe, DE
pCRII-, pCR2.1-TOPO	Invitrogen, Karlsruhe, DE
pcDNA4 Frame C und Frame B	Invitrogen, Karlsruhe, DE
pDrive	QIAGEN, Hilden, DE

Die dazugehörigen Vektorkarten sind dem Anhang (7.1.) zu entnehmen.

2.1.7. Software / Internetseiten

Tabelle 7:

Name:	Hersteller:
Cell Pro Quest	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Data Collection Software V3.0 3130xl	Applied Biosystems / Hitachi, Foster City, US
Genetic Analyser	
Excel, Powerpoint Microsoft, Word [®] 2002	Microsoft, Unterschleißheim, DE
NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, US
Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, US
Photoshop 7.0	Adobe, München, DE
Primer3	Howard Hughes Medical Institute, Chevy Chase, US und National Institutes of Health, National Human Genome Research Institute, Bethesda, US
UCSC Genome Browser, http://genome.ucsc.edu/	University of California, Santa Cruz, US
RepeatMasker Web Server	Institute for Systems Biology, National Human Genome Research Institute, Rockville Pike, US

2.1.8. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8:

Name:	Hersteller:
<i>Adhesive PCR Film</i>	ABgene, Waltham, US
Kryoröhrchen	Nunc, Langenselbold, DE
Zellschaber	Nunc, Langenselbold, DE
<i>Centri Sep Spin Columns</i>	emp Biotech GmbH, Berlin, DE
Deckgläser	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH, Braunschweig, DE
Einmalinjektionskanülen (18G, 26G)	B.Braun, Melsungen, DE
Einmalpipetten (2, 5, 10, 25ml)	Corning Incorporated, Corning, US
<i>Gel Blotting-Papiere</i>	BioRad, München, DE
Faltenfilter	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Filter 2,0µm	Serva, Heidelberg, DE
Frischhaltefolie	Carl Roth, Karlsruhe, DE
<i>Hyperfilm MP (5x7, 8x10 inches)</i>	GE Healthcare, München, DE
<i>Hyperfilm[®] ECL</i>	GE Healthcare, München, DE
<i>MicroAmp[®] optical 96-well Reaction Plate</i>	Applied Biosystems, Foster City, US
Monovette-EDTA	SARSTEDT AG, Nümbrecht, DE
Monovette-Heparin	SARSTEDT AG, Nümbrecht, DE
Multifly [®]	SARSTEDT AG, Nümbrecht, DE
Multiwell –Zellkulturplatten (6 und 96 Loch)	TPP, Trasadingen, CH
Nitrozellulosemembran	Whatman, München, DE
Nylonmembran Hybond ⁺ XL	Amersham Biosciences, München, DE
Objektträger Superfrost Plus	Thermo Scientific, Braunschweig, DE
Parafilm [®]	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Pasteurpipetten 230mm	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Petrischalen (D= 100 mm)	Nunc, Langenselbold, DE
Pipettenspitzen (steril, nichtsteril / 0,1-10, 10-100, 100-1000µl)	Starlab, Ahrensburg, DE
Reaktionsgefäße „Eppis“	Biozym, Hamburg, DE Eppendorf, Hamburg, DE

Round Bottom Tubes (Polystyrene, 5ml) with and without Cell-Strainer-Cap	Becton Dickinson, Franklin Lakes, US
Spritzen (5ml, 20ml)	B.Braun, Melsungen, DE
Spritzen (50ml, mit Graduierung)	B.Braun, Melsungen, DE
TISSU-Tücher	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tücher (Sequenzierplattenreinigung)	hygi.de GmbH & Co, Telgte, DE
Venenpunktionsbesteck Venofix® (Butterfly)	B.Braun, Melsungen, DE
Whatman 3MM Filterpapiere	Whatman, München, DE
Zellkulturflaschen (25, 75 cm ²)	TPP, Trasadingen, CH
Zentrifugenröhrchen (15, 50ml)	TPP, Trasadingen, CH

2.1.9 verwendete Primer

Alle verwendeten Primer für Klonierungen, Sondengenerierungen für die Southern Blot-Analysen, Quantitative Real-Time-PCR und die 5' RACE sind im Anhang 7.2. (Tabelle 9-13) mit ihren Sequenzen und Schmelztemperaturen zusammengefasst.

2.1.10 Puffer und Lösungen

2.1.10.1. Puffer und Lösungen DNA-Gelelektrophoresen

10x TAE Elektrophoresepuffer 1 l

0,4M Tris Base
0,01M Natrium-EDTA pH 8,0
11,42ml konz. Essigsäure

10x TBE Elektrophoresepuffer 1 l

0,89M Tris Base
0,89M Borsäure
0,02M Natrium-EDTA pH 8,0

6x DNA-Probenpuffer

0,02% Bromphenolblau
50% Glycerin

Orange G Ladepuffer

50% Glycerin
0,5M Natrium EDTA pH 8,0
0,5% Orange G

2.1.10.2. Puffer und Lösungen für Southern Blot-Methode

20x SSC pH 7,0

3M NaCl
0,3M Natriumcitrat x 2H₂O
pH7,0 mit 10N NaOH
→Autoklavieren

20x SSPE pH7,4

3M NaCl
0,2M NaH₂PO₄
0,02M EDTA
pH7,4 mit 10N NaOH

Wasch Puffer I

2x SSC
0,1% SDS
0,005M Natriumphosphat-Puffer pH6,8

Wasch Puffer II

0,1 x SSC
0,5% SDS

TE-Puffer

0,01M Tris-HCl pH8,0
0,001M EDTA

2.1.10.3. Puffer und Lösungen für mikrobiologische Methoden**LB Medium 1l**25g *Luria Broth Base*

→Autoklavieren

+ 100µg/ml Ampicillin

LB Agar25g *Luria Broth Base*

6g Select Agar

→Autoklavieren

+ 100µg/ml Ampicillin

2.1.10.4. Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden**PMN-Lysepuffer 500µl**1x Lysepuffer^a10µl Mix^b0,2mM Na₃VO₄

1% Nonidet P-40

20mM PMSF

190µl ddH₂O**2x Lysepuffer^a**

40mM Tris-HCl pH8,8

276mM NaCl

20% Glycerin

4mM EDTA

2% Triton-X-100

Mix^b

0,056M Quercetin

0,56µg/µl Leupeptin

0,56µg/µl Aprotinin

0,28M Iodoacetamid

**10x Elektrophoresepuffer
1l [pH 8,3]**

0,25M Tris Base

1,92M Glycin

1% SDS

4x Lämmli-puffer

0,125M Tris-HCl pH6,8

20% SDS

20% Glycerin

0,02% Bromphenolblau

10% β-Mercaptoethanol

TBS-T

0,14M NaCl

0,02M Tris-HCl pH7,5

0,04% Tween-20

**Anoden-Transferpuffer
(unten):**

0,3M Tris-HCl pH7,5

20% vergällter Ethanol

**Kathoden-Transferpuffer
(oben):**

0,025M Tris-HCl pH7,5

0,04M Glycin

20% vergällter Ethanol

Stripping-Puffer

100mM β-Mercaptoethanol

2% SDS

62,5mM Tris-HCl pH6,7

Trenngel 10% 15ml

5ml 30% Acrylamid/

Bisacrylamid

3,8ml 1,5M Tris-HCl pH8,8

0,15ml 10%SDS

5,885ml ddH₂O

0,15ml APS

0,015ml TEMED

Trenngel 12% 15ml

6ml 30% Acrylamid/

Bisacrylamid

3,8ml 1,5M Tris-HCl pH8,8

0,15ml 10%SDS

4,885ml ddH₂O

0,15ml APS

0,015ml TEMED

Sammelgel 5% 5,0ml

0,83ml 30% Acrylamid/

Bisacrylamid

0,3125ml 2M Tris-HCl pH6,8

0,05ml 10%SDS

3,7525ml ddH₂O

0,05ml APS

0,005ml TEMED

2.2. Methoden

2.2.1. Bioinformatische Methoden

2.2.1.1. Oligonukleotiddesign

Das Primer-Design für die Amplifikation von Klonierungs- und Sequenzierungsprimern erfolgte mit Hilfe des Programms „Primer3“. Hierbei wurden folgende Kriterien berücksichtigt:

Primerlänge	: 18-27bp
Annealing-Temperatur der Primer	: maximale Temperaturdifferenz von 5°C zwischen einem Primerpaar $4^{\circ}\text{C} \times (n_{\text{G+C}}) + 2^{\circ}\text{C} \times (n_{\text{A+T}})$
GC-Gehalt der Primer	: ca. 50%

Die Primer und Sonden für die Amplifikation der Gene mittels quantitativer Real-Time-PCR wurden mit Hilfe der Software „Primer Express Version 1.5“ von der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems erstellt. Basierend auf folgenden Bedingungen:

Primerlänge	: minimal 18bp, maximal 40bp
Annealing-Temperatur der Primer	: minimal 58°C, maximal 60°C, maximale Temperaturdifferenz von 2°C
GC-Gehalt der Primer	: minimal 20%, maximal 80%
Amplikonlänge	: minimal 50bp, maximal 150bp
Annealing – Temperatur des Amplikons	: maximal 85°C
Eigenschaften der 5' FAM TM - 3' TAMRA TM - markierten Sonde	: 1) die optimale Sondenlänge liegt zwischen 24 und 30bp 2) die Annealing-Temperatur der Sonde muss mindestens 10°C höher sein als die der Primer 3) die Sonde sollte am 5' Ende nicht mit der Base G beginnen 3) die Sonde sollte bei einer Länge von 20 bis 30 Basen einen GC-Gehalt von 40 bis 60% und einen Schmelzpunkt von 70°C aufweisen. 4) das 5'-Ende der Sonde sollte maximal 50bp vom 3'-Ende des Primers liegen, damit die Sonde durch die erste gebundene

Polymerase hydrolisiert wird
5) mehr als drei Nukleotide eines Typs
in Folge sollten vermieden werden,
besonders Poly-(G)-Bereiche

Die Primer, die in Zusammenhang mit dem 5' RACE Kit von der Firma Invitrogen benutzt werden sollten, wurden unter Erfüllung folgender Kriterien ausgesucht:

Primerlänge : 25-30bp

Annealing – Temperatur der Primer : >72°C

GC-Gehalt der Primer : 50-70%, aber der GC-Gehalt am 3' Ende sollte gering sein

Beim Design aller Primer und Sonden wurde darauf geachtet, dass repetitive Elemente (Repeats), palindromische Sequenzabschnitte, 3' Komplementaritäten zwischen den Primern und Homologien zum humanem Genom vermieden wurden. Die Spezifität der ausgewählten Primer sowie der Sonden wurde im Anschluss mittels der NCBI-Datenbank Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) getestet.

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma BioTez (Campus Berlin Buch) synthetisiert.

2.2.1.2. Sondendesign und -herstellung für die Southern Blot-Methode

Die Sonden für die Untersuchung der genomischen Rekombination mittels Southern Blot wurden so gelegt, dass sie zum einem das *CD177*-Gen als auch hoch homologe Regionen im Pseudogen detektierten. Hierfür wurden 2 verschiedene Sonden ausgewählt, mittels PCR amplifiziert, geextrahiert und zur Absicherung und Sequenzierung in den Vektor pCRII kloniert. Eine der beiden Sonden war Exon 4 und 5 des *CD177*-Gens überspannend (800bp) und die andere Sonde lag über dem Bereich des Exon 9 und der 3'UTR des *CD177*-Gens (810bp). Für die Deletionsuntersuchungen wurde die Sonde von 800bp so gelegt, dass diese downstream des *CD177*-Gens und des Pseudogens lag, jedoch noch den Deletionsbereich detektieren würde. Die erwarteten Amplikons wurden im Vorfeld auf repetitive Elemente mittels des RepeatMasker Web Servers untersucht und auf genomweite humane homologe Sequenzen mit Hilfe der NCBI-Datenbank Blast getestet, um eine hohe Spezifität beim Southern Blot zu gewährleisten.

Alle verwendeten Primer mit ihren Sequenzen und den entsprechenden Schmelztemperaturen (T_m) sind im Anhang 7.2. zusammengefasst.

2.2.2. Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Polymerase Chain Reaktion)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine *in vitro* Technik zur Amplifikation einer spezifischen Nukleinsäuresequenz flankiert durch zwei Oligonukleotid-Primer, die von Mullis und anderen entwickelt wurde (Bartlett & Stirling 2003; Mullis 1990a; Mullis 1990b). Dieses Verfahren läuft in drei sich wiederholenden Schritten ab. Zunächst wird die Template-DNA bei hohen Temperaturen denaturiert. Im zweiten Schritt lagern sich die Oligonukleotid-Primer bei einer definierten Temperatur (Annealing-Temperatur) gegenläufig an die komplementären DNA-Einzelstränge des eingesetzten DNA-Fragments. Die Annealing-Temperatur richtet sich nach dem Gehalt an Guanin/Cytosin-Basen, die die Primer beinhalten. Nach der Anlagerung der Oligonukleotide ergänzt eine thermostabile DNA-Polymerase den DNA-Einzelstrang zwischen den beiden mit Primern besetzten Enden zum Doppelstrang mittels zugefügter Desoxynukleosid-Triphosphaten (dNTPs). Dieser Prozess wird ca. 30-35mal wiederholt, wodurch es zu einer exponentiellen Amplifikation der gewünschten Nukleinsäuresequenz kommt. Bei den durchgeführten PCR-Reaktionen wurden verschiedene Polymerasen verwendet. Zum einen wurden einige Amplifikationen mit dem *Advantage[®] GC 2 PCR Kit* von der Firma Clontech (Mountain View, US) durchgeführt. Dieses Kit enthält eine Mischung aus einer *TITANIUM[®] Thermus aquaticus (Taq)*-Polymerase mit einer nukleasedefizienten N-terminalen Deletion der Taq-DNA-Polymerase und einem *TaqStart[®]*-Antikörper, um eine automatische *Hot-Start*-PCR zu gewährleisten, und einen geringen Anteil einer thermostabilen DNA-Polymerase mit proofreading Aktivität. Dieses Polymerase-Kit eignet sich in Kombination mit seinem Dimethylsulfoxid (DMSO)-enthaltenen Puffer sowie beim Einsatz des enthaltenen GC-Melt-Mix oder von Betain sehr gut zur Amplifizierung von GC-reichen Sequenzen bzw. von DNA-Fragmenten mit schwieriger Sekundärstruktur. Zum anderen wurde bei den PCR-Reaktionen auch eine einfache thermostabile *Vent[®]* DNA-Polymerase mit integrierter 3'→5' proofreading Exonukleaseaktivität von der Firma New England BioLabs (NEB, Frankfurt a. M., DE) für einfache Amplifizierungen eingesetzt.

In den folgenden Tabellen (14 und 15) ist für beide Polymerase-Kits ein exemplarisches Protokoll für die Ansätze als auch die PCR-Bedingungen dargestellt.

Tabelle 14:

Ansätze:	<i>Advantage GC 2</i> Polymerase Kit [µl]:	<i>Vent[®]</i> DNA- Polymerase [µl]:
DNA (30ng/µl)	:1,00	1,00
5 x Puffer (17,5mM Mg(OAc) ₂ , 25% DMSO)	:3,00	–
10 x Puffer (20mM MgSO ₄)	: –	1,50
5' Primer (10pmol/µl)	:0,15	0,15
3' Primer (10pmol/µl)	:0,15	0,15
dNTPs (10mM)	:0,40	0,40

Enzym	:0,30 (50x)	0,20 (2U/μl)
MgSO ₄	: –	2,00 – 3,50 mM
ddH ₂ O	:5,20 – 10,00	3,80 – 11,60
Betain (5M)	:0 – 1,60M	0 – 1,60M
DMSO (100%)	: -	0 – 5,00%
Gesamtvolumen	:15,00	15,00

Tabelle 15:

PCR-Bedingungen:	<i>Advantage GC 2</i> Polymerase Kit [°C]:	<i>Vent</i> [®] DNA-Polymerase [°C]:
Initialisierung/ Denaturierung	:94 / 3'	95 / 5'
Denaturierung	:94 / 30"	94 / 30"
Annealing	:XX / 30"	XX / 30"
Extension I	:68 / XX"	72 / XX"
Extension II	:68 / 5'	72 / 10'
Kühlphase	:4 / ∞	4 / ∞
Zyklen	:30 – 35	30 – 35

Nach Beendigung der Amplifikation wurde eine Aliquot im Agarosegel überprüft.

2.2.2.2. Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus PCR-Ansätzen für Sequenzierungen

Damit PCR-Produkte direkt nach der PCR in Sequenzierungsansätzen (Kapitel 2.2.2.10.) verwendet werden können, müssen die verwendeten Primer als auch die verbliebene einzelsträngige DNA abgebaut werden. Hierfür werden 2-7,8μl PCR-Produkt mit 2μl *Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)* und 0,2μl *Exonuklease I* in einem Endvolumen von 10μl für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Enzyminaktivierung durch eine Inkubation von 15min bei 72°C.

2.2.2.3. Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels Gelelektrophorese

Zur Analyse von PCR-Ansätzen, DNA-Präparationen, Restriktionsverdau (analytisch) und zur Isolierung von DNA-Fragmenten (präparativ) wurde die DNA (in 1x DNA-Probenpuffer oder Orange G) in horizontalen Agarosegelen ihrer Größe nach aufgetrennt. Die DNA wandert bei dieser Methode aufgrund ihrer negativen Ladung der Phosphatgruppen des Zucker-Phosphat-Rückgrats zur Anode. Die Laufgeschwindigkeit ist dabei von mehreren Faktoren wie der Größe der DNA-Fragmente, der Agarosekonzentration, der Höhe der angelegten Spannung, der Art des Laufpuffers und des interkalierenden Farbstoffs abhängig. Die Konzentration der Agarosegele variierte je nach aufzutrennender Fragmentgröße zwischen 0,8%-2,0% (w/v). Als Laufpuffer wurde vorrangig 1x TBE-Puffer verwendet. Bei den Gelen für die Southern-Blot-Methode (MAXI-Gelelektrophorese) mit fragmentierter, hochmolekularer DNA diente 1x TAE als Laufpuffer. Vorteil von TBE gegenüber von TAE ist, dass der Puffer eine höhere Pufferkapazität besitzt. Allerdings wandert doppelsträngige, lineare DNA 10% schneller bei gleicher Auflösung durch TAE als durch TBE, was bei den großen DNA-Fragmenten für die Southern Blot-Methode sehr vorteilhaft ist. Die

Elektrophorese erfolgte bis auf die Southern Blot-Agarosegele mit einer konstanten Spannung von (10V/cm) für etwa 45-60min bei Raumtemperatur. Bei den Agarosegelen für die Southern Blots hingegen wurde die DNA bei 2,5V/cm (50V) für 4-5h einlaufen gelassen und die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 1,5V/cm (30V). Als Größenstandard wurden stets 1µg der 1kb-DNA-Leiter mitgeführt. Bei den Agarosegelen für die Southern Blots hingegen wurde neben 0,83µg einer 1kb-DNA-Leiter auch 15µl denaturierter High Molecular Weight DNA Marker (5min denaturiert bei 65°C) versetzt mit 3µl Orange G zur Größenanalyse geladen. Zur UV-Detektion wurde Ethidiumbromid immer als interkalierender Farbstoff mit einer Endkonzentration von 0,001µg/ml im Agarosegel eingesetzt. Bei der MAXI-Gelelektrophorese erfolgte die Anfärbung erst nach dem Elektrophoreselauf für 15min in 1l einer 0,001µg/ml Ethidiumbromidlösung. Die Detektion konnte hierbei aber erst nach einer weiteren Inkubation von 30min in destilliertem Wasser, wodurch überschüssiges Ethidiumbromid entfernt wird, durch Anlegen eines Lineals erfolgen. Nach Entfernung der Probekammern des Gels wurde das Southern Blot-Agarosegel erneut mit angelegtem Lineal dokumentiert. Die Detektion der DNA-Fragmente wurden durch Interaktion mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid unter UV-Licht einer Wellenlänge von 302nm sichtbar gemacht und mit dem Geldokumentationssystem „BioDoc Analyze“ von Biometra fotografiert.

2.2.2.4. Restriktionsverdau von DNA

Bei der Restriktion von DNA wurden die Restriktionsendonukleasen des Typs II in den entsprechenden Reaktionspuffern nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Für einen präparativen Verdau wurden 1µg DNA und 10U Enzym der Firma New England Biolabs in einem Volumen von 20µl verwendet. Die Reaktionsansätze wurden 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Bei einem analytischen Verdau wurden ca. 2µg DNA mit 5U bis 10U Enzym der Firma New England Biolabs in einem Reaktionsvolumen von 20µl inkubiert. Durch Zugabe von ein Sechstel Volumen 6x Probenpuffer wurde die Reaktion gestoppt und anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen.

2.2.2.5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung der geschnittenen DNA-Fragmente wurden die Restriktionsansätze auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt, um kontaminierende Enzyme und Puffersalze zu entfernen. Im Anschluss wurden die gewünschten DNA-Banden mit entsprechender Größe mittels eines Skalpell unter langwelligem UV-Licht ausgeschnitten. Langwelliges UV-Licht wird deshalb verwendet, weil UV-induzierte Mutationen in den DNA-Fragmenten vermieden werden sollen. Die Extraktion der DNA-Konstrukte aus dem Agarosegel erfolgte mit einem *Easy Pure DNA Purification Kit*

(Biozym, Hamburg, DE) entsprechend den Herstellerangaben. Die Elution der DNA-Fragmente erfolgte stets in 20µl destilliertem Wasser.

2.2.2.6. Ligation von DNA-Fragmenten in einen Expressionsvektorvektor (Subklonierung)

Bei einer Ligation werden die Enden linearisierter DNA-Fragmente verbunden. Hierfür wurden sie nach Möglichkeit mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten, um identische kohäsive Enden zu erhalten. Nach der Aufreinigung (Isolierung von DNA-Fragmenten, Kapitel 2.2.2.5) wurde je ein 2µl Aliquot des DNA-Inserts und des geschnittenen Expressionsvektors auf ein Agarosegel aufgetragen. Anhand der DNA-Mengen wurde die Ligation der DNA-Inserts mit den Vektoren im Verhältnis von 8:1 in einem Endvolumen von 15µl angesetzt. Der Reaktionsansatz wurde bei 65°C für 5min im Thermomixer inkubiert, um eventuelle Sekundärstrukturen aufzulösen. Anschließend wurde der Ansatz bei Raumtemperatur für 10min abgekühlt und je 4µl 5x T4-Ligasepuffer und 1µl *T4-Ligase* (1U) zugesetzt. Die Religationsrate wurde durch einen Ansatz ohne Zugabe eines DNA-Inserts ermittelt. Die Ligationsansätze wurden über Nacht in der PCR-Maschine bei 16°C inkubiert und konnten anschließend in chemisch kompetente *E.coli*-Zellen transformiert werden (Kapitel 2.2.3.1.)

2.2.2.7. TOPO-TA-Klonierung

Zur schnellen Klonierung von PCR-Produkten in einen Klonierungsvektor wurde das TOPO-TA-Klonierungskit von der Firma Invitrogen und das pDrive-Klonierungskit der Firma QIAGEN verwendet. Bei dieser Methode macht man sich die Transferaseaktivität der Taq-Polymerase zu nutze, bei der die Polymerase ein einzelnes Desoxyadenosin an die 3' Enden der synthetisierten DNA-Stänge anhängt. Alternativ konnte diese Reaktion separat mit einem A-Additionskit der Firma QIAGEN nach Herstellerangaben durchgeführt werden. Bei der TOPO-TA-Reaktion hybridisiert das Desoxyadenosin mit dem 3'-Thymidinüberhängen des linear vorliegenden pCRII und pCR2.1-Vektors. Bei dem pDrive-Vektor liegen hingegen 3'-Uracilüberhänge vor. Die komplementären Enden von pCRII-Vektor bzw. pCR2.1-Vektor und PCR-Produkt werden durch eine an den Vektor gebundene Topoisomerase I effektiv miteinander ligiert. Hierbei wurden immer 4µl des PCR-Produktes mit 1µl Vektor und 1µl Salzlösung für 30min bei Raumtemperatur inkubiert, um in Anschluss 2µl des Ansatzes in chemisch kompetente *E.coli*-Zellen zu transformieren (Kapitel 2.2.3.1.). Neben einem *LacZ*-Gen zur Blau-Weiß-Selektion und den Resistenzgenen Ampicillin und Kanamycin verfügen die Vektoren über eine umfangreiche multiple Klonierungsstelle (siehe Vektorkarten im Anhang 7.1.), welche eine gute Subklonierung der Inserts in Expressionsvektoren ermöglicht.

2.2.2.8. DNA-Plasmidpräparation aus *E.coli*-Zellen

Im Anschluss an die Transformation (Kapitel 2.2.3.1) der Plasmid-DNA in *E.coli*-Zellen und dem Ausplattieren der Bakterien auf selektiven Agarplatten wurden Einzelkolonien in je 3ml selektivem LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Plasmid-DNA unter Verwendung des *QIAprep® Spin Mini prep Kit* (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dabei wird das Bakterienpellet mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen, die Proteine gefällt und anschließend die DNA über eine Säule gereinigt und konzentriert. Die Elution der DNA erfolgte in 50µl destilliertem Wasser.

Für die Präparation größerer Mengen an DNA wurde die Ausgangskolonie als eine 160ml Bakterienkultur angezogen. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte mit einem *QIAprep® Plasmid Maxi Kit* (QIAGEN, Hilden) bzw. für endotoxinfreie DNA-Präparationen mit dem *EndoFree Plasmid Maxi Kit* (QIAGEN, Hilden) entsprechend den Herstellerangaben. Je nach Größe des DNA-Pellets wurde die DNA in 100µl oder 200µl destilliertem Wasser resuspendiert.

2.2.2.9. DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Quantifizierung der isolierten DNA-Menge aus der Maxi-Präparation oder zur Bestimmung der RNA-Menge wurden je 2µl der DNA- bzw. RNA-Lösung 1:50 mit Wasser verdünnt und photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm vermessen. Die Basen der Nucleinsäuren haben bei dieser Wellenlänge ihr Absorptionsmaximum. Eine Absorption (A₂₆₀) von 1 entspricht einer Nucleinsäurekonzentration von 50µg/ml bei doppelsträngiger DNA wohingegen RNA bei einer Absorption (A₂₆₀) von 1 eine spezifische Nucleinsäurekonzentration von 40µg/ml besitzt. Die meisten Proteine haben ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm. Als Maß für die Reinheit der Lösung wird der Quotient aus A₂₆₀/A₂₈₀ gebildet. Liegt dieser Quotient zwischen 1,8 und 2,0 gilt die DNA-Lösung als rein. Bei Bestimmung der Reinheit von RNA-Präparationen ist auch der Quotient von A₂₆₀/A₂₃₀ von hoher Bedeutung, da Phenolationen, Thiocyanate und organische Verbindungen ihr Absorptionsmaximum bei 230nm haben. Eine RNA-Lösung gilt als rein, wenn der Quotient aus der A₂₆₀ und A₂₃₀ zwischen 1,8 und 2,0 liegt.

Die Formel zur Berechnung der Nucleinsäurekonzentration lautet:

Konzentration [µg/ml] = A₂₆₀ x 50µg/ml bzw. 40µg/ml x 50 (Verdünnungsfaktor)

Im späteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde die DNA- als auch die RNA-Konzentration ausschließlich mit Hilfe des Nanodrop ND-1000 von der Firma Thermo Scientific (Waltham, US) bestimmt, da mit diesem Gerät eine höhere Genauigkeit bei der Konzentrationsbestimmung durch Wegfall der Verdünnungsschritte erzielt werden konnte.

2.2.2.10. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen der DNA wurde unter Verwendung des *BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* der Firma Perkin Elmer Applied Biosystems nach der Kettenabbruchmethode von Sanger (Sanger u. a. 1977) durchgeführt. Hierbei werden Desoxynukleosid-Triphosphate zusammen mit markierten Didesoxynukleosid-Triphosphaten (ddNTP), deren freie Hydroxyl-Gruppe am 3'-Ende fehlen, eingesetzt. Letztere führen bei einer fortlaufenden Polymerasereaktion mit nur einem Primer zu einem Kettenabbruch der DNA-Synthese. Die Didesoxy-Analoga der vier verschiedenen Desoxyribonukleotide sind jeweils mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff kovalent verbunden. Die Synthese-Produkte sind verschieden lange, einzelsträngige DNA-Fragmente, die jeweils um 1 Didesoxynukleosid-Triphosphat verlängert sind. Diese DNA-Fragmente werden elektrophoretisch aufgetrennt, wobei die 4 verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe der ddNTPs mit einem Laser angeregt werden und sie daraufhin Licht verschiedener Wellenlängen emittieren, welches wiederum von einer CCD Kamera detektiert wird. Dabei entsteht eine Serie von Banden, deren Fluoreszenzspektren die Basenfolge der sequenzierten DNA repräsentiert. Die elektrophoretische Auftrennung, Fluoreszenzdetektion und Datenanalyse wurde zu Beginn der Doktorarbeit in einem Plattensequencer 377 (Applied Biosystems, Hitachi, Foster City, US), und später in einem automatischen Sequenziergerät, Sequencer 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems, Hitachi, Foster City, US), durchgeführt. Der Sequenzierungsansatz, war aus folgenden Komponenten aufgebaut (Tabelle 16):

Komponenten:	Plasmid-DNA:	PCR-Produkte:
DNA	:1,00µg	8,00µl
Primer (10pmol/µl)	:1,00µl	0,75µl
<i>Big Dye® Terminator Mix</i>	:2,00µl	2,00µl
<i>BigDye® Terminator 5x Sequencing Buffer</i>	:2,00µl	3,00µl
ddH ₂ O	:0 - 4,00µl	1,25µl
Gesamtvolumen	:10,00µl	15,00µl

Die PCR-Bedingungen für die Sequenzierungsansätze waren wie folgt (Tabelle 17):

Phase:	Plasmid-DNA Temperatur [°C]/ Zeit:	PCR-Produkte Temperatur [°C]/ Zeit:
Initialisierung/ Denaturierung		96 / 3'
Denaturierung	:96 / 10''	96 / 10''
Annealing	:50-60 / 5''	50-60 / 10''
Extension	:60 / 4'	60 / 4'
Kühlphase	:4 / ∞	4 / ∞
Zyklen	:25	25

Die Sequenzierungsgele für den Plattensequencer 377 (Applied Biosystems, Hitachi, Foster City, US) wurden stets selbst gegossen. Dafür mussten zunächst die 48cm langen Glasplatten gründlich mit dem Detergenz Alconox gereinigt und anschließend mit doppelt

bidestillierten Wasser abgespült und mit fusselfeien Tüchern abgetrocknet werden. Die Gel-Lösung, bestehend aus 18g Harnstoff, 6,3ml 40% Acrylamid, 23,0ml destilliertem Merck Wasser und 5,0ml 10x TBE-Puffer, wurde mittels eines 2,0µm Filter filtriert und anschließend mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entgast. Nach Zusammenbau der Glasplatten mit den 0,3mm dicken Spacern und den Klammern wurde die Gel-Lösung mit 250µl 10% APS und 30µl TEMED versetzt und das Gel unter Zuhilfenahme einer 50ml Spritze schnellstmöglich und blasenfrei gegossen. Im Anschluss wurde das Gel horizontal gelagert, ein Blindkamm eingesetzt und nach 15min mit Frischhaltefolie eingeschlagen, damit das Gel während des Auspolymerisierens nicht austrocknen konnte. Nach 2h wurden die Glasplatten erneut von außen gereinigt, der Blindkamm wurde aus dem polymerisierten Gel entfernt und dafür ein Kamm mit Haifischzähnen eingesetzt. Anschließend wurden die Glasplatten mit dem Gel in den Sequenzer eingebaut und die Proben entsprechend aufgetragen.

2.2.2.11. Aufreinigung der Sequenzreaktion

Zur Aufreinigung der Sequenzreaktionen wurden 2 verschiedene Techniken angewandt. Zum einen eine Ethanol-Präzipitation und zum anderen eine Aufreinigung unter Verwendung von *Centi Sep Spin Columns* (Princeton Separations, Adelphia, US).

2.2.2.11.1. Ethanol-Präzipitation

Bei der Ethanol-Präzipitation wird durch Fällung der DNA überschüssige Desoxynukleosid-Triphosphate, Didesoxynukleosid-Triphosphate (ddNTP), Polymerase und Puffersalze entfernt. Diese Methode kam zum Einsatz, sofern sehr viele Sequenzierungsansätze gleichzeitig aufgereinigt werden sollten, da diese Ethanolfällung in einer 96-Loch-Platte durchgeführt werden konnte. Die DNA-Fällung wird durch Zusatz von fünffachen Volumen an 96-prozentigem Ethanol und ein Zehntel des Endvolumens an 3M Natriumacetat pH 5,2 ausgelöst. Das Gemisch wurde nach einer Inkubation von 15min bei Raumtemperatur für 30min bei 3000g zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand entfernt und 200µl 80-prozentiges Ethanol wurde zum DNA-Pellet hinzugefügt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt von 15min bei 3000g wurde der Überstand schnellstmöglich verworfen und eine Überkopfzentrifugation von 10sek bei 100g zur Eliminierung von etwaigen Ethanolresten durchgeführt. Anschließend wurde die DNA für 10min bei Raumtemperatur luftgetrocknet, in 10µl destillierten Merck-Wasser resuspendiert und mit 7µl Formamid (Hi-Di) versetzt. Der Sequenzierungsansatz wurde vor der Sequenzierung für 2min bei 95°C denaturiert, auf Eis schnell abgekühlt und kurz abzentrifugiert. Die Sequenzierung in 96-Loch-Platten erfolgte ausschließlich am 16-Kapillarsequenzer 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Hitachi, Foster City, US).

2.2.2.11.2. Aufreinigung der Sequenzieransatzes mittels *Centi Sep Spin Columns*

Die Aufreinigung von Sequenzieransätzen mittels *Centi Sep Spin Columns* (Princeton Separations, Adelphia, US) wurde mit leichten Abwandlungen, wie von Hersteller angegeben, durchgeführt. Nach Quellung der Säulen über Nacht in 800µl destilliertem Merck-Wasser ließ man die Säulen vor der Zentrifugation von 2min bei 3000rpm und Raumtemperatur zuerst abtropfen und das überschüssige Wasser wurde vor der Zentrifugation entfernt. Anschließend wurde der Sequenzieransatz auf die Säule aufgetragen ohne das Säulenmaterial zu beschädigen und es folgte eine erneute Zentrifugation von 2min bei 3000rpm in ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß. Die aufgereinigte DNA umfasste ein Volumen von ca.10-15µl und wurde mit Formamid (*Hi-Di*) auf ein Volumen von 17µl komplettiert. Im Anschluss wurden die DNAs mit dem 16-Kapillarsequenzier 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Hitachi, Foster City, US) analysiert. Die Sequenzieransätze, welche mit dem Plattensequenzier 377 (Applied Biosystems, Hitachi, Foster City, US) analysiert werden sollten, wurden ohne vorherige Zugabe von Formamid mittels einer Vakuumzentrifuge eingeengt. Das erhaltene DNA-Pellet wurde anschließend in 4µl eines Farbmixes, bestehend aus ein Fünftel blauen Dextran-EDTA-Ladepuffer und vier Fünftel Formamid, aufgenommen und für 3min bei 92°C denaturiert.

2.2.2.12. 5' RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*)–Methode

Zur Amplifizierung und Charakterisierung von unbekanntem 5'-Enden einer cDNA wurde das *5' RACE Kit* von der Firma Invitrogen eingesetzt. Die 5' RACE basiert auf der „*anchored*“ (Anker)-PCR Methode, die erstmals von Loh und anderen 1989 beschrieben wurde (Loh u. a. 1989). Diese Technik ist besonders vorteilhaft bei Genen mit geringer Kopienzahl an mRNA. Im der folgenden Abbildung 9 ist der Ablauf der Methode kurz dargestellt.

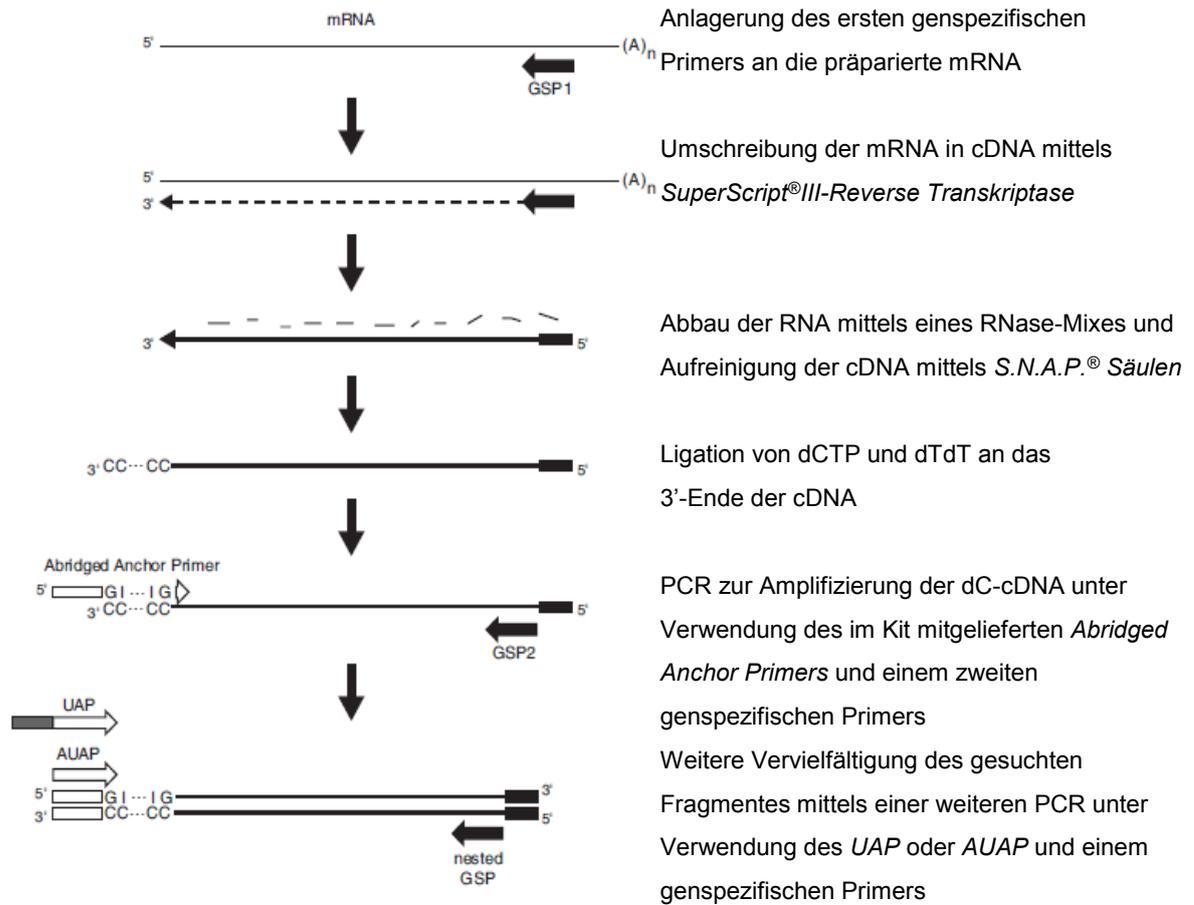


Abb. 9: Graphische Darstellung 5' RACE-Methode. Die Abkürzungen bedeuten Genspezifischer Primer 1 und 2 (GSP1 und GSP2), *Universal Amplification Primer (UAP)* und *Abridged Universal Amplification Primer (AUAP)* (verändert nach der Herstelleranleitung des Kits).

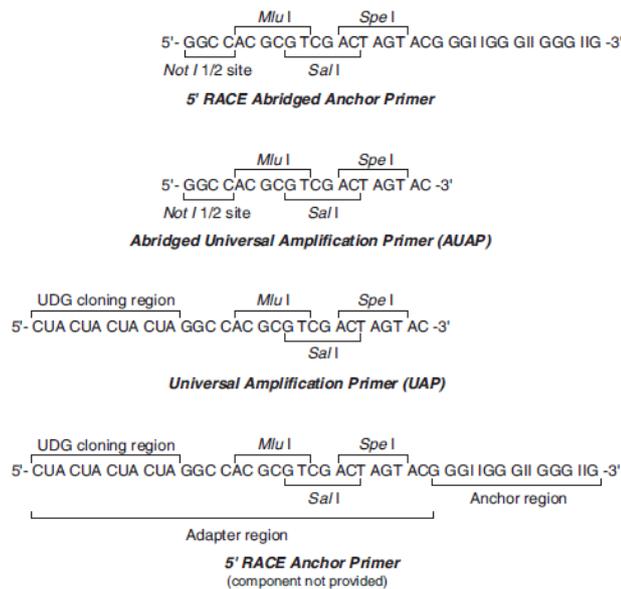


Abb. 10: Sequenzen und Restriktionsschnittstellen der 5' RACE-Primer (Herstelleranleitung des Kits).

Die Generierung der 5' RACE-Produkte erfolgte abgewandelt von den Herstellerangaben und werden daher folgend aufgeführt.

2.2.2.12.1. Erststrang cDNA-Synthese für die 5' RACE und Abbau der RNA

Es wurden 4,4µg mRNA aus neutrophilen Granulozyten mit 60pmol genspezifischen Primer CD177-848 revers auf 12µl mit destilliertem Wasser komplettiert und anschließend für 5min bei 70°C inkubiert, um unspezifische Bindungen und Sekundärstrukturen der mRNA zu entfernen. Nach einer Abkühlungsphase von 1min auf Eis wurde der Ansatz kurz abzentrifugiert und mit 4µl 5x Erststrang-Puffer, 1µl 10mM Desoxynucleosid-Triphosphat-Mix und 1µl 100mM Dichlordiphenyltrichlorethan versetzt. Der Ansatz wurde vorsichtig vermischt und für 5min bei 60°C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf 55°C abgekühlt und nach Vermischung mit 1µl *SuperScript[®]III-Reverse Transkriptase* und 1µl *RNaseOUT* wurde dieser für 60min bei 55°C inkubiert. Nach Ablauf der Erststrangsynthese wurde das Enzym durch Inkubation von 15min bei 70°C inaktiviert. Der Abbau der RNA erfolgte durch Zugabe und Inkubation von 30min bei 37°C mit 40U *RNase-Mix*. Nach diesem Schritt konnte der Ansatz bei -20°C gelagert werden.

2.2.2.12.2. Aufreinigung der cDNA mittels S.N.A.P.[®] Säulen

Die Bindung der cDNA an die *S.N.A.P.[®] Säulen* erfolgte durch Vermischung mit 120µl 6M NaI-Bindungspuffer und Zentrifugation von 20sek bei 13000g. Die gebundene cDNA wurde dreimal mit je 400µl 4°C-kaltem 1x Waschpuffer und zweimal mit je 400µl 4°C-kaltem 70-prozentigem Ethanol gewaschen. Die Filtersäule wurde nach Trockenzentrifugation von 1min bei 13000g mit 50µl 65°C-warmem destilliertem Wasser durch Zentrifugation von 20sek bei 13000g eluiert.

2.2.2.12.3. TdT (Terminal desoxynucleotidyl transferase)-Tailing der cDNA

14,0µl der aufgereinigten cDNA wurden mit 5µl 5x Tailing-Puffer, 2,5µl 2mM dCTP und zum einem mit 10% DMSO und zum anderen mit 20% DMSO auf ein Endvolumen von 24µl vermischt und für 5min bei 94°C denaturiert. Nach Abkühlung von 1min auf Eis wurde der Ansatz abzentrifugiert und mit 1µl TdT vermischt. Der Ansatz mit 10% DMSO wurde geteilt und entweder für 10min bei 37°C oder für 60min auf Eis inkubiert. Der Ansatz mit 20% DMSO führte nur zum erfolgreichen *dC-Tailing* durch Inkubation von 10min bei 37°C. Bei der TdT-Reaktion fügt das Enzym *TdT Desoxycytidin-Triphosphate* an das 3'-terminale Ende der cDNA an. Durch Inkubation des Reaktionsansatzes für 10min bei 65°C wurde das Enzym inaktiviert und der Ansatz konnte auf Eis abgekühlt werden.

2.2.2.12.4. dC-tailed cDNA-PCR

Der Ansatz und die PCR-Bedingungen sind folgend tabellarisch aufgeführt und waren für alle *dC-tailed* cDNA-Ansätze gleich (Tabelle 18 und 19).

Tabelle 18:

Komponenten:	Ansatz:
<i>dC-tailed</i> DNA	:5,0µl
5 x Puffer	:3,0µl
5' Primer (AUAP, 10pmol/µl)	:0,5µl
3' Primer (CD177-265 revers, 10pmol/µl)	:0,5µl
dNTPs (10mM)	:0,6µl
<i>Advantage GC 2</i> Polymerase	:0,3µl
ddH ₂ O	:0,6µl
GC-Melt	:4,5µl (1,5M)
Gesamtvolumen	:15,0µl

Tabelle 19:

PCR-Bedingungen:	<i>Advantage GC 2</i> Polymerase Kit [°C]:
Initialisierung/ Denaturierung	:94 / 10'
Denaturierung	:94 / 30"
Annealing	:63 / 30"
Extension I	:68 / 4'
Extension II	:68 / 10'
Kühlphase	:4 / ∞
Zyklen	:50

2.2.2.12.5. Nested-Amplifizierung der "*dC-tailed* cDNA – PCR"

Der Ansatz und die PCR-Bedingungen sind erneut tabellarisch aufgeführt und waren ebenfalls für alle *dC-tailed* cDNA-Ansätze bis auf die DNA-Menge gleich (Tabelle 20 und 21).

Tabelle 20:

Komponenten:	Ansatz:
zu amplifizierendes PCR-Produkt	:1,0µl unverdünnt oder 1:10 mit destillierten Wasser verdünnt
5 x Puffer	:3,0µl
5' Primer (AUAP, 10pmol/µl)	:0,5µl
3' Primer (CD177-102 revers, 10pmol/µl)	:0,5µl
dNTPs (10mM)	:0,6µl
<i>Advantage GC 2</i> Polymerase	:0,3µl
ddH ₂ O	:4,6µl
GC-Melt	:4,5µl (1,5M)
Gesamtvolumen	:15,0µl

Tabelle 21:

PCR-Bedingungen:	<i>Advantage GC 2</i> Polymerase Kit [°C]:
Initialisierung/ Denaturierung	:94 / 7'
Denaturierung	:94 / 30"
Annealing	:63 / 30"
Extension I	:68 / 4'
Extension II	:68 / 10'
Kühlphase	:4 / ∞
Zyklen	:50

2.2.2.13. Ribonukleinsäuren (RNA)-Präparation

Für die Isolierung von RNA aus Zellen wurden zwei verschiedene Protokolle durchgeführt. Bei einer Zellzahl von gleich oder kleiner als 2×10^6 Zellen an neutrophilen Granulozyten oder bei Verwendung von CD34-positive Stammzellen wurde die RNA mittels der herkömmlichen *TRIZOL*-Methode der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben isoliert. Die Grundlage dieser Technik basiert auf der sauren Guanidinisothiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion (Chomczynski & Sacchi 1987). Dabei führt das chaotrophe Salz Guanidinisothiocyanat im *TRIZOL* zur Lyse von Zellen und zur Denaturierung von Proteinen, wodurch RNasen inaktiviert werden. Durch diesen Schritt wird der RNA-Abbau verhindert und die RNA stabilisiert. Eine weitere Komponente des *TRIZOLs* ist das Reagenz Phenol, worin sich DNA und Proteine lösen können. Durch die anschließende Zugabe von ein Fünftel an Chloroform zum Zell-*TRIZOL*-Gemisch kommt es durch Ausschüttlung und Zentrifugation zu einer Phasentrennung. Dabei entstand zum einen die obere wässrige Phase mit der RNA, eine Interphase mit DNA und einer organischen Phase, in welcher sich zahlreiche Proteine befanden. Durch vorsichtige Abnahme der wässrigen Phase und Zugabe von doppelter Menge an Isopropanol wurde die RNA über Nacht bei -20°C gefällt und anschließend in Ethanol gewaschen und das RNA-Pellet luftgetrocknet. Zur Optimierung der Trocknung wurde nach der Abnahme des Ethanols der Ansatz für 2min bei 10000rpm und Raumtemperatur zentrifugiert und das restliche Ethanol abgenommen. Bei diesem Verfahren konnte die Phase der Lufttrocknung, auf nur maximal 5min, erheblich gekürzt werden. Die RNA wurde in $20\mu\text{l}$ destilliertem RNase-freiem Wasser resuspendiert und vollständig bei einer Inkubation von 10min bei 55°C gelöst. Bei der erhaltenen RNA wurde die Konzentration bestimmt (Kapitel 2.2.2.9.) und konnte anschließend bei -80°C gelagert werden. Die zweite Methode der RNA-Präparation kam bei höheren Zellzahlen als 2×10^6 Zellen an neutrophilen Granulozyten zum Einsatz und sofern ein sehr hoher Reinheitsgrad der RNA erreicht werden sollte. Bei dieser Methode wurde die herkömmliche *TRIZOL*-Methode mit einem RNA-Isolationskit (das *RNeasy*[®]-Kit von QIAGEN) kombiniert. Hierfür wurden die Zellpellets in der halben Menge ($500\mu\text{l}$) *TRIZOL* resuspendiert und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden $100\mu\text{l}$ an Chloroform zugesetzt, die RNA für 15sek ausgeschüttelt und die Reaktion für 5min bei Raumtemperatur erneut inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 15min bei 12200g und 4°C konnte die obere wässrige RNA-Phase abgenommen und mit der gleichen Menge ($250\mu\text{l}$) an RLT-Puffer ohne β -Mercaptoethanol versetzt und gemischt werden. Der Reaktionsansatz wurde anschließend mit $500\mu\text{l}$ 70%igem Ethanol gemischt und konnte so in $700\mu\text{l}$ -Schritten durch die RNA-bindenden *RNeasy*[®]-Säulen bei 10000rpm für 15sek zentrifugiert werden. Dabei wurde die RNA auf der Säule gebunden und konnte anschließend einmal mit $350\mu\text{l}$ RW1-Puffer gewaschen werden. Es folgte der *DNase*-Verdau mit $10\mu\text{l}$ *DNase* und $70\mu\text{l}$ RDD-Puffer von der Firma QIAGEN direkt auf der Säule für 30min bei Raumtemperatur. Nach dem *DNase*-Verdau wurde die RNA erneut mit $350\mu\text{l}$ RW1-Puffer

und zweimal mit je 500µl RPE-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurde die Säule für 2min bei 10000rpm trocken zentrifugiert bevor die RNA in 30µl destillierten RNase-freiem Wasser durch eine Inkubation von 1min bei Raumtemperatur und eine Zentrifugation von 1min bei 7500rpm eluiert werden konnte. Die Konzentration der präparierten RNAs wurde wie im Kapitel 2.2.2.9. beschrieben bestimmt. Die Qualität der RNA hingegen wurde anhand der ribosomalen Nukleinsäure (rRNAs)-Banden von 5S, 18S und 28S (S steht für die Svedberg-Konstante) auf einem einprozentigem RNase-freiem Agarosegel verifiziert. Die Lagerung erfolgte bei -80°C bis zur Verwendung bei der Erststrang-cDNA-Synthese (Kapitel 2.2.2.15.).

2.2.2.14. DNase-Verdau

RNA-Proben, die nur mit der TRIZOL-Methode isoliert wurden, können mit genomischer DNA kontaminiert sein und daher wurde vor jeder Erststrang-cDNA-Synthese ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierfür wurde immer das maximale Volumen von 8µl RNA-Probe (<1µg RNA) eingesetzt und der Ansatz wurde mit 1µl 10x Reaktionpuffer und 1µl RNase-freier DNase (1U) auf 10µl komplementiert. Nach einer Inkubation von 30min bei 37°C wurde das Enzym durch Zugabe von 1µl Stop-Lösung (20mM EGTA, pH 8.0) und Inkubation von 10min bei 65°C inaktiviert.

2.2.2.15. Erststrang-cDNA-Synthese

Die reverse Transkription ist ein Prozess bei der komplementäre DNA (cDNA) aus einem RNA-Template hergestellt wird. Dieser Prozess wird durch das retrovirale Enzym reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase aus dem *Retrovirus MMLV (Moloney-Maus-Leukämie-Virus)*, von der Firma Invitrogen ermöglicht. Um Gesamt-RNA in einzelsträngige cDNA umschreiben zu können, verwendet man so genannte Randomhexamere (Random-Primer). Randomhexamere sind ein Gemisch aus verschiedensten 6bp-langen Oligonukleotiden, die mehrfach und vor allem unspezifisch an die gesamte RNA binden können. Dabei dienen die freien Enden der Hydroxylgruppen der Randomhexamere als Startpunkt für die reverse Transkriptase. Sofern es möglich war, wurde 1µg Gesamt-RNA bei der Erststrang-cDNA-Synthese eingesetzt. Da einige RNAs aber eine zu geringe Konzentration aufwiesen, um dies zu ermöglichen, wurde eine RNA-Menge von 200-1000ng gewählt, die alle RNAs gleichermaßen innerhalb eines Versuches erfüllen konnten. Für die reverse Transkription wurde die RNA in einem Volumen von 26µl mit destilliertem RNase-freiem Wasser aufgenommen und mit 1µl Randomhexamere und 2µl Desoxynukleosid-Triphosphat-Mix (10mM) versetzt. Der Ansatz wurde zur Eliminierung von Sekundärstrukturen für 5min bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 8µl 5x Erststrang-Puffer (250mM Tris-HCl, pH8.3, 375mM KCl, 15mM MgCl₂), 2µl 100mM Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) und 1µl *SuperScript[®]-III reverse Transkriptase* (200U/µl) wurde der Ansatz für 5min bei Raumtemperatur und anschließend

für 60min bei 50°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch eine Inkubation von 15min bei 70°C. Die cDNAs wurden bis zum Einsatz bei der Real-Time-PCR (Kapitel 2.2.2.16) bei -20°C gelagert.

2.2.2.16. Quantitative Real-Time-PCR (*TaqMan*[®]-Analyse)

Die Real-Time-PCR ist eine Form der PCR, bei der in Echtzeit (Real-Time) die PCR-Produktkonzentration quantitativ gemessen werden kann, wodurch eine Aussage über die Ausgangsmenge des eingesetzten Templates möglich ist. Mit dieser Methode kann die mRNA-Expression eines Zielgens untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde bei der quantitativen Real-Time-PCR neben genspezifischen Oligonukleotiden eine ebenso genspezifische Fluoreszenzsonde (*TaqMan*[®]-Sonde) eingesetzt. Das Besondere an dieser Fluoreszenzsonde ist, dass sie am 5'-Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fam = 6-Carboxyfluoreszein) und am 3'-Ende mit einem fluoreszierenden Quencher-Molekül (TAMRA = 6-Carboxytetramethylrhodamin) konjugiert ist. Wird der Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Donor) mit einer Lichtquelle angeregt, gibt er einen Teil seiner Energie an einen benachbarten Akzeptor-Fluorochrom (Quencher) aufgrund des Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers (FRET) ab, wodurch er nur noch ein Licht mit geringerem Energieniveau emittiert. Wird die Sonde im Elongationsschritt einer ablaufende PCR-Reaktion durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut, nimmt der Abstand zwischen dem Reporter und dem Quencher zu. Durch diese räumliche Trennung verringert sich der FRET und das Energieniveau des vom Reporter emittierten Lichts erhöht sich. Somit kann bei der Reaktion die Bildung des PCR-Produktes proportional zur Fluoreszenzzunahme am Ende jedes Zykluses detektiert werden. Der Vorteil dieser Methoden liegt in der sehr hohen Spezifität, die durch Einsatz von Primern und Sonde erzielt wird.

Die Zusammensetzung eines repräsentativen quantitativen Real-Time-PCR-Ansatzes und die PCR-Bedingungen im ABI Prism[®] 7700 Sequence Detection System der Firma Applied Biosystems (Foster City, US) wurden in den folgenden Tabellen 22 und 23 abgebildet.

Tabelle 22:

Komponenten:	Volumina:
cDNA	: 1,00µl
TaqMan [®] -Mastermix der Firma Eurogentic	: 12,50µl
TaqMan [®] -Sonde	: 1,00µl
5' Primer (10pmol/µl)	: 0,75µl
3' Primer (10pmol/µl)	: 0,75µl
RNase- und DNase- freies ddH ₂ O	: 9,00µl
Gesamtvolumen	: 25,00µl

Tabelle 23:

PCR-Bedingungen:	Temperatur [°C] / Zeit:
Initialisierung/ Denaturierung	:50 / 2'
Denaturierung	:95 / 10'
Annealing	:60 / 15''
Extension I	:72 / 1'
Kühlphase	:4 / ∞
Zyklen	:45

Alle Ansätze wurden in Tripliketts pipettiert. Zu Überprüfung der Messung wurde auf jede 96-Loch-Platte 4-5 Verdünnungen als Standardreihe aufgetragen. Weiterhin wurde zu jeder cDNA-Synthese immer das Referenz-Gen (*18S-rRNA*) und eine Negativ-Kontrolle (*NTC, non template control*), wo die cDNA durch Wasser ersetzt wurde, mitgeführt. Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ (*Threshold Cycle*)- Methode (Pfaffl 2004).

2.2.2.17. Präparation hochmolekularer DNA aus Vollblut oder neutrophilen

Granulozyten

Zur Präparation hochmolekularer DNA aus Vollblut wurden 2ml EDTA-Blut mit 8ml Erythrozytenlysepuffer, bestehend aus 10mM Tris-HCl pH8,0, 320mM Succhrose, 5mM $MgCl_2$ und 1% Triton, gemischt und auf Eis für 4min inkubiert. Im Anschluss einer Zentrifugation von 10min bei 3000rpm wurde das Zellpellet erneut in 2ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und der Vorgang wiederholt. Das Zellpellet muss so lange mit dem Erythrozytenlysepuffer behandelt werden, bis sämtliches Hämoglobin aus dem Pellet entfernt wurde, da eine Kontamination damit zur Instabilisierung der später präparierten DNA führen würde. Anschließend wurde das Zellpellet vom Vollblut oder ein frisch präpariertes Zellpellet aus 1×10^7 neutrophilen Granulozyten in 1ml Leukozytenlysepuffer, bestehend aus 400mM Tris-HCl pH 8,0, 60mM Na-EDTA, 150mM NaCl und 1% SDS (Zugabe erst nach dem Autoklavieren), durch Pipettieren und Vortexen resuspendiert. Bei diesem Vorgang wurden die Zellmembranen der Zellen aufgebrochen. Nach Zugabe und Mischen mit 300 μ l 5M Natriumperchlorat wurden die Proteine in den Lösungen gefällt. Eine Phasentrennung wurde durch Mischen mit 1,5ml Chloroform und eine Zentrifugation von 30min bei 4000rpm erzielt. Anschließend wurde die obere wässrige DNA-Phase (ca. 1,3ml) in neue 15ml-Reaktionröhrchen überführt und mit 1,3ml eiskaltem Isopropanol gemischt. Nach einer Zentrifugation von 30min bei 4000rpm konnte die gefällte DNA in 2ml 70-prozentigem Ethanol gewaschen und erneut durch eine Zentrifugation von 15min bei 4000rpm pelletiert und anschließend für 10-15min luftgetrocknet werden. Das DNA-Pellet wurde in 100 μ l TE-Puffer (10mM Tris-HCl pH 8,0 und 1mM Na-EDTA pH 8,0) resuspendiert. Eine Qualitätskontrolle der präparierten DNA wurde mittels eines einprozentigen Agarosegels durchgeführt und die DNA-Konzentration wurde, wie im Kapitel 2.2.2.9. beschrieben, bestimmt.

2.2.2.18. Einbettung von Zellen in Agaroseblöcke und Präparation hochmolekularer DNA für die Pulsfeldgelelektrophorese

Je 4×10^7 neutrophile Granulozyten wurden bei 4°C und 1050rpm für 7min pelletiert und in je 1ml HBSS vorsichtig resuspendiert, um eine Zellyse und damit eine Scherung der DNA zu verhindern. Nach Erwärmung der Zellsuspension für 10min auf 50°C wurde das gleiche Volumen (1ml) an 50°C warmer, 2%iger *Low Melting Agarose*, angesetzt in destillierten Wasser, zugesetzt und gemischt. Im Anschluss wurden die Probengemische in die Probenkammern einer BioRad Plug Mold Gießkammer überführt (82,5µl pro Probenkammer). Nach Abkühlung des Gemischs bei 4°C für 30min wurden die Zellen in den Agaroseblöcken für 24h bei 50°C in frisch angesetztem Zellysepuffer, bestehend aus 100mM EDTA pH8,0, 1% Sarkosyl (N-Lauroylsarcosine) und 1mg/ml *Proteinase K*, lysiert. Diese Lyse wurde nach einem Pufferwechsel für weitere 24h bei 50°C durchgeführt. *Proteinase K* besitzt eine endo- und exoproteolytische Aktivität, die für den Abbau von Proteinen in Zellysaten und zur Freisetzung von Nukleinsäuren verwendet wird. Im Anschluss an die Zellyse wurden die Agaroseblöcke zweimal in je 20ml Waschpuffer (20mM Tris-HCl pH8,0, 50mM EDTA) für je 30min bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken gewaschen. Das Enzym *Proteinase K* wurde durch eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur in 20ml Waschpuffer versetzt mit 1mM PMSF inhibiert. Die Agaroseblöcke konnten in diesem Zustand in Waschpuffer bei 4°C gelagert werden.

2.2.2.19. Fragmentierung von hochmolekularer DNA in Agaroseblöcken mittels Restriktionsendonukleasen

Nach der Einbettung von Zellen in Agaroseblöcken und deren Lyse wurde die Fragmentierung der hochmolekularen DNA in den Agaroseblöcken vorgenommen. Dazu wurde ein Drittel eines Agaroseblocks in 1ml 0,1x Waschpuffer für 30min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in 300µl des einfachen Restriktionspuffers (NEB-Puffer 4) mit 0,1mg/µl BSA für 60min bei Raumtemperatur äquillibriert. Der Verdau wurde in einem neuen Pufferansatz (300µl 1x NEB-Puffer 4 mit 0,1µg/µl BSA) und 90U des Enzyms *Pme I* der Firma NEB über Nacht bei 37°C und 300rpm durchgeführt. Der Überstand des Restriktionsansatzes wurde verworfen und der Agaroseblock konnte wiederum bis zur weiteren Nutzung bei der Pulsfeldgelelektrophorese (Kapitel 2.2.2.22.) in 1ml Waschpuffer bei 4°C gelagert werden.

2.2.2.20. Fragmentierung präparierter hochmolekularer DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die im Kapitel 2.2.2.17. präparierte hochmolekulare DNA wurde mittels der Restriktionsenzyme *Hind III* bzw. *Sac I* für MAXI-Gelelektrophoresen verdaut. Dabei enthielt jeder 500µl-Ansatz 20µg DNA und 300U Enzym im entsprechenden Puffer und 0,1µg/µl

BSA. Die Inkubation wurde bei 37°C und 300rpm durchgeführt und nach jeweils 24h wurde der Verdau auf einem einprozentigen Agarosegel basierend auf dem Puffer TAE kontrolliert (je 5µl Verdauansatz). Alle 24h wurde bei Weiterführung des Verdaus jeweils 300U frisches Enzym hinzugefügt. Der Verdau wurde für insgesamt 92h durchgeführt und die verdaute DNA wurde anschließend mittels einer Phenol-Chloroform-Extraktion (Kapitel 2.2.2.21.) aufgereinigt.

2.2.2.21. Aufreinigung von fragmentierter DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Aufreinigung von fragmentierter DNA wurde dem Ansatz von mindestens 100µl ein Volumen Phenol/Chloroform (1:1) zugesetzt. Nach Mischung und einer Zentrifugation von 2min bei 14000rpm wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen an Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gründlich gemischt. Nach einer weiteren Zentrifugation von 2min bei 14000rpm wurde erneut die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde durch Zugabe an ein Zehntel Volumen an 3M Natriumacetat (pH5,2) und einem Volumen an Isopropanol sowie einer Zentrifugation von 30min bei 13000rpm gefällt. Im Anschluss wurde das DNA-Pellet für 15min bei Raumtemperatur getrocknet und in 13µl destillierten Wasser resuspendiert. Die Lagerung erfolgte bis zur MAXI-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.2.3.) bei -20°C.

2.2.2.22. Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) mittels der CHEF-Methode (Clamped-Homogenous-Electric-Field)

Das Besondere an der Pulsfeldgelelektrophorese ist, dass die Orientierung des elektrischen Feldes wechselt (pulsiert), wodurch eine Auftrennung von hochmolekularen DNA-Fragmenten möglich gemacht wird. Hochmolekulare DNA hat eine sehr limitierende Mobilität und kann daher bei der konventionellen Gelelektrophorese mit einem konstanten elektrischen Feld nur sehr gering bis gar nicht aufgetrennt werden. Die Pulsfeldgelelektrophorese macht sich dabei die Eigenschaft zu nutze, dass DNA-Moleküle in freier Lösung ohne elektrischem Feld in einer relaxierten, globulären Form vorliegen und bei Anlegung eines elektrischen Feldes sich die DNA-Moleküle entlang des angelegten Feldes ausrichten und in die Richtung der Anode gezogen werden. Wechselt das elektrische Feld seine Orientierung, würde sich damit auch die Ausrichtung und Wanderungsrichtung ändern. Relaxation und erneute Orientierung sind dabei abhängig von der DNA-Molekülgröße, das heißt, dass kleinere Moleküle proportional weniger Zeit zur Relaxation und Reorientierung benötigen als größere DNA-Moleküle und damit eine längere Strecke in Richtung Anode zurücklegen können. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Form der Pulsfeldgelelektrophorese sind die Elektroden hexagonal um das Gel angeordnet (CHEF-Methode nach Chu u. a. 1986) und das elektrische Feld wird zwischen gegenüberliegenden Elektroden angelegt. Die Orientierungen der elektrischen Felder ist damit um -60° und +60° gegenüber der vertikalen Achse des Gels versetzt, wodurch die

Laufrichtung der DNA ein Zick-Zack-Weg beschreibt. Die Auftrennung der fragmentierten hochmolekularen DNA in Agaroseblöcken (Kapitel 2.2.2.19.) erfolgte nach einer Inkubation der Agaroseblöcke in je 1ml 0,5x TBE-Puffer für 30min bei Raumtemperatur. Dabei wurde ein einprozentiges TBE-Agarosegel (Agarose von der Firma Biozym) in 0,5x TBE-Laufpuffer verwendet. Zur Größenbestimmung wurde ein Drittel eines Agaroseblocks mit Lambda-Leiter (BioRad), 6 µl denaturierter High Molecular Weight DNA Marker (GIBCO) und 2µl 1kb-Leiter (Invitrogen) aufgetragen. Die Gellaufbedingungen bei DNA-Fragmenten von einer Größe von 4 bis 500kb waren 6V/cm für 22h bei 14°C mit einem Winkel von 120° und einer Impulszeit von 6-60s. Nach dem Gellauf wurde das Gel mit einer 0,001µg/ml-Ethidiumbromidlösung für 5min angefärbt. Überschüssiges Ethidiumbromid wurde durch eine Inkubation von 30min in destilliertem Wasser entfernt und das Gel wurde mit einer cm-Maßeinheit in Form eines Lineals photodokumentiert.

2.2.2.23. Southern Blot und Detektion mittels hybridisierter ³²P-markierter Sonden

Bei der Southern Blot-Methode werden die durch Gelelektrophorese (PFGE und MAXI) aufgetrennten DNA-Fragmente auf eine positiv geladene Nylonmembran (GE Healthcare) mittels eines Vakuumblotters transferiert. Für diesen Schritt wurde DNA zuvor durch eine Inkubation in 250mM HCl für 20min depuriniert und anschließend durch eine Inkubation in 0,5N NaOH/ 1,5M NaCl für 30min neutralisiert. Auf dem Vakuumblotter wurden zwei mit 2x SSPE-getränkte Whatman-Filterpapiere, die Nylonmembran, eine semipermeable Kunststoffmaske und das Gel so geschichtet, dass die Membranoberkante gleich der Geloberkante war. Der 4-stündige Blotvorgang fand unter einem Vakuum von 60mbar statt. Während des Blotten musste das Gel regelmäßig mit 0,5N NaOH/ 1,5M NaCl überschichtet werden, damit das Gel nicht austrocknete. Im Anschluss an das Blotten wurde die Nylonmembran in 2x SSPE-Puffer für 15min gewaschen und bei 70°C getrocknet, um die kovalent gebundene DNA auf der Membran zu fixieren. Die Lagerung der Southern Blot-Membran erfolgte bei -80°C. Parallel dazu wurde das verbliebene Agarosegel erneut mit Ethidiumbromid angefärbt, um zu kontrollieren und zu photodokumentieren, dass ein vollständiger DNA-Transfer auf die Membran erfolgt ist.

Zur Markierung von 200ng aufgereinigter, genspezifischer Sonde (ca. 800bp-PCR-Produkt) mit ³²P wurde 1x Hexanucleotide der Firma Roche zugesetzt und der Ansatz für 10min bei 99°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde 0,5mM dATG, ³²P-α-CTP und 10U des Klenow-Enzyms zugesetzt und der 20µl-Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach ca. 12h wurde erneut 10U des Klenow-Enzyms zugesetzt und der Ansatz nochmals für 3h bei diesmal 37°C inkubiert. Bei dieser Reaktion hybridisieren die verschiedenen Hexanukleotide mehrfach und vor allem unspezifisch an die durch Denaturierung entstandenen Einzelstränge der Sonde und dienen dort dem Klenow-Enzym als Primer. Das Enzym ist das größere Fragment von zweien der DNA-Polymerase I und hat

sowohl eine 5'-3' Polymeraseaktivität als auch eine 3'-5' Exonukleaseaktivität und kann daher die Lücken am komplementären Strang der Sonde mit dATGs und ^{32}P - α -dCTPs auffüllen. Zur Kontrolle der Effektivität des ^{32}P -Einbaus wurde 1 μl der Sonde, nach Auffüllen mit destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 80 μl , für die Einbaumessung im Flüssigszintillationszähler (LSC) abgenommen. Die Aufreinigung der restlichen 79 μl der Sonde von überschüssigen dATPs, ^{32}P - α -dCTPs und Enzyms erfolgte über eine vorpräparierte Micro Spin 300 Säule durch Zentrifugation von 2min bei 3000rpm. Zum Vergleich von aufgereinigter gegenüber nicht aufgereinigter ^{32}P -markierter Sonde wurde erneut 1 μl des Ansatzes für die Einbaumessung abgenommen. Bei der Einbaumessung im LSC dient das Verhältnis von unaufgereinigter Sonde zu aufgereinigter Sonde zur Errechnung der ^{32}P - α -dCTP-Einbaurrate, angegeben in cpm (counts per minute). Für die folgende Hybridisierung wurden nur Sonden mit einer Einbaurrate von $\leq 20\%$ eingesetzt. Um die Sonde für die Hybridisierung endgültig vor zu bereiten, wurde sie mit destilliertem Wasser auf 150 μl aufgefüllt und mit 50 μl 20x SSC, 40 μl COT-DNA1 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 8 μl p(CA)-Oligo (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und 8 μl p(GT)-Oligo (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) versetzt. Nach Denaturierung der Sonde für 10min bei 99°C wurden 80 μl einer humanen Plazenta-DNA zugefügt. Die Zusätze zur Sonde dienen der Absättigung von unspezifischen Bindungen an repetitiven Sequenzen woran die Sonde falsch binden könnte und damit wird der Hintergrund reduziert. Die Southern Blot-Membran wurde nach Vorhybridisierung für 1h mit 10ml Hybridisationspuffer der Firma Sigma Aldrich bei 65-68°C, mit 10ml frischem Hybridisierungspuffer und dem gesamten Sondenansatz über Nacht bei 65°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran schüttelnd für 20min bei 65°C in Waschpuffer I gewaschen. Zeigte die Membran eine Radioaktivität von 15-60Bq/cm² (Becquerel, Messung mit einem Müller – Geiger – Zählrohr) konnte die Membran in Folie eingeschlagen und über Nacht mit einem Röntgenfilm (GE Healthcare) mit einem darüber platzierten Filterpapier bei -80°C belegt werden. Am nächsten Tag erfolgte die Entwicklung des Filmes. Bei der Detektion von schwachen ^{32}P -Signalen wurde ein neuer Film für 4-14 Tage exponiert.

2.2.2.24. Strippen von Southern Blot-Membranen

Zum Strippen eines Southern Blots wurde die Membran in 500ml einer 0,5-prozentigen SDS/destilliertes Wasser-Lösung über Nacht bei 80°C inkubiert. Dabei wurden durch das Detergenz SDS Disulfid- und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Sonde und der membrangebundenen DNA zerstört. Das Strippen der Membran wurde durch Messung der Radioaktivität überprüft und anschließend konnte die Membran mit einer neuen Sonde hybridisiert werden oder bei -80°C gelagert werden.

2.2.3. Mikrobiologische Methoden

2.2.3.1. Transformation von TOP10 und TOP10F' chemisch kompetenten *E.coli*-Zellen

Plasmid-DNA wurde mittels Hitzeschock in chemisch kompetente TOP10 oder TOP10F' *E.coli*-Zellen transformiert. Dabei entstehen durch einen kurzen Hitzeschock Poren in der bakteriellen Zellmembran durch die DNA in die Zellen gelangen kann. Je Ansatz wurden ein 50µl-Aliquot von *One Shot*[®] Zellen auf Eis aufgetaut und mit 2µl des Ligationsansatzes (Kapitel 2.2.2.6. oder 2.2.2.7.) oder mit 1µl eines 1:10000 verdünnten Plasmids für eine Retransformation vermischt. Nach einer Inkubation von 30min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 30sek bei 42°C im Wasserbad. Die Reaktion wurde durch eine Inkubation von 2min auf Eis gestoppt und die *E.coli*-Zellen wurden in 250µl vorgewärmtem Antibiotikum-freiem SOC-Medium aufgenommen. Anschließend erfolgte eine Inkubation im Thermomixer für 60min bei 37°C und 300rpm. Von Bakteriensuspensionen mit der DNA aus Ligationen wurden jeweils 100µl und von Bakteriensuspensionen mit Plasmid-DNA wurden jeweils 10 µl und 20µl auf LB-Platten mit entsprechender Antibiotika-Selektion ausplattiert. Die Inkubation der LB-Platten erfolgte im Brutschrank bei 37°C über Nacht. Am nächsten Tag konnten positiv transformierte Einzelkolonien gepickt und in 3ml LB-Medium mit entsprechender Antibiotika-Selektion bei 37°C und 210rpm im Schüttelinkubator über Nacht angezogen werden.

2.2.3.3. Blau-Weiß-Selektion transformierter Bakterienkolonien

Ein weiterer Vorteil des pCRII- und des pCR2.1-Vektors von der Firma Invitrogen war es, dass beide Vektoren ein *lacZ*-Gen trugen, wodurch eine Blau-Weiß-Selektion von transformierten *E.coli*-Zellen möglich ist. Das *lacZ*-Reportergen kodiert für β -Galaktosidase, ein Enzym, welches die Hydrolyse von X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) zu Galactose und einem wasserunlöslichen, blauen Indigofarbstoff bewirkt. Wird eine *E.coli*-Zelle mit einem Vektor und ligierten Insert erfolgreich transformiert, wird die daraus entstehende Bakteriumkolonie weiß, da durch das Einsetzen des Inserts in die multiple Klonierungsstelle das Leseraster des *lacZ*-Gens zerstört wird. Wurde allerdings nur der Vektor ohne Insert transformiert, wird die daraus resultierende Bakterienkolonie bei Inkubation mit X-Gal blau. Bei nicht erfolgter Transformation der Bakterien mit einem Vektor können diese auf dem mit Antibiotika versetzten Nährboden nicht überleben. Es kann auch zu falsch-positiven Blau-Weiß-Selektionen kommen. Dieser Fall tritt ein, sofern das ligierte Insert nur wenige Basen lang ist, wie beispielsweise ein *TaqMan*-Produkt und zufällig die Basenzahl ein Vielfaches von 3 ist. In diesem Falle würde das Leseraster vom Promotor bis zum *lacZ*-Gen nicht zerstört werden und das Reportergen könnte intakt abgelesen werden.

Kurz vor Ausplattierung einer transformierten Bakterienkultur wurde 30µl X-Gal (50mg/ml) auf eine 37°C vorgewärmte LB-Agarplatte frisch ausgestrichen und kurz trocken gelassen.

2.2.3.2. Kultivierung und Lagerung von transformierten Bakterien

Zur langfristigen Absicherung in der Stammsammlung wurde 750µl der Bakterienkultur mit 750µl einer sterilen Mischung aus 50% Glycerin und 50% LB-Medium gemischt und in Kryoröhrchen bei -80°C gelagert.

2.2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1. Herstellung von Proteinlysaten aus neutrophilen Granulozyten oder CD34-positive Stammzellen

2×10^6 Zellen wurden jeweils bei 2500rpm und 4°C für 5min zu einem Zellpellet abzentrifugiert. Jedes Pellet wurde anschließend in 20µl Lysepuffer (2.1.10.4) resuspendiert und für 10min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden durch Zentrifugation für 10min bei 13000rpm und 4°C Membranfragmente und unlösliche Proteine entfernt und die Proteinlysate in neue 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Lagerung der Proteinlysate erfolgte bei -20°C.

2.2.4.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde in der Regel nicht bestimmt, allerdings fand eine Standardisierung anhand der lysierten Zellzahl statt. Sofern die Proteinkonzentration in Lösungen bestimmt wurde, erfolgte dieses basierend auf der Bradford-Methode (Bradford, 1976). Bei dieser Methode wird die Veränderung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes *Coomassie brilliant blue G-250* gemessen. Dieser Farbstoff bindet unspezifisch an kationische und nichtpolare hydrophobe Seitenketten der Proteine (Serra & Morgante 1980). Sein Absorptionsmaximum ohne Protein liegt bei 465 nm, und gebunden an Protein bei 595 nm. Die OD_{595} ist also ein Maß für die Proteinkonzentration in einer Lösung. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte anhand einer Standardreihe aus BSA-Verdünnungen in destilliertem Wasser. Die Proteinlysate wurden 1:5, 1:10 und 1:50 in destilliertem Wasser verdünnt und als dreifach Bestimmung in einer 96-Loch-Platte vorgelegt. Die Bradfordstammlösung von der Firma BioRad wurde 1:4 mit destilliertem Wasser verdünnt. Anschließend wurden je 250µl dieser verdünnten Bradfordlösung mit den vorgelegten Proteinlysaten gemischt und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Die densitometrische Messung erfolgte in einem ELISA-Reader von BioRad bei einer Wellenlänge von 595nm. Die Proteinkonzentration der Proteinlysate wurde anhand einer BSA-Standardreihe im Windowsprogramm Excel I® berechnet.

2.2.4.3. Natrium-Dodezyl-Sulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinauftrennung erfolgte mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-PAGE in Abhängigkeit der molaren Masse der Proteine entsprechend der Methode von Laemmli (Laemmli 1970). Der Vorteil der Verwendung eines diskontinuierlichen Gelsystems liegt darin, dass an der Grenze zwischen dem Sammelgel und den anschließenden Trenngel eine Aufkonzentration der Proben stattfindet. Die Proteine liegen aufgrund des pH-Wertes im Sammelgel als Zwitterion vor und werden daher anhand des elektrischen Feldes fokussiert. Beim Übergang von Sammelgel zu Trenngel kommt es zu einem pH-Sprung von pH 6,8 auf 8,8. Dabei entstehen Proteinanionen, die wiederum im Trenngel unter dem Einfluss des elektrischen Feldes entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Basis der Gele ist Acrylamid, welches in Gegenwart von freien Radikalen des Induktors Ammoniumperoxodisulfat (APS) lange Polymerketten bildet, die durch Bisacrylamid quervernetzt werden. Als Polymerisierungskatalysator dient hierbei Tetramethylethylendiamin (TEMED). Es wurden 10-12-prozentige Trenn- und 5-prozentige Sammelgele verwendet mit einer Endgröße von 8x10cm und einer Dicke von 1,5cm. Die Proteinlösungen wurden 1:1 mit 2x Ladepuffer versetzt und für 5min bei 95°C denaturiert. Im Ladepuffer als auch im Gel befindet sich das anionische Detergenz SDS, welches die Wasserstoffbrückenbindungen von Proteinen aufbricht und so dessen Tertiär- und Sekundärstruktur auflöst. SDS bildet um die Proteine eine Hülle aus vielen SDS-Molekülen, wodurch die Proteine eine nahezu proportionale negative Ladung zu ihrer Größe bekommen und so innerhalb eines elektrischen Feldes auf einem Gel aufgetrennt werden können. Neben 7µl des Proteinstandards (*Protein Precision Plus Dual Color Standard*, BioRad) zur Größenabschätzung wurden von jeder Probe 20µl (entspricht 1×10^6 Zellen) auf das Sammelgel aufgetragen. Der Elektrophoreselauf in Minigelelektrophoresekammer der Firma BioRad erfolgte in 1x SDS-Laufpuffer bei 80V, bis das Bromphenolblau des SDS-Puffers das Trenngel erreichte. Anschließend wurde die Spannung auf 120V erhöht. Die Elektrophorese wurde zu dem Zeitpunkt gestoppt, als der blaue Farbstoff das Ende des Trenngels erreichte. Die Analyse der SDS-Gele wurde mittels Western Blot durchgeführt.

2.2.4.4. Western Blot

Um Proteine mit spezifischen Antikörpern qualitativ und quantitativ nachweisen zu können, wurden die Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Hierzu wurden nach Beendigung der Elektrophorese das Polyacrylamidgel sowie eine in Transferpuffer getränkte Nitrozellulosemembran blasenfrei zwischen sechs ebenfalls mit Blotpuffer befeuchteten Whatman 3MM Filterpapieren eingespannt. Der Transfer der SDS-beladenen und somit negativ geladenen Proteine erfolgte in einer Semi-dry-blotapparatur (Biometra) unter Verwendung von Anoden- und Kathoden-Transferpuffer in Richtung der positiven Elektrode (Anode) bei 0,11A (0,8mA pro 1cm²) für 60 min. Nach Beendigung des

Blottingvorgangs wurde die Nitrozellulosemembran für ca. 5 min in Ponceau-S-Lösung angefärbt.

2.2.4.5. Ponceau-S-Färbung und Blockierung des Western Blots

Die Färbung der geblotteten Proteine auf einer Nitrozellulosemembran mittels Ponceau S diente sowohl der Kontrolle des Transfers als auch der Fixierung der Proteine auf der Membran mit Hilfe der in der Färbelösung enthaltenen Trichloressigsäure. Anschließend wurde die Membran zur Absättigung von unspezifischen Proteinbindungsstellen mit 5% Magermilch/1x TBS-T für 60min bei Raumtemperatur schenkend inkubiert.

2.2.4.6. Proteindetektion eines Western Blots

Für die Immundetektion der Proteine mit Hilfe eines spezifischen Erstantikörpers wurde die Western Blot Membran mit diesem in 5% BSA/1x TBS-T über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal in 1x TBS-T für je 10min gewaschen und mit dem zweiten, Peroxidase-konjugierten Antikörper in 5% Magermilch/1x TBS-T für 60min bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal in 1x TBS-T für je 10min gewaschen. Die Detektion der immunmarkierten Proteinbanden erfolgte durch die Chemolumineszenzreaktion (ECL (enhanced chemoluminescence) Western Blotting Analysis System, GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers. Bei der Chemolumineszenzreaktion katalysiert die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase (HRP) die Oxidation des Substrats Luminol in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid. Durch die Oxidation gelangt das Substrat Luminol in den angeregten Zustand und emittiert beim Rückfall in den energetischen Grundzustand Licht mit einer Wellenlänge von 428nm, das durch Exposition von Röntgenfilmen detektiert werden kann. Die Belichtungszeiten variierten von 30sek bis zu 60min. Die Röntgenfilme wurden anschließend in der Entwicklermaschine (Kodak) entwickelt und getrocknet. Die Membranen wurden nach der Detektion kurz in 1x TBS-T gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und gelagert.

2.2.4.7. Membran-Stripping

Für die Detektion eines weiteren Proteins auf einer bereits markierten Membran wurde der gebundene Antikörper durch Inkubation von 30min bei 60°C im Wasserbad mit einem frisch angesetzten Stripping-Puffer (Kapitel 2.1.10.4.) entfernt. Anschließend wurde die Membran dreimal in 1x TBS-T für je 10min gewaschen und für 60min bei Raumtemperatur in 5% Magermilch/1x TBS-T erneut blockiert und mit einem neuen Erstantikörper inkubiert (Kapitel 2.2.4.6.).

2.2.5. Zellbiologische Methoden

2.2.5.1. Bestimmung der Zellzahl nach Neubauer

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgt mittels einer Neubauer-Zählkammer. Hierzu wurde ein 10 μ l-Zellaliquot 1:5 mit Trypan-Blau verdünnt und 10 μ l dieses Gemisches wurde in eine vorbereitete Zählkammer gegeben. Die intakten Zellen innerhalb von 4 großen Eckquadrate (=16 kleine Quadrate) wurde unter einem Mikroskop ausgezählt und die Zellkonzentration wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert der Zellenzahl pro Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor der Zellen mit Trypan Blau} \times 10^4 \text{ (Volumenfaktor eines Eckquadrats)}$$

2.2.5.2. Isolation von humanen neutrophilen Granulozyten aus Vollblut

Die Isolation von humanen neutrophilen Granulozyten erfolgte in der Regel aus 90ml frisch abgenommenem Heparin-Vollblut von gesunden freiwilligen Spendern (Ethikantrag: AA3/00/44). Ein Großteil der Erythrozyten wurde durch eine Dextranedimentation entfernt. Dafür wurden zu je 45ml Vollblut 15ml vierprozentiges Dextran (in 0,9% NaCl) zugesetzt, durch Invertierung gemischt und für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Die obere helle Phase wurde mittels eines Kanülenschlauchs (Butterfly) in ein neues 50ml-Reaktionsröhrchen überführt. Anschließend wurden beide oberen Phasen mit je 7-7,5ml Histopaque-1083 unterschichtet und eine Dichtegradientenzentrifugation für 15min bei 1200rpm und 15min bei 1050rpm und 4°C durchgeführt. Die neutrophilen Granulozyten und die restlichen Erythrozyten befanden sich im Zellpellet, wohingegen sich die mononukleären Zellen in der Interphase ansammelten. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 10ml destilliertem Wasser zur Erythrozytenlyse resuspendiert. Die Lyse wurde anschließend durch sofortigen Zusatz von 3,33ml 3,6-prozentiges NaCl abgestoppt und es folgte eine Zentrifugation von 10min bei 1050rpm und 4°C. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet in einem angemessenen Volumen an HBSS aufgenommen. Im Anschluss wurde eine Zellzahl von 1x10⁷ Zellen pro 1ml HBSS eingestellt und die Zellen wurden bis zur Verwendung am gleichen Tag auf Eis gelagert.

2.2.5.3. Isolation von humanen CD34-positiver Stammzellen aus Nabelschnurblut

Die Isolation von humanen CD34-positiver Stammzellen aus Nabelschnurblut basierte auf der Methode von Xin-Sheng Ju und Martin Zenke 2003 (Ju & Zenke 2003). Es wurde nur Nabelschnurblut von freiwilligen Spenderinnen verwendet (Ethikantrag: EA3/10/06). Das Blut wurde mittels einer Perfusor® 50ml-Spritzen (Braun Medical AG) mit 5ml vorgelegtem Gemisch aus 25.000 I.E (Einheiten) von Heparin und 1ml Penicillin/ Streptomycin auf 100ml PBS freundlicherweise von Krankenschwestern des Kreißaals im Helios Klinikum Berlin-Buch abgenommen. Es wurde kein Nabelschnurblut verwendet, das älter als 6h war und nicht bei 4°C gelagert wurde. Alle nachfolgenden Arbeiten wurden unter einer Sterilbank

durchgeführt. 3ml des Nabelschnurblutes wurden zur Isolation von neutrophilen Granulozyten (Kapitel 2.2.5.2.) und der anschließenden NB1- und Proteinase 3-Typisierung eingesetzt. Das restliche Blut wurde in 10ml-Aliquots in 50ml-Reaktionsröhrchen aufgeteilt. Zu den 10ml wurden 40ml (vierfaches Volumen) an raumtemperiertem Puffer, bestehend aus 1x PBS, 2mM EDTA und 1x Penicillin/Streptomycin, zugesetzt und der Ansatz gemischt. Im Anschluss wurde das Gemisch mit 9ml raumtemperiertem Lymphozytenseparationsmedium der Firma PAA unterschichtet und für 20min bei 2000rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Um die gebildeten Phasen nicht zu zerstören, wurde im Zentrifugationsschritt keine Bremse verwendet. Die entstandenen Phasen wurden in der folgenden Abbildung 11 abgebildet.

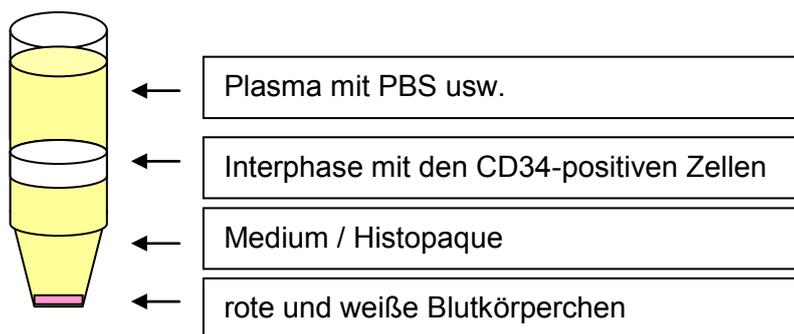


Abb. 11: Phasentrennung nach der Dichtegradientenzentrifugation.

Die Interphase (ca. 10-12ml) wurde vorsichtig mit einer 10ml-Einmalpipette abgenommen und in ein neues 50ml-Gefäß überführt. Dabei wurden jeweils 2 Interphasen von 2 50ml-Reaktionsröhrchen vereinigt. Das Volumen der Interphasen wurde mit Bindungspuffer (1x PBS mit 2mM EDTA und 1x Penicillin/ Streptomycin) auf jeweils 50ml aufgefüllt und es folgte eine Zentrifugation ohne Bremsenfunktion für 4min bei 1500rpm und 4°C. Nach diesem Waschschrift wurde jedes Zellpellet in Bindungspuffer mit einem Endvolumen von je 600µl aufgenommen. Es folgte der Zusatz von je 200µl Fc-Block-Lösung und je 200µl CD34-Antikörper-gekoppelte magnetische Beads (Miltenyi Biotec GmbH). Die Ansätze wurden anschließend für 15min bei 4°C im Kühlschrank und nicht auf Eis inkubiert. Nach Zusatz von je 10ml Bindungspuffer wurden die Ansätze bei 1500rpm für 4min zentrifugiert. Es wurde entsprechend der Anzahl der Ansätze LS-Säulen (Miltenyi Biotec GmbH) mit je einer 21g-Kanüle (Braun Medical AG) an einem starken Magneten vorbereitet und jeweils mit 3x 1ml Bindungspuffer equilibriert. Die Zellpellets wurden in je 1ml Bindungspuffer resuspendiert und direkt auf die Säulen gegeben. Die LS-Säulen wurden jeweils 3x mit je 1ml Bindungspuffer gewaschen und die Elution erfolgte nach Entfernung des Magnetständers in je 3ml Bindungspuffer. Der Vorgang wurde zum Erhalt eines höheren Reinheitsgrades ein zweites Mal über neue LS-Säulen wiederholt. Anschließend wurde die Zellkonzentration, wie im Kapitel 2.2.5.1. beschrieben, bestimmt. Aus ca. 40ml-50ml Nabelschnurblut wurden etwa

2×10^5 bis 1×10^6 CD34-positive Zellen isoliert. Diese Zellen wurden in 2ml Stem-Spam-Medium mit Zusätzen aufgenommen und anschließend kultiviert.

2.2.5.4.1 Expandierung und Differenzierung von humanen CD34-positiven

Stammzellen

1×10^6 CD34-positive Stammzellen wurden in 2ml Stem-Spam-Medium mit den Cytokinen SCF (0,1ng/ml), FLt3-Ligand (0,05ng/ml) und TPO (0,02ng/ml) und dem Antibiotika Gentamycin in einer 5cm-Kulturschale bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Alle zwei Tage wurden die Zellen mit frischen Cytokinen versetzt. Die Zellen sollten nach 2 Tagen der Isolation aus Nabelschnurblut wieder anfangen zu expandieren und nach 7-8 Tagen wurde in der Regel eine Zellzahl von 3×10^7 Zellen erreicht, die zur Differenzierung der Zellen gebraucht wurden.

Für die Differenzierung der CD34-positive Stammzellen wurden die Zellen in RPMI-Medium, versetzt mit 10% FCS, 2µM L-Glutamin und 1x Penicillin/Streptomycin, aufgenommen und in kleinen Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Zugabe von 10ng G-CSF alle zwei Tage führte zur Differenzierung der Zellen.

2.2.5.5. Magnetische Sortierung von humanen neutrophilen Granulozyten bzw. differenzierten CD34-positive Stammzellen

Zur Separation von mPR3^{hoch}/mCD177^{positiven} von mPR3^{niedrig}/mCD177^{negativen} Zellen wurde ein immunomagnetisches Selektionsverfahren angewendet. Die Grundlage dieser Technik ist die immunologische Antigen-Antikörper-Bindung zwischen den Anti-Maus-IgG-gekoppelten magnetischen Beads und dem Maus-Antikörpern, die das Antigen mCD177 oder mPR3 auf den Zellen binden. Die dabei verwendeten Anti-Maus-IgG-Micro-Beads, die 25-LD-MACS-Separationssäulen und der *MidiMACS-Separator* sind von der Firma Miltenyi Biotec GmbH. Zur besseren Markierung der beiden neutrophilen Granulozytenpopulationen mit dem Erstantikörper PR3 wurden die Zellen für 20min bei 37°C vorinkubiert und anschließend wurden 1×10^8 Zellen/HBSS mit 10µg PR3-Erstantikörper (50µl; Klon CLB 12.8 von Sanquin) in einem Endvolumen von 1ml für 25min auf Eis gefärbt. Für die Markierung der Zellen mit dem Erstantikörper CD177 war keine Vorinkubation nötig und es wurden direkt 1×10^8 Zellen mit 5µg anti-CD177 (Klon MEM 166) für 25min bei 4°C markiert. Es folgte ein Waschschrift mit 10ml Bindungspuffer (1x PBS, 0,5% BSA, 2mM EDTA, sterilfiltriert) und eine Zentrifugation von 7min bei 1050rpm und 4°C. Die Bindung der Ratten-Anti-Maus-IgG-Micro-Beads (100µl 1×10^8 Zellen) an die Antigen-Antikörper präsentierenden Zellen erfolgte in Bindungspuffer (400µl Endvolumen) bei einer Inkubation von 15min bei 4°C im Kühlschrank und nicht auf Eis. Im Anschluss wurden die Zellen von überschüssigen Beads durch einen Waschschrift mit 4ml Bindungspuffer und einer Zentrifugation von 7min bei 1050rpm befreit. Nach Aufnahme der 1×10^8 Zellen in 2ml Bindungspuffer erfolgte die Bindung auf einer

vorpräparierten 25-LD-MACS-Separationssäule im *MidiMACS-Separator* bei stets 4°C. Dabei werden die Zellen, welche mit den magnetischen Beads markiert wurden, aufgrund des magnetischen Feldes des *MidiMACS-Separator* auf der Metallkügelchen-enthaltenen Separationssäule gebunden. Die Säule wurde 3x mit je 1ml Bindungspuffer gewaschen und die Elution erfolgte nach Entfernung des *MidiMACS-Separator* in je 3ml Bindungspuffer. Anschließend wurden die Zellen erneut pelletiert und in einem geeigneten Volumen an HBSS aufgenommen und gezählt. Zur höheren Reinheit der mCD177^{negativen} Zellpopulation wurden die Zellen auf der Basis des Granulozyten-spezifischen Oberflächenmarkers CD66b zusätzlich sortiert. Die mCD177^{negative} Population der differenzierten CD34-positive Zellen hingegen wurde zusätzlich mit dem Granulozyten-spezifischen Oberflächenmarkers CD16 sortiert, da nur reife neutrophile Granulozyten diesen Marker tragen.

Alternativ zur magnetischen Zellsortierung wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie separiert. Hierfür wurden neutrophile Granulozyten mit PE-Anti-CD177/FITC-Anti-CD66b und CD34-positive Stammzellen mit PE-Anti-CD177/FITC-Anti-CD16 markiert und mit freundlicher Unterstützung von Dr. Hans-Peter Rahn an den Durchflusszytometrie-Geräten des MDC in Berlin-Buch sortiert.

2.2.5.6. Durchflusszytometrie von isolierten Fluoreszenzstoff-markierten Zellen und Fluoreszenzstoff-markierter Zellen in Vollblut

Die Methode Durchflusszytometrie ermöglicht es, dass Zellen gleichzeitig auf die Expression von Zielantigenen sowie auf ihre Granularität und Zellgröße untersucht werden können. Für die Messungen wurde ein FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*)-Gerät der Firma Becton-Dickinson verwendet. Im FACS-Gerät wird die Lösung mit den markierten Zellen angesaugt und durch eine Messkapillare beschleunigt geleitet. Mit Hilfe eines Laserstrahls wird Licht mit einer definierten Wellenlänge durch den Strom mit Zellen geleitet. Trifft der Laserstrahl auf eine Zelle, wird das Licht gestreut, welches durch so genannte Photodetektoren registriert und in elektronische Daten umgewandelt wird. Die Photodetektoren können das gestreute Licht in unterschiedlichen Winkeln messen, wodurch auch unterschiedliche Informationen über die gemessene Zelle erfasst werden können. Wird das gestreute Licht gemessen, was parallel zum Laserstrahl verläuft, spricht man vom Vorwärtsstreulicht (*Forward Light Scatter*), worüber die Zellgröße der gemessenen Zelle definiert wird. Bei Messung des rechtwinklig abgelenkten Streulichts, dem Seitwärtsstreulicht (*Side Light Scatter*), wird neben der Größe einer Zelle vor allem ihre Granularität erfasst. Für die Untersuchung der Expression von Oberflächenantigenen werden die Zellen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern markiert und nach Anregung mittels eines Lasers emittieren die Fluorochrome ein Licht definierter Wellenlänge. Die Fluoreszenzintensität gibt dabei Auskunft über die Menge der gebundenen Antikörper, worüber die Expression der

Oberflächenantigene definiert wird. In der vorliegenden Arbeit wurden Antikörper verwendet, die an Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE) gekoppelt vorlagen.

Es wurden 1×10^6 isolierte Zellen oder 100 μ l Vollblut mit je 5 μ g (5 μ l) Erstantikörper durch eine Inkubation von 15min bei 4°C markiert. Die dabei verwendeten Erstantikörper waren entweder direkt an des Fluorochrom gekoppelt oder es wurde nach einem Waschriff der Anti-FITC-IgG1-Antikörper (1:50 verdünnt) separat durch eine Inkubation von 15min bei 4°C gebunden. Bei Verwendung von Vollblutproben wurden die Erythrozyten nach der Antigen-Antikörper (direkt FITC-gekoppelt)-Bindung durch Inkubation von 5min bei 37°C in 1ml vorgewärmtem Ammoniumchlorid-Lysepuffer (7,76M NH_4Cl , 0,4M Na_2CO_3 , 0,05M EDTA) lysiert. Die Zellen wurden für die Messung in je 400 μ l Zell-Waschlösung (NaCl , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , NaN_3 , pH7,2) der Firma BD Biosciences aufgenommen.

2.2.5.7. Giemsa-Stein-Färbung von humanen neutrophilen Granulozyten und CD34-positive Stammzellen

Für die Giemsa-Stein-Färbung wurden je 1×10^5 Zellen pro Objektträger mit Hilfe eines Cytospins und einer Zentrifugation von 7min bei 500g aufgebracht. Nach Abtrocknung der HBSS-Lösung, in der sich die Zellen befanden, wurde der Objektträger für 5min in einer May Grünwald-Lösung (Sigma Aldrich) bei Raumtemperatur inkubiert. Mittels der Lösung erfolgte die Anfärbung von Zellkompartimenten (z.B. Granula), die sich im Plasma der Zelle befanden. Die May Grünwald-Lösung enthielt des weiteren Methanol zur Fixierung der Zellen. Nach einem Waschriff von 5min in einer 50mM Tris-Lösung (pH7,2) wurde der Objektträger für 15min in einer Giemsa-Lösung (1:20 in destillierten Wasser verdünnt) der Firma Sigma Aldrich inkubiert. Die Giemsa-Lösung ist ein Gemisch aus den Farbstoffen Methylenblau-Eosinat, Methylenblauchlorid, Azur A-Eosinat und Azur B-Eosinat, die in Methanol und Glycerin gelöst vorliegen. Bei dieser Färbung wird der Zellkern mit der enthaltenen DNA purpurrot und das Cytoplasma leicht bläulich angefärbt. Nach einem kurzen Waschriff in destilliertem Wasser wurde der Objektträger getrocknet und bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert.

Sämtliche Arbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt.

2.2.5.8. Kultivierung von HEK293 Zellen

HEK293 Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10% FCS und 1% 100x Penicillin/Streptomycin bei 37°C, 5% CO_2 und 90% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert und bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80% zwei bis dreimal pro Woche passagiert.

Zum Passagieren der Säugerzellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit 5ml PBS gewaschen. Für das Ablösen der Zellen von der Zellkulturflasche wurde 1ml 0,25% (w/v) Trypsin/ 1mM EDTA hinzugefügt, so dass der Zellrasen bedeckt war. Anschließend

wurden die Zellen mit dem Trypsin für 5min bei 37°C inkubiert, mit Zellkulturmedium vom Zellkulturgefäß abgespült und in ein neues Zellkulturgefäß überführt. Für die Kultivierung der Zellen wurde das zellhaltige Medium mit entsprechendem Volumen an vorgewärmtes Zellkulturmedium so verdünnt, dass die gewünschte Zelldichte erreicht wurde. Bei der Zellernte wurden die Zellen nach dem Ablösen vom Kulturgefäß mit PBS gewaschen und entweder bei -80 °C eingefroren oder direkt lysiert.

2.2.5.9. Einfrieren und Auftauen von HEK293 Zellen

Für die langfristige Lagerung wurden die Zellen aus einer 75cm²-Zellkulturflasche mit Trypsin abgelöst und bei 2000rpm für 10min bei Raumtemperatur pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1ml Zellkulturmedium mit 20% FCS resuspendiert. Danach wurde der Zellsuspension unter Schwenken tropfenweise 10% DMSO hinzugefügt. Die Zellen wurden in Kryoröhrchen in einem Einfrierbehälter mit Isopropanol langsam bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Für die Reaktivierung der Zellen wurden Kryoröhrchen schnell im Wasserbad bei 37°C angetaut und die Zellen wurden noch im leicht vereisten Zustand zügig in 20ml vorgewärmtes Zellmedium überführt. Ein schnelles Arbeiten ist für die Unterbindung einer Zellschädigung durch das im Einfriermedium enthaltene DMSO unerlässlich. Die Kultivierung der Zellen erfolgte über Nacht bei 37°C und 5% CO₂. Am nächsten Morgen wurde das Medium gewechselt, um das DMSO aus dem Gefriermedium zu entfernen. Gegebenenfalls konnten die Zellen bei entsprechender Zelldichte bereits geteilt werden.

2.2.5.10. Transiente Transfektion von HEK293 Zellen

Für die transiente Transfektion von HEK293 Zellen wurde das *FuGENE[®]HD*-Transfektionsreagenz der Firma Roche verwendet. Das Transfektionsreagenz wirkt auf der Grundlage, dass es um die zu transferierende DNA-Liposomen ausbilden kann. Diese Liposomen-DNA-Komplexe können mit der Zellmembran der eukaryotischen Zielzelle fusionieren und geben so die Plasmid-DNA in die Zelle ab. Von dort aus gelangt die Plasmid-DNA in den Zellkern, wo sie transkribiert wird.

Für diese Transfektionsmethode wurden die HEK293 Zellen einer 75cm²-Zellkulturflasche einen Tag zuvor in einer 6-Loch-Platte in Vollmedium (DMEM, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin) ausgesät. Der Zellmonolayer sollte bei der Transfektion eine Konfluenz von 80-90% aufweisen. Jeder Transfektionsansatz bestand aus 2µg (2µl) Plasmid-DNA und 8µl *FuGENE[®]HD*-Transfektionsreagenz (Ratio von 2:8) in einem Endvolumen von 100µl in DMEM ohne Serum und Antibiotika. Die Ansätze wurden in einer 96-Loch-Platte pipettiert und durch Aufstauchen der Platte auf Unterlage gemischt. Nach einer Inkubation von 15min bei Raumtemperatur wurde der Transfektionsansatz tropfenweise auf die Zellen ohne Medium gegeben. Im Anschluss wurden die Zellen für 48h

bei 37°C, 5% CO₂ und 90% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert, bevor sie für die Analyse mittels Durchflusszytometrie, quantitative Real-Time-PCR, oder Western Blot geerntet und weiterverarbeitet wurden. Bei Cotransfektionsversuchen wurden die beiden Plasmidkonzentrationen so gewählt, dass sie zusammen 2µg DNA ergaben. Weiterhin wurde das Plasmid mit dem Insert β-Galaktosidase als Kontroll-DNA bei Einzeltransfektionen eingesetzt, sofern diese mit Cotransfektionen verglichen werden sollten.

2.2.6. Statistische Analyse

Die statistische Datenauswertung wurde mit dem kommerziellen Tabellenkalkulationsprogramm Excel durchgeführt.

Die Ergebnisse der *TaqMan*-Analyse und die Werte der densitometrischen Auswertung der Western Blots wurden mit dem arithmetischen Mittel ± SEM (Standardabweichung des Mittelwertes) dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Identifikation von CD177 als Membran-Proteinase 3 (mPR3)-Rezeptor

3.1.1. Untersuchung der CD177- und PR3-Oberflächenexpression auf neutrophilen Granulozyten

In einer Veröffentlichung von Lalezari u. a. im Jahre 1971 wurde ein neutrophilen Granulozytenrezeptor beschrieben, der den Namen Neutrophilen Antigen 1 (NB1) bzw. CD177 (NM_020406.2) bekam (Lalezari u. a. 1971). Im Jahr 2000 beschrieb Temerinac u. a. diesen Rezeptor näher. Sie zeigten, dass dieser Rezeptor ausschließlich auf neutrophilen Granulozyten exprimiert wird und über einen Glykosyl-phosphatidylinositol (GPI)-Anker in der Zellmembran verankert ist. Der Membranrezeptor CD177 (mCD177) stellte einen potentiellen Kandidatenrezeptor für das Autoantikörperantigen Proteinase 3 (PR3) dar, da er ähnlich wie das Protein Membran-PR3 (mPR3) eine bimodale Verteilung auf neutrophilen Granulozyten zeigte und GPI-verankerte Moleküle häufig Rezeptorfunktionen wahrnehmen. Die Aufgabe war es nun zu testen, ob mCD177 ein mPR3-Rezeptor auf neutrophilen Granulozyten ist. Die folgenden Ergebnisse wurden von unserer Arbeitsgruppe 2007 mit dem Titel „NB1 mediates surface expression of the ANCA antigen proteinase 3 on human neutrophils.“ in der Zeitschrift Blood veröffentlicht (von Vietinghoff, S; Tunnemann, G; Eulenberg, C; Wellner, M; Cristina Cardoso, M; Luft, FC & Kettritz, R: NB1 mediates surface expression of the ANCA antigen proteinase 3 on human neutrophils. Blood, 109:4487-93, 2007.).

3.1.1.1. Messung der mCD177- und mPR3-Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie

Zur Verifizierung dieser Hypothese wurde mittels Durchflusszytometrie sowohl mCD177 als auch mPR3 auf der Zelloberfläche von neutrophilen Granulozyten nachgewiesen. Bei Doppelfärbung dieser vitalen Zellen für die beiden Oberflächenmarker konnten wir zeigen, dass nur die neutrophilen Granulozyten, die mCD177 auf ihrer Zellmembran trugen auch positiv für mPR3 waren (s. Abb. 12). Als Kontrolle wurden die Doppelfärbungen mit zwei weiteren Oberflächenmarkern, dem Fc-gamma Rezeptor III (CD16) und CD66b, das auch unter der Bezeichnung „Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8“ (CEACAM8) bekannt ist, durchgeführt. CD16 und CD66b waren im Gegensatz zu mPR3 und mCD177 nicht bimodal exprimiert und stellen somit keine Kandidaten für einen mPR3-präsentierenden Rezeptor dar.

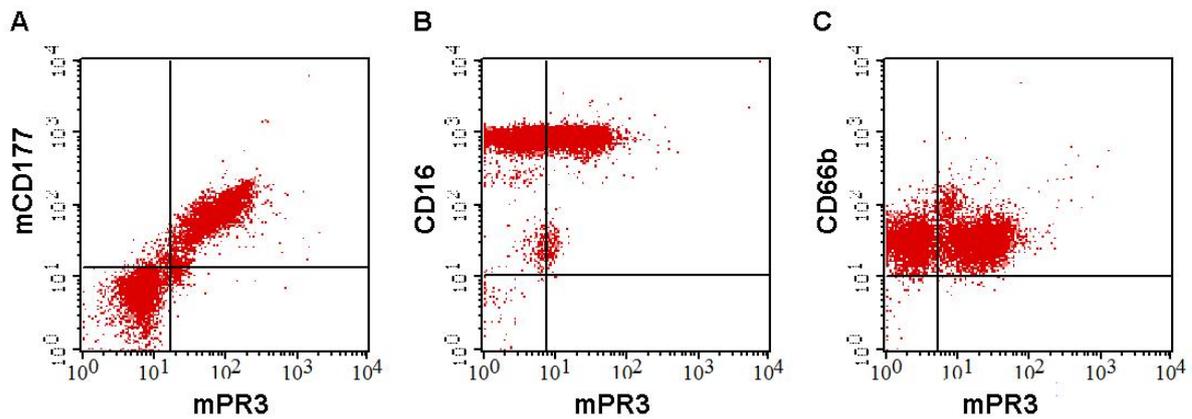


Abb. 12: Durchflusszytometrische Messung von mCD177 und mPR3 (A), CD16 (B) oder CD66b (C) auf neutrophilen Granulozyten. Auf der x-Achse wurde die Expression von mPR3 und auf der y-Achse die Expression des jeweiligen zweiten Oberflächenmarkers dargestellt: mCD177 (A), CD16 (B) und CD66b (C) (von Vietinghoff u. a. 2007).

3.1.1.2. Sortierung der neutrophilen Granulozyten nach dem Oberflächenmolekül mPR3 und die Analyse der Populationen mittels Durchflusszytometrie

Zur weiteren Verifizierung der Hypothese wurden die mPR3-positiven neutrophilen Granulozyten ($mPR3^{\text{hoch}}$) durch magnetische Zellsortierung mit dem Antikörper gegen PR3 (Klon CLB 12.8) isoliert. Gleichzeitig wurden bei dieser Prozedur die mPR3-niedrig exprimierenden neutrophilen Granulozyten ($mPR3^{\text{niedrig}}$) gewonnen. Zur Eliminierung von möglichen Verunreinigungen dieser Population durch beispielsweise Erythrozyten oder Monozyten, wurden die Zellen zusätzlich für einen weiteren typischen Oberflächenmarker von neutrophilen Granulozyten magnetisch sortiert. Für diese Prozedur wurde CD66b ausgewählt, da dieser Oberflächenmarker nur auf der Membran von neutrophilen Granulozyten nachweisbar ist. Im Anschluss an die Zellsortierung mit mPR3 und CD66b wurden die beiden erhaltenen Populationen mittels Durchflusszytometrie und dem Antikörper CD177 (MEM166) analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die $mPR3^{\text{niedrig}}$ neutrophilen Granulozyten negativ für den Oberflächenmarker mCD177 und die $mPR3^{\text{hoch}}$ exprimierenden neutrophilen Granulozyten zu etwa 92% positiv für mCD177 waren (s. Abb. 13).

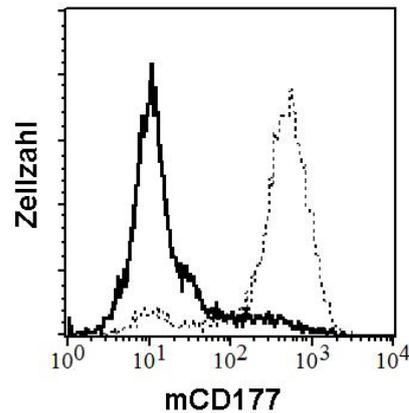


Abb. 13: Durchflusszytometrische Messung von mCD177 mit dem Antikörper CD177-MEM166 in den mPR3^{hoch}- und den mPR3^{niedrigen} sortierten neutrophilen Granulozyten. Die durchgehende Linie stellte die mPR3^{niedrigen} neutrophilen Granulozyten nach der Sortierung dar, die keine CD177-Färbung zeigten. Die mPR3^{hoch} exprimierenden neutrophilen Granulozyten wurden durch die gepunktete Linie wiedergegeben. 92 Prozent dieser Zellen zeigten eine positive mCD177-Färbung. Die Fluoreszenzintensität wurde auf der x-Achse und die Zellzahl auf der y-Achse abgetragen (von Vietinghoff u. a. 2007).

3.1.1.3. Proteinexpressionsanalyse von PR3 und CD177 in den sortierten Populationen

Zusätzlich zur Membranexpression wollten wir testen, ob sich die beiden mPR3 Populationen auch im Proteingehalt an CD177 unterscheiden. Hierfür wurden die neutrophilen Granulozyten auf zwei verschiedenen Wegen magnetisch sortiert. Im ersten Fall wurde die magnetische Sortierung in Hinsicht auf den Oberflächenmarker mPR3 und alternativ auf das Membranprotein mCD177 durchgeführt. Aus diesem Schritt erhielten wir vier Populationen von Zellen, mPR3^{hoch}, mPR3^{niedrig}, mCD177^{positiv} und mCD177^{negativ}. Von diesen vier Populationen wurden Zelllysate hergestellt und diese anschließend mittels der Western Blot-Methode untersucht. Es wurde sowohl ein Western Blot für PR3 als auch für CD177 durchgeführt (s. Abb. 14). In beiden Western Blots wurden unsortierte Zellen desselben Blutspenders als Kontrolle für den jeweiligen Antikörper mitgeführt. Die Analyse mittels Anti-PR3-Antikörper zeigte, dass PR3 sowohl in den Membran-positiven als auch in den Membran-negativen Zellpopulationen intrazellulär vorhanden war. Der Western Blot mit dem Antikörper gegen CD177 zeigte, dass nur in den mPR3^{hoch}- und mCD177^{positiven} Populationen CD177 nachgewiesen werden konnte. Die ganz schwachen Banden für CD177 in den negativen Fraktionen können dadurch erklärt werden, dass mit einer magnetischen Zellsortierung keine 100-prozentige Reinheit erzielt werden kann.

Des Weiteren wurde von unserer Arbeitsgruppe 2007 (von Vietinghoff u. a. 2007) die Kolo-kalisation von mCD177 und mPR3 anhand von konfokaler Mikroskopie nachgewiesen.

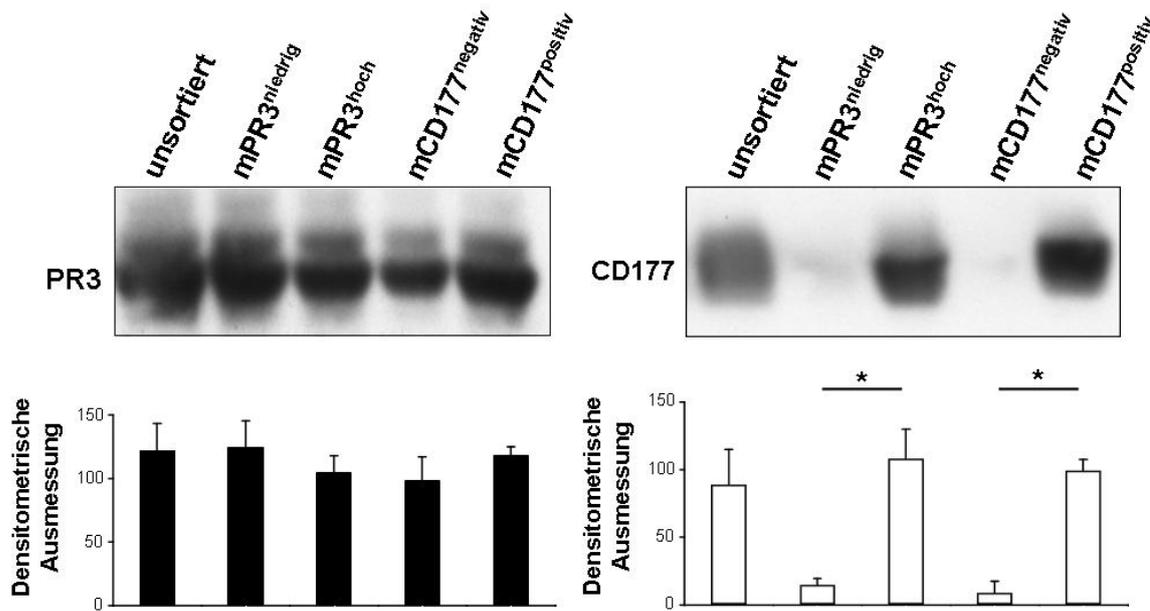


Abb. 14: Western Blot-Analyse für PR3 (oben links) und CD177 (oben rechts) an den vier sortierten Populationen. Durch die Bezeichnung mPR3^{hoch} bzw. mPR3^{niedrig} wurden die sortierten Populationen nach ihrer PR3-Membranexpression beschrieben. Analog dazu gaben die Bezeichnungen mCD177-positiv bzw. mCD177-negativ die CD177-Expression der Populationen wieder. Die densitometrische Ausmessung der Western Blots wurde direkt darunter abgebildet (*P<0,05) (von Vietinghoff u. a. 2007; modifiziert).

3.1.2. Untersuchung der CD177- und PR3-Expression im HEK293-Zellsystem

Zur Durchführung von Expressionsstudien wurden sowohl PR3 als auch der Kandidatenrezeptor CD177 in entsprechende Expressionsvektoren kloniert. Hierfür wurde die proteinkodierende Sequenz von CD177 aus dem Plasmid pCMV-SPORT6-CD177 in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA4 über die Restriktionsstellen *NotI* und *EcoRI* subkloniert. Von PR3 wurden 3 verschiedene Plasmidkonstrukte hergestellt. Beim ersten Plasmid wurde die kodierende Sequenz von PR3 aus HL60-Zellen mittels PCR und spezifischen Primern amplifiziert und in den Klonierungsvektor pCRII kloniert. Im Anschluss wurde PR3 über die Restriktionsstellen *HindIII* und *XbaI* in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA-4 subkloniert. Die beiden anderen PR3-Konstrukte sind uns von der AG Specks in Form der Plasmide pRc/CMV-rPR3-S176A (PR3F) und pRc/CMV-rPR3-Δ-S176A (PR3k) zur Verfügung gestellt worden (Specks u. a. 1996). Diese beiden rekombinanten Formen von PR3 wurden ebenfalls in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA-4 subkloniert, um eine gleichmäßige Expression zu gewährleisten. Die drei Plasmide von PR3 unterscheiden sich in verschiedenen Merkmalen der proteinkodierenden Sequenz von PR3 (s. Abb. 15). Das Plasmid pcDNA4-PR3 enthält im Gegensatz zu den Plasmiden pcDNA4-rPR3-S176A (PR3F) und pcDNA4-rPR3-Δ-S176A (PR3k) die kodierende Sequenz

von einem vollständig intakten PR3-Protein. In den Plasmiden pcDNA4-*rPR3-S176A* (*PR3F*) und pcDNA4-*rPR3-Δ-S176A* (*PR3k*) wurde die Aminosäure 176 Serin gegen Alanin ausgetauscht, wodurch die katalytische Triade des intakten PR3 zerstört wurde. Des Weiteren wurde bei dem Plasmid pcDNA4-*rPR3-Δ-S176A* (*PR3k*) das Dipeptid, welches normalerweise von der Dipeptidylpeptidase 1 zur Aktivierung von PR3 entfernt wird, eliminiert.

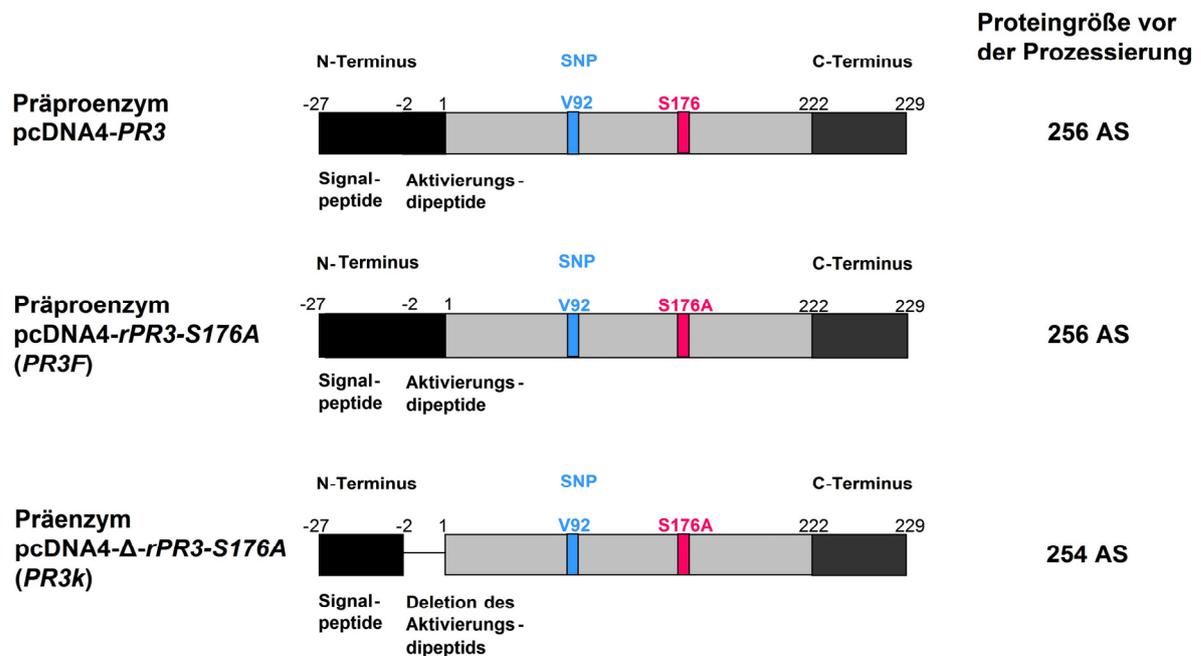


Abb. 15: Schematische Darstellung der drei PR3-Konstrukte, die für die *in vitro* Transfektionsexperimente in HEK293 Zellen verwendet wurden. Mit den Zahlen über den schematischen Proteinabbildungen wurden die Aminosäurepositionen angegeben. Am N-Terminus besitzt PR3 ein Signalpeptid, das für den Transport des Proteins in das endoplasmatische Retikulum verantwortlich ist. Weiterhin besitzt PR3 am C-Terminus ein zusätzliches Signalpeptid, welches für die Faltung des Proteins von der inaktiven in die aktive Form verantwortlich ist. In rot wurde die Aminosäure Serin dargestellt, die zur katalytischen Triade gehört und in den beiden unteren Konstrukten gegen ein Alanin ausgetauscht wurde. Alle drei Konstrukte basieren auf der Referenzsequenz NM_002777, welche die Aminosäure Valin an der Stelle 92 besitzt. Auf der rechten Seite der Abbildung wurde die Aminosäurezahl (AS) des unprozessierten PR3-Proteins angegeben.

Es soll die Fragestellung beantwortet werden, ob der Rezeptor mCD177 wichtig für die mPR3-Oberflächenexpression ist und welchen Prozessierungsstatus mPR3 für die Expression auf der Zelloberfläche besitzen muss. Hierfür wurden verschiedene *in vitro* Transfektionen der *CD177*- und *PR3*-Plasmide in HEK293 Zellen vorgenommen.

HEK293 Zellen besitzen im Gegensatz zu neutrophilen Granulozyten keine Dipeptidylpeptidase 1, die den Zellen eine Abspaltung des Aktivierungsdipeptids im PR3-Protein ermöglichen würde. Aus diesem Grunde waren die HEK293 Zellen auch nicht in der

Lage das Proteinprodukt des pcDNA4-*PR3*- und des pcDNA4-*rPR3-S176A (PR3F)*-Plasmids vollständig zu einem reifen PR3 zu prozessieren. Durch die Deletion des Aktivierungsdipeptids im pcDNA4- Δ -*rPR3-S176A (PR3k)*-Plasmid konnte aus diesem Konstrukt in HEK293 Zellen ein vollständig prozessiertes PR3 translatiert werden.

Es wurde jedes verwendete Plasmid in Kombination mit dem Kontrollplasmid, welches das β -Galactosidase-Gen (*β Gal*) enthält, einzeln transfiziert. Im Vergleich dazu wurden anschließend Cotransfektionen des *CD177*-Plasmids mit den verschiedenen *PR3*-Plasmiden durchgeführt. Die Expression der transfizierten Plasmide in HEK293 Zellen erfolgte über einen Zeitraum von 48h. In den geernteten Zellen wurde neben der Genexpression von *CD177* und *PR3* (s. Abb. 16) auch die Proteinexpression mittels Western Blot-Analyse (s. Abb. 17) und Durchflusszytometrie (s. Abb. 18) analysiert.

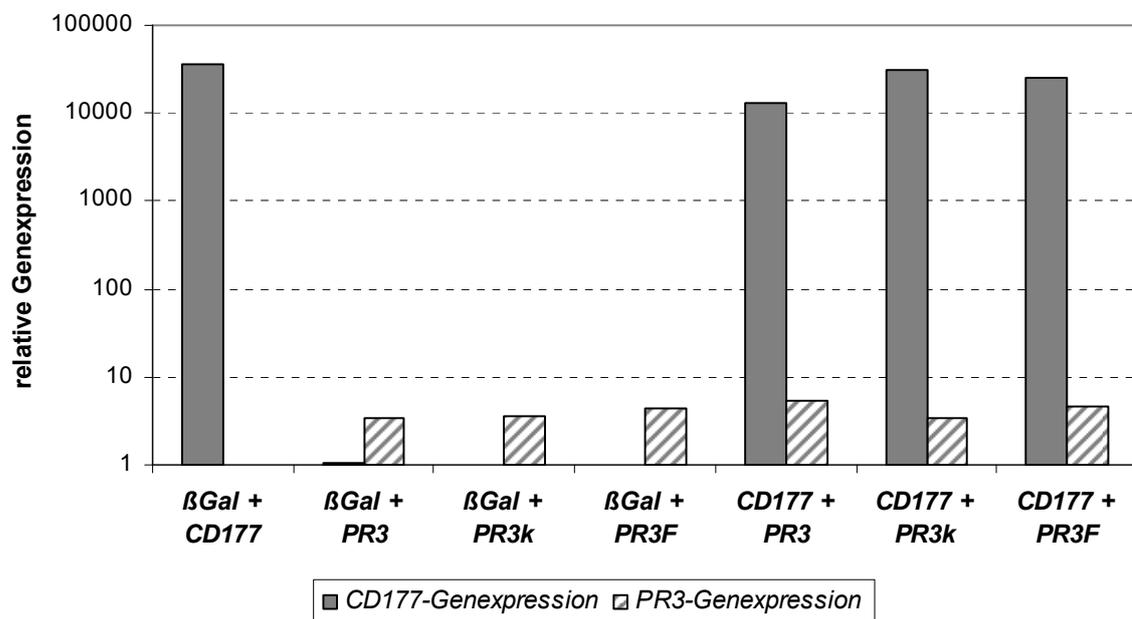


Abb. 16: Genexpressionsanalyse der *CD177*- und *PR3*-mRNA mittels quantitativer Real-Time-PCR an transient transfizierten HEK293 Zellen. Die *CD177*-Genexpression wurde mit grauen Balken und die *PR3*-Genexpression wurde mit weiß-grau-gestreiften Balken dargestellt. β -Gal bezeichnet das β -Galactosidase-Kontrollplasmid. Die y-Achse wurde in logarithmischer Darstellung abgebildet. Als Referenz-Gen diente die ribosomale RNA 18S.

Anhand der Genexpressionsanalyse mittels Real-Time-PCR von *CD177* und *PR3* konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Plasmide in gleichen Verhältnissen bei der Cotransfektion sowie bei Einzeltransfektion in Kombination mit dem Kontrollplasmid β -Galactosidase exprimiert wurden (s. Abb. 16). Als Referenz-Gen wurde das Gen für die ribosomale RNA 18S (*18S-rRNA*) mitgeführt. Es konnte beobachtet werden, dass das *CD177*-Plasmid wesentlich stärker in den HEK293 Zellen exprimiert wurde als die Plasmide mit den *PR3*-Konstrukten.

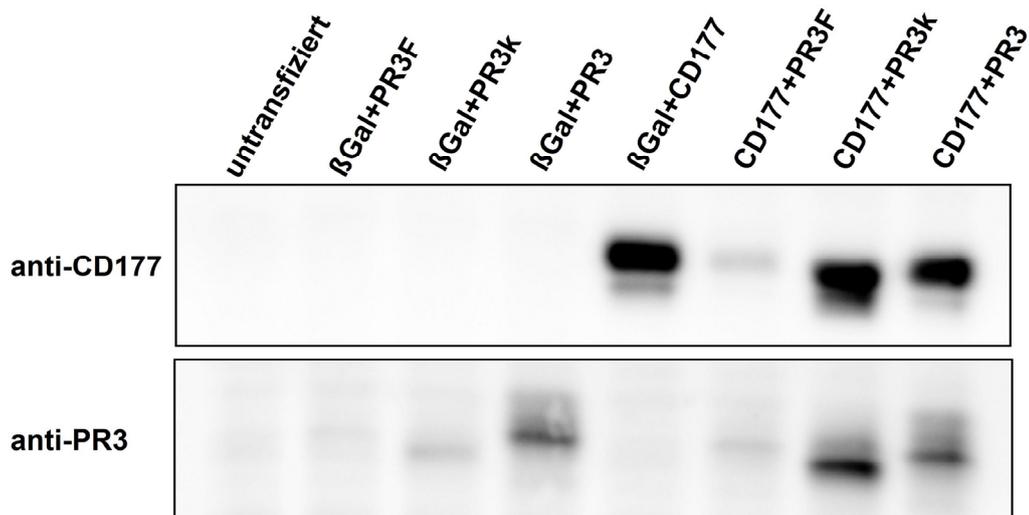


Abb. 17: Western Blot-Analyse für CD177 (oben) und PR3 (unten) an unterschiedlich transient transfizierten HEK293 Zellen. Als Kontrollen wurden nicht transfizierte HEK293 Zellen sowie Cotransfektionen der Einzelplasmide mit dem Kontrollplasmid β -Galactosidase (β Gal) aufgetragen.

Für die Western Blot-Analyse verwendeten wir Zelllysate von unterschiedlich transient transfizierten HEK293 Zellen (s. Abb. 17). Die Expression des CD177-Proteins konnte sowohl bei der Transfektion des *CD177*-Plasmids mit dem Kontrollplasmid als auch in der Cotransfektion mit den verschiedenen *PR3*-Plasmiden nachgewiesen werden. Die CD177-Expression fiel bei der Cotransfektion von *CD177* mit dem *PR3F*-Plasmid jedoch sehr gering aus. Der Grund hierfür war, dass die Hälfte der Zellen nach dieser Transfektion verstorben waren. Vermutlich wurde durch dieses *PR3F*-Plasmid ein fehlgefaltetes Protein translatiert, wodurch sich der erhöhte proteasomische Abbau negativ auf die Vitalität der Zellen ausgewirkte. Die PR3-Expression konnte hingegen bei den Transfektionen der verschiedenen *PR3*-Plasmide mit dem Kontrollplasmid oder dem *CD177*-Plasmid teilweise nur sehr schwach nachgewiesen werden. Auch bei diesen Transfektionen waren bereits viele HEK293 Zellen bis zur Zellernte nach 48 Stunden verstorben, wodurch eine Analyse mittels Western Blot erschwert wurde.

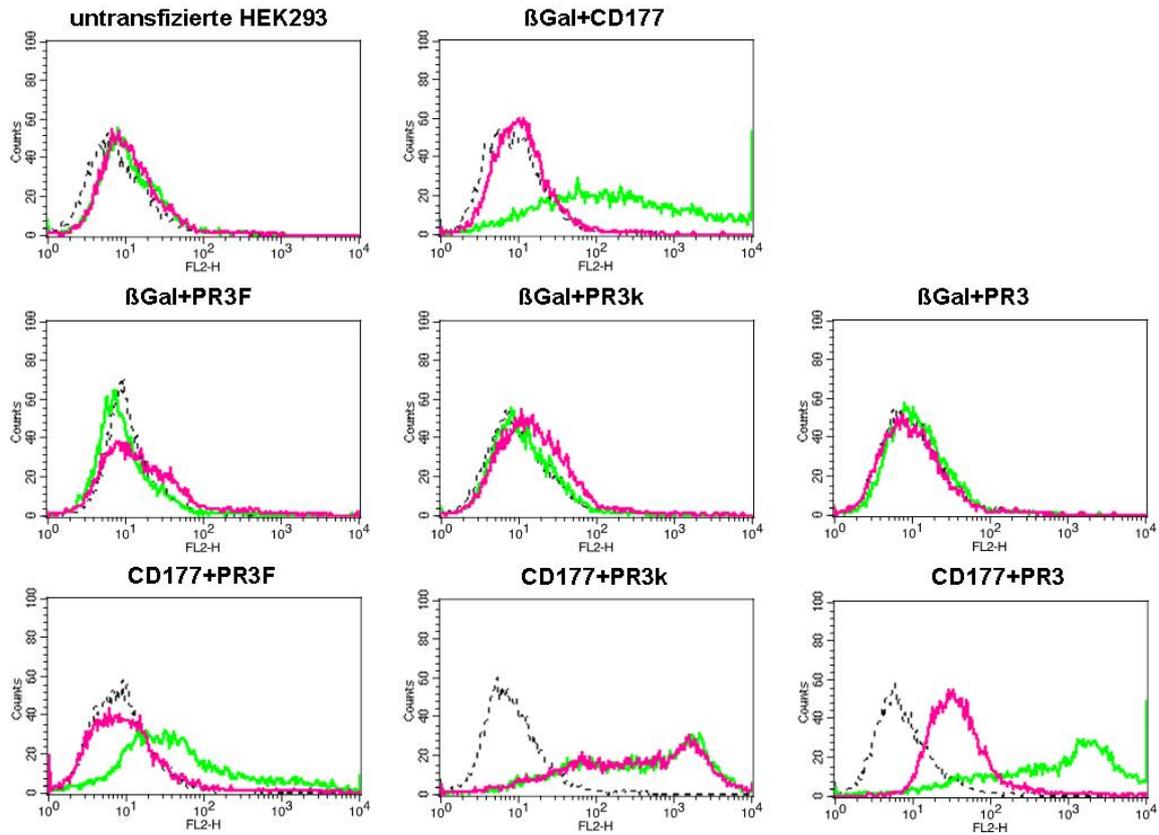


Abb. 18: Durchflusszytometrische Analyse für das Protein mCD177 (grüne Linie) und für das Protein mPR3 (rote Linie) auf der Membran transient transfizierter HEK293 Zellen. mCD177 wurde dabei mit Hilfe des Antikörpers FITC-Anti-CD177 (IgG1, Klon MEM166) und mPR3 mittels des Erstantikörpers Anti-PR3 (IgG1, Klon CLB 12.8) sowie des Zweitantikörpers PE-Anti-IgG1 detektiert. Als Kontrolle für unspezifische Antikörperbindungen wurden entsprechende Isotypantikörperfärbungen durchgeführt (schwarze, gestrichelte Linie). Untransfizierte HEK293 Zellen wurden ebenfalls als Kontrolle mitgeführt (oben links). Alle Plasmide wurden aus Kontrollzwecken mit einem Kontrollplasmid (β Gal) in die HEK293 Zellen transfiziert (oben rechts und mittig). Die Cotransfektion von *CD177* mit den verschiedenen *PR3*-Plasmiden wurden in der untersten Reihe dargestellt. Mit der x-Achse wurde die Fluoreszenzintensität und mit der y-Achse die Zellzahl (Counts) wiedergegeben.

In der Analyse mittels der Durchflusszytometrie konnte eine starke Expression von mCD177 auf der Zellmembran der HEK293 Zellen nachgewiesen werden (s. Abb. 18). Untransfizierte HEK293 Zellen besaßen weder membranständiges CD177 noch PR3, wie in der Abbildung oben links zu sehen ist. Das Protein CD177 wurde sowohl bei der Cotransfektion mit dem Kontrollplasmid als auch mit den verschiedenen *PR3*-Konstrukten auf der Zellmembran der HEK293 Zellen präsentiert. Bei Einzeltransfektionen der verschiedenen *PR3*-Konstrukte mit dem Kontrollplasmid konnte kein mPR3 auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Eine Detektion des mPR3 Proteins war erst nach Cotransfektion mit dem *CD177*-Plasmid zu

detektieren. Allerdings gab es dabei deutliche Unterschiede zwischen den drei *PR3*-Konstrukten. Bei der Cotransfektion des *CD177*-Plasmids mit dem *PR3F*-Plasmid konnte kein mPR3 auf der Zellmembran detektiert werden (s. Abb. 18; unten links). Im Falle der Cotransfektion des *CD177*-Plasmids mit dem *PR3*-Plasmid war nur eine leichte Rechtsverschiebung der PR3-Kurve im Gegensatz zur Kontrollkurve mit einem Isotypenantikörper zu verzeichnen. Diese leichte unspezifische mPR3-Expression führten wir auf eine leicht veränderte Proteinstruktur des Proteinprodukts vom *PR3*-Plasmid im Gegensatz zum Protein vom *PR3F*-Plasmid zurück. Die leichten Konformationsunterschiede der beiden Plasmide wurden möglicherweise durch die mutierte katalytische Triade im PR3F-Protein verursacht. Bei der dritten Cotransfektion des *CD177*-Plasmids mit dem *PR3k*-Plasmid konnte dagegen eine eindeutige mPR3-Expression auf der Zellmembran der HEK293 Zellen verzeichnet werden (s. Abb. 15; mittig unten). Bei diesem PR3k-Protein fehlte bereits das Dipeptid des Proenzym und eine weitere Prozessierung zum reifen Protein war nicht mehr notwendig, wodurch es von mCD177 präsentiert werden konnte.

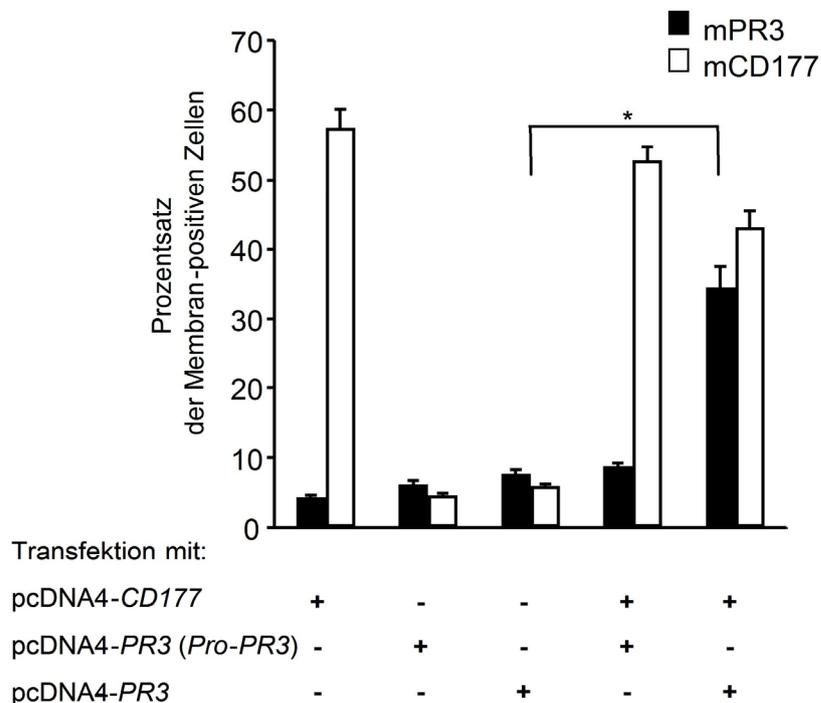


Abb. 19: Zusammenfassung der durchflusszytometrische Analyse für die Zellmembranpräsentation von mCD177 (weiße Balken) und mPR3 (schwarzen Balken) auf den unterschiedlich transient transfizierten HEK293 Zellen. mCD177 wurde dabei mit Hilfe des Antikörpers FITC-Anti-CD177 (IgG1, Klon MEM166) und mPR3 mittels des Erstantikörper Anti-PR3 (IgG1, Klon CLB 12.8) sowie des Zweitantikörper PE-Anti-IgG1 detektiert. Nur bei der Cotransfektion von *CD177* mit *PR3k* wurde eine deutliche PR3-Membranexpression nachgewiesen. Wohingegen bei der Cotransfektion mit dem anderen *PR3*-Konstrukte (*Pro-PR3*) und bei den Einzeltransfektionen der *PR3*-Plasmide keine PR3-Membranexpression gemessen werden konnte. (n=5 unabhängige Transfektionen, *P<0,05) (von Vietinghoff u. a. 2008).

Eine Zusammenfassung der durchgeführten Transfektionen mit durchflusszytometrischen Auswertungen wurde in der Abbildung 19 dargestellt. Es wurde dabei nochmals ersichtlich, dass ausschließlich das Protein CD177 bei den Einzeltransfektionen auf der Zellmembran der HEK293 Zellen präsentiert wurde. Im Gegensatz dazu konnte weder das vollständig prozessierte PR3 (PR3k) noch das unvollständig prozessierte PR3 (Pro-PR3) ohne eine Cotransfektion mit *CD177* auf der Zellmembran der HEK293 Zellen präsentiert werden. Eine signifikante Oberflächenexpression wurde nur durch die Cotransfektion von vollständig prozessierten *PR3* (*PR3k*) mit *CD177* erreicht. Die Experimente zeigten somit, dass eine *CD177*-Zellmembranexpression essentiell für die Oberflächenpräsentation von vollständig prozessierten mPR3 ist.

3.2. Charakterisierung der mPR3^{hoch}/mCD177^{positiven}- und mPR3^{niedrig}/mCD177^{negativen}-granulozytären Populationen

Bei der durchflusszytometrischen Analyse stellten sich zwei distinkte Populationen von neutrophilen Granulozyten bezüglich der mCD177- und mPR3-Expression dar. Eine Population setzte sich aus Zellen zusammen, die auf ihrer Oberfläche das mCD177-Protein trugen und somit auch mPR3 auf ihrer Zellmembran präsentierten. Die zweite Population bestand auch Zellen, die kein mCD177 auf ihrer Oberfläche besaßen und somit nur sehr geringe Mengen an mPR3 auf ihrer Zelloberfläche aufzeigten. Unsere Arbeitsgruppe konnte schon in früheren Arbeiten (Schreiber u. a. 2003) nachweisen, dass der Prozentsatz von mPR3^{hoch} und damit auch von mCD177^{positiven} neutrophilen Granulozyten eine gaußsche Verteilungskurve in der Bevölkerung von null bis fast zu 100 Prozent beschreibt. Der Durchschnittswert, lag dabei etwa bei 60 Prozent positiver Zellen.

Ein nächster Punkt dieser Arbeit sollte die weitere Charakterisierung dieser beiden distinkten Populationen von neutrophilen Granulozyten sein.

3.2.1. Vergleich der mPR3^{hoch}/mCD177^{positiven}- mit den mPR3^{niedrig}/mCD177^{negativen} neutrophilen Granulozyten

Im direkten Vergleich der mPR3^{hoch}/mCD177^{positiven}- gegen die mPR3^{niedrig}/mCD177^{negativen} neutrophilen Granulozyten wurden Analysen der Zellmembranoberflächenexpression, der Zellmorphologie und des Reifungsstadiums sowie der endogenen Proteinexpression und der Genexpression durchgeführt.

3.2.1.1. Sortierungsanalyse der neutrophilen Granulozyten mittels Durchflusszytometrie

Die Sortierung der neutrophilen Granulozyten aufgrund der mCD177-Zellmembranexpression erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Dabei wurde ein Fluoreszenzfarbstoff-markierter Antikörper eingesetzt, welcher das Oberflächenprotein mCD177 erkannte. Alle Zellen, die mCD177 auf ihrer Oberfläche präsentieren, sind

neutrophile Granulozyten. Um auszuschließen, dass die $mPR3^{\text{niedrig}}/mCD177^{\text{negativen}}$ Zellen durch Monozyten oder eosinophile Granulozyten kontaminiert waren, wurden die Zellen zusätzlich für den neutrophilen Granulozytenmarker CD66b sortiert. Im Anschluss an jede Sortierung wurde jeweils ein Aliquot der Zellen mittels Durchflusszytometrie zur Kontrolle reanalysiert. In Abbildung 20 wurde exemplarisch ein repräsentatives Ergebnis der durchgeführten Durchflusszytometrien dargestellt.

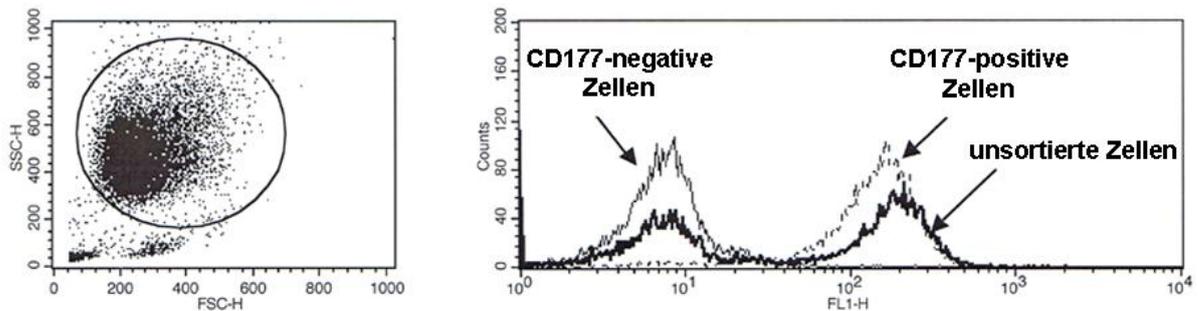


Abb. 20: Durchflusszytometrische Messung des Oberflächenmarkers mCD177 mit dem Antikörper CD177-MEM166. In der linken Abbildung wurde anhand der Kontrollzellen (unsortierte Zellen) die analysierte Population dargestellt. Es wurden nur Zellen auf eine mCD177-Membranexpression untersucht, welche sich innerhalb des Kreises (Gate) befanden. Basierend auf den Parametern für Größe und Granularität handelte es sich bei den im Kreis befindlichen Zellen um Granulozyten. Die Zellgröße wurde auf der x-Achse (FSC-H; Vorwärtsscatter) und die Granularität der Zellen auf der y-Achse (SSC-H; Seitwärtsscatter) abgetragen. In der rechten Abbildung wurden alle Einzelmessungen eines Experimentes zusammen dargestellt. Die durchgehend starke schwarze Linie stellte die mCD177-Expression der noch unsortierten neutrophilen Granulozyten dar. Mit der durchgehend dünnen schwarzen Linie wurden die $mCD177^{\text{negativen}}$ Zellen dargestellt, die nach der Sortierung in der Reanalyse kontrolliert wurden. Die aus der Sortierung resultierenden $mCD177^{\text{positiven}}$ Zellen hingegen mit einer gestrichelten Linie abgebildet. Auf der x-Achse wurde die Fluoreszenzintensität (FL1-H) und auf der y-Achse die Zellzahl (Counts) aufgetragen.

Die durchflusszytometrische Analyse der sortierten Zellen zeigte, dass mittels des angewendeten Protokolls eine hohe Reinheit bezüglich der mCD177-Expression erreicht wurde. Mit diesen reinen Fraktionen an $mCD177^{\text{positiven}}$ - und $mCD177^{\text{negativen}}$ Zellen wurden alle folgenden Experimente durchgeführt.

3.2.1.2. Giemsa-Färbungen von den neutrophilen Granulozyten vor und nach der Sortierung

Zur Untersuchung der Zellmorphologie der sortierten neutrophilen Granulozyten wurde die von Gustav Giemsa (deutscher Chemiker) entwickelte Methodik, die Giemsa-Färbung, angewendet. Dabei werden die Zellkompartimente (Zellkern mit DNA und Zytoplasma) durch die enthaltenen Farbstoffe der Lösung, Azur A-, Azur B- und Methyleneblau-Eosinat sowie

Methylenblauchlorid auf der Basis von Methanol und Glycerin, unterschiedlich angefärbt. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops mit Kamera.

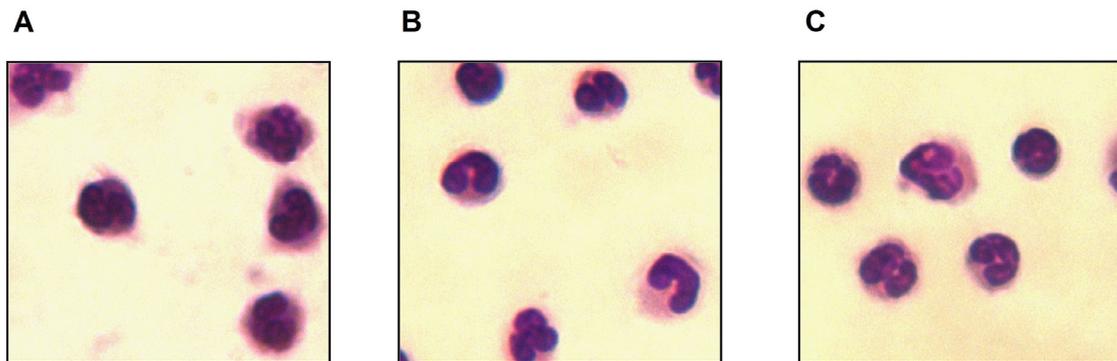


Abb. 21: Giemsa-Färbung zur Beurteilung der Morphologie der $mCD177^{\text{negativen}}$ neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu den $mCD177^{\text{positiven}}$ neutrophilen Granulozyten. In der Abbildung A wurden nicht sortierte Zellen dargestellt, welche als Ausgangsmaterial dienten. In der Abbildung B wurden $mCD177^{\text{positive}}/CD66b^{\text{positive}}$ neutrophile Granulozyten mit einer Giemsa-Färbung dargestellt und in der Abbildung C wurde die Färbung der $mCD177^{\text{negativen}}$, aber $CD66b^{\text{positiven}}$ neutrophilen Granulozyten abgebildet. Hierbei wurde durch die zweite Sortierung für den Oberflächenmarker CD66b sicher gestellt, dass sich in den Zielpopulationen ausschließlich neutrophilen Granulozyten befanden. Die Mikroskopie erfolgte mit einer 100-fachen Vergrößerung.

Die Daten zeigten, dass sich die beiden Zellpopulationen von neutrophilen Granulozyten in ihrer Morphologie nicht unterschieden (s. Abb. 21). Sowohl die $mCD177^{\text{negativen}}$ als auch die $mCD177^{\text{positiven}}$ Zellen besaßen einen typisch segmentierten polymorphen Zellkern und eine sehr ähnliche Zellgröße. Damit wurde ein Unterschied bezüglich des Reifungsstadiums der Zellen ausgeschlossen.

3.2.1.3. Analyse der Proteinexpression von PR3 und CD177

Für den Vergleich der zellulären PR3- und CD177-Proteinexpression in den $mPR3^{\text{niedrig}}/mCD177^{\text{negativen}}$ - gegenüber den $mPR3^{\text{hoch}}/mCD177^{\text{positiven}}$ neutrophilen Granulozyten wurden Zelllysate hergestellt und auf ein Acrylamidgel aufgetragen. Eine Normierung der aufgetragenen Proteinmenge erfolgte durch den Einsatz gleicher Zellzahlen. Im Anschluss an die SDS-Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine Membran übertragen. Es folgte die Inkubation mit einem Erst- und einem Zweitantikörper sowie die Detektion mit Hilfe einer Chemolumineszenzreaktion. Hierbei wurde der anti-CD177-Antikörper zur Detektion des CD177-Proteins und der anti-PR3-Antikörper für die Detektion von PR3 verwendet. In der Abbildung 22 wurde das Ergebnis der Proteinanalyse abgebildet. Diese Proteinanalyse wurde separat an drei verschiedenen Sortierungen durchgeführt, wobei dieses Ergebnis in jedem Experimente reproduziert wurde.

Sortierung mit:

anti-CD177	-	+	-
anti-CD66b	-	+	+

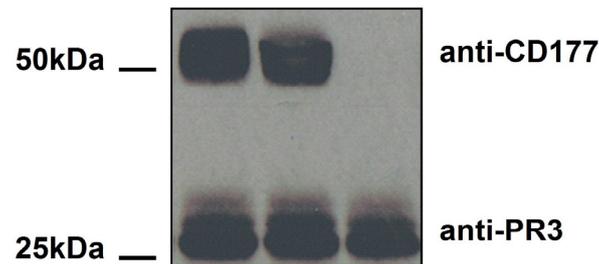


Abb. 22: Western Blot-Analyse für CD177 (oben) und PR3 (unten) an den zwei sortierten Zellpopulationen sowie den unsortierten Zellen desselben Blutspenders. Für die Detektion des Proteins CD177 wurde der Antikörper anti-CD177 (IgG1; Klon MEM166) und für die Detektion von PR3 der Antikörper anti-PR3 (IgG1; Klon 4A5) verwendet. Oberhalb der Blot-Abbildung wurde die Positivität bzw. Negativität für das angegebene Oberflächenmolekül aufgeführt. In der ersten Spur wurde das Gesamtprotein von unsortierten Zellen aufgetragen. In der zweiten Spur wurde entsprechend das Gesamtprotein von mCD177^{positiven}/CD66b^{positiven} Zellen und in der dritten Spur das Gesamtprotein von mCD177^{negativen}, aber CD66b^{positiven} Zellen aufgetragen.

Die PR3-Proteinanalyse zeigte keinen Unterschied zwischen mPR3^{hoch}/mCD177^{positiven}- und mPR3^{niedrig}/mCD177^{negativen} Zellen. In allen Spuren konnte eine typische Dreierbande des Proteins mit seinen Proformen des PR3-Proteins nachgewiesen werden. Es wurde auch kein Unterschied in der PR3-Proteinmenge zwischen den verschiedenen Populationen festgestellt. Bezüglich der CD177-Proteinanalyse konnte gezeigt werden, dass bei den mPR3^{hoch}/mCD177^{positiven} neutrophilen Granulozyten das CD177-Protein nachgewiesen werden konnte, nicht jedoch bei den mPR3^{niedrig}/mCD177^{negativen} Zellen. Es wurde deutlich, dass die mPR3^{niedrig}/mCD177^{negativen} neutrophilen Granulozyten weder über eine CD177-Zellmembranexpression noch über endogenes CD177-Protein verfügen.

3.2.1.4. Expressionsanalyse von *PR3* und *CD177* auf RNA-Ebene

Aufgrund der Proteinanalysedaten sollte untersucht werden, ob sich die beiden Zellpopulationen (mPR3^{hoch}/mCD177^{positiven}- und mPR3^{niedrig}/mCD177^{negativen} Zellen) bereits in der RNA-Expression von *CD177* oder *PR3* unterscheiden. Hierfür wurde aus gleichen Zellmengen RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer Real-Time-PCR analysiert. Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen von fünf separaten Zellsortierungen und deren Auswertungen wurden in der Abbildung 23 dargestellt.

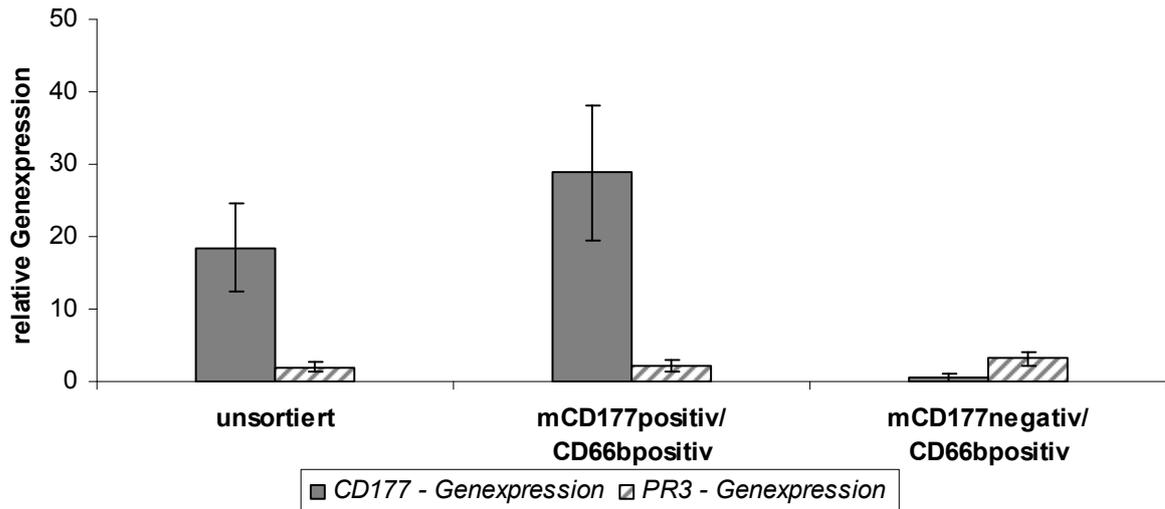


Abb. 23: Genexpressionsanalyse der *CD177*- und *PR3*-mRNA mittels quantitativer Real-Time-PCR an unsortierten und sortierten neutrophilen Granulozyten. Die *CD177*-Genexpression wurde mit grauen Balken und die *PR3*-Genexpression wurde mit weiß-grau-gestreiften Balken dargestellt. Die y-Achse gibt die relative Genexpression der betrachteten Gene an. Als interner Standard diente das Referenzgen *18S-rRNA*.

Bei der Analyse der *PR3*-mRNA wurde kein Unterschied zwischen $mPR3^{\text{hoch}}/mCD177^{\text{positiven}}$ und $mPR3^{\text{niedrig}}/mCD177^{\text{negativen}}$ neutrophilen Granulozyten festgestellt. Im Gegensatz dazu wurde bei der *CD177*-Genexpressionsanalyse wiederum ein eindeutiger mRNA Unterschied zwischen den beiden Zellpopulationen detektiert (Abbildung 23; mittig und rechts). Als Referenzgen wurde jeweils das Gen für die ribosomale RNA 18S mitgeführt. In den $mPR3^{\text{hoch}}/mCD177^{\text{positiven}}$ neutrophilen Granulozyten konnte mit einem *CD177*-Exon 2-3-überspannendem Primerpaar eine hohe relative Genexpression des *CD177*-Gens gemessen werden. Diese lag höher als die, der unsortierten Zellen. Im Gegensatz dazu konnte in den $mPR3^{\text{niedrig}}/mCD177^{\text{negativen}}$ neutrophilen Granulozyten keine *CD177*-mRNA nachgewiesen werden ($\Delta\Delta\text{CT}$ von eins). Diese Daten dokumentieren eine fehlende *CD177*-mRNA als Ursache der fehlende *CD177*-Proteinexpression.

Das Auftreten einer trunkierten *CD177*-mRNA könnte jedoch auch zum beschleunigten Abbau dieser mRNA führen. Um diese Hypothese ausschließen zu könnten wurden PCRs im vorderen und hinteren Bereich der in cDNA umgeschriebenen *CD177*-mRNA durchgeführt. Hierfür wurden Primer für den Bereich von Exon 1-2 und für den Bereich Exon 6-7 ausgewählt, welche unabhängig von den in der quantitativen Real-Time-PCR verwendeten Primer (Exon 2-3 überspannend) waren. Das Ergebnis der Untersuchung von zwei verschiedenen Spendern wurde in der Abbildung 24 dargestellt. Das Experiment wurde dreimal in unabhängigen Versuchen wiederholt.

schematische Darstellung der *CD177*-proteinkodierenden Sequenz:

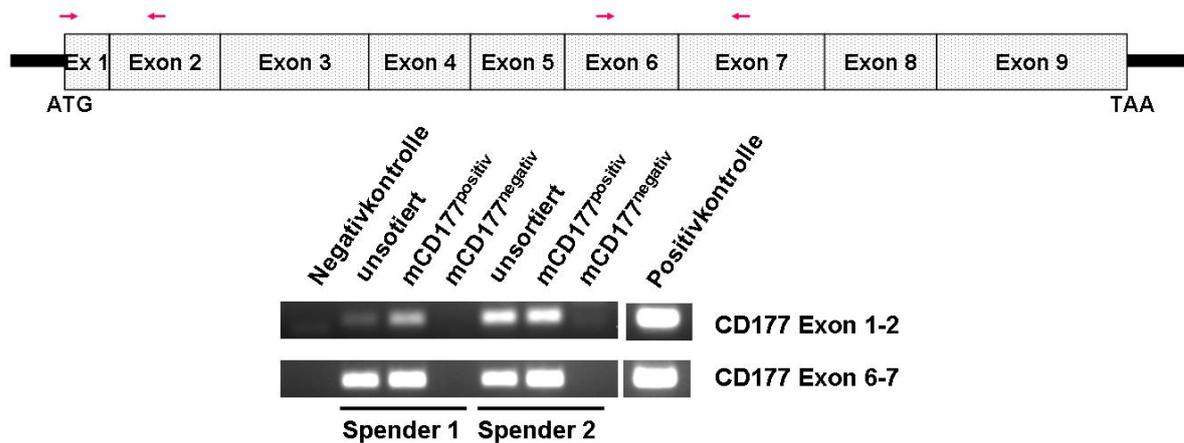


Abb. 24: Untersuchung der *CD177*-mRNA auf Trunkierung. Im oberen Bereich der Abbildung wurde die *CD177*-proteinkodierende Sequenz mit den verwendeten Primern (rote Pfeile) abgebildet. Es wurden Primer im vorderen (Exon 1-2) und im hinteren Bereich (Exon 6-7) der mRNA verwendet. Zur einfacheren Handhabung der mRNA wurde diese in cDNA umgeschrieben und alle PCRs an dieser durchgeführt. Im unteren Bereich der Abbildung wurde das Ergebnis der PCRs an dem Material von zwei unabhängigen Spendern dargestellt. Auf der linken bzw. rechten Seite wurden die stets mitgeführten Negativ- und Positivkontrollen abgebildet. Die PCRs wurden an cDNA von unsortierten und sortierten ($mPR3^{\text{hoch}}/mCD177^{\text{positiven}}$ - und $mPR3^{\text{niedrig}}/mCD177^{\text{negativen}}$) Zellen durchgeführt.

Anhand der PCRs mit den unterschiedlichen Primerpaaren konnte keine trunkierte Form der *CD177*-mRNA nachgewiesen werden. Die Hypothese, dass möglicherweise eine trunkierte *CD177*-mRNA vorzeitig abgebaut und damit zu keiner *CD177*-Proteinsynthese führen könnte, konnte somit nicht bestätigt werden.

Zusammenfassend konnte für die $mPR3^{\text{hoch}}/mCD177^{\text{positiven}}$ neutrophilen Granulozyten gezeigt werden, dass die Zellen das *CD177*-Gen transkribierten, in ein Protein translatierten und dieses auf der Zelloberfläche präsentierten. Für die $mPR3^{\text{niedrig}}/mCD177^{\text{negativen}}$ neutrophilen Granulozyten konnte weder eine *CD177*-mRNA-Transkription noch eine Proteintranslation nachgewiesen werden.

Um die *CD177*-Expression während der Ausreifung von Granulozyten detailliert untersuchen zu können, wurde ein Zellsystem etabliert bei dem *CD34*-positive hämatopoetische Stammzellen zu reifen neutrophilen Granulozyten differenziert werden.

3.2.2. Differenzierungsverlauf von CD34-positiven Zellen zu reifen neutrophilen Granulozyten

Reife, im Blut zirkulierende neutrophile Granulozyten sind sehr kurzlebige Zellen und können daher nur sehr eingeschränkt oder gar nicht für Untersuchungen über Zeiträume von mehr als 24 Stunden verwendet werden. Aus diesem Grunde etablierten wir ein *in vitro* Zellsystem, bei dem CD34-positive hämatopoetische Stammzellen aus Nabelschnurblut isoliert, expandiert und anschließend in neutrophile Granulozyten differenziert wurden. Während der Differenzierung der Zellen sollte die CD177-RNA-Genexpression als auch die CD177-Proteinexpression untersucht werden, um Informationen zur Kinetik der Entstehung der mPR3^{hoch}/mCD177^{positiven}- und mPR3^{niedrig}/mCD177^{negativen} Zellpopulation zu erhalten.

3.2.2.1. Analyse mittels Durchflusszytometrie während des Differenzierungsverlaufs

Der Differenzierungsverlauf der CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen zu neutrophilen Granulozyten wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie verfolgt und dokumentiert. Dabei wurden die Zellmorphologie, typische neutrophile Granulozytenmarker sowie die zu untersuchenden Oberflächenproteine CD177 und PR3 analysiert. In der Abbildung 25 wurden die Ergebnisse der Durchflusszytometrie exemplarisch für einen Differenzierungsverlauf von mehr als zehn untersuchten unabhängigen Verläufen dokumentiert. Es wurden für die Darstellung drei Zeitpunkte (Tag null, sieben und zehn) während der 14-tägigen Differenzierung ausgewählt, um den Differenzierungsstatus zu zeigen.

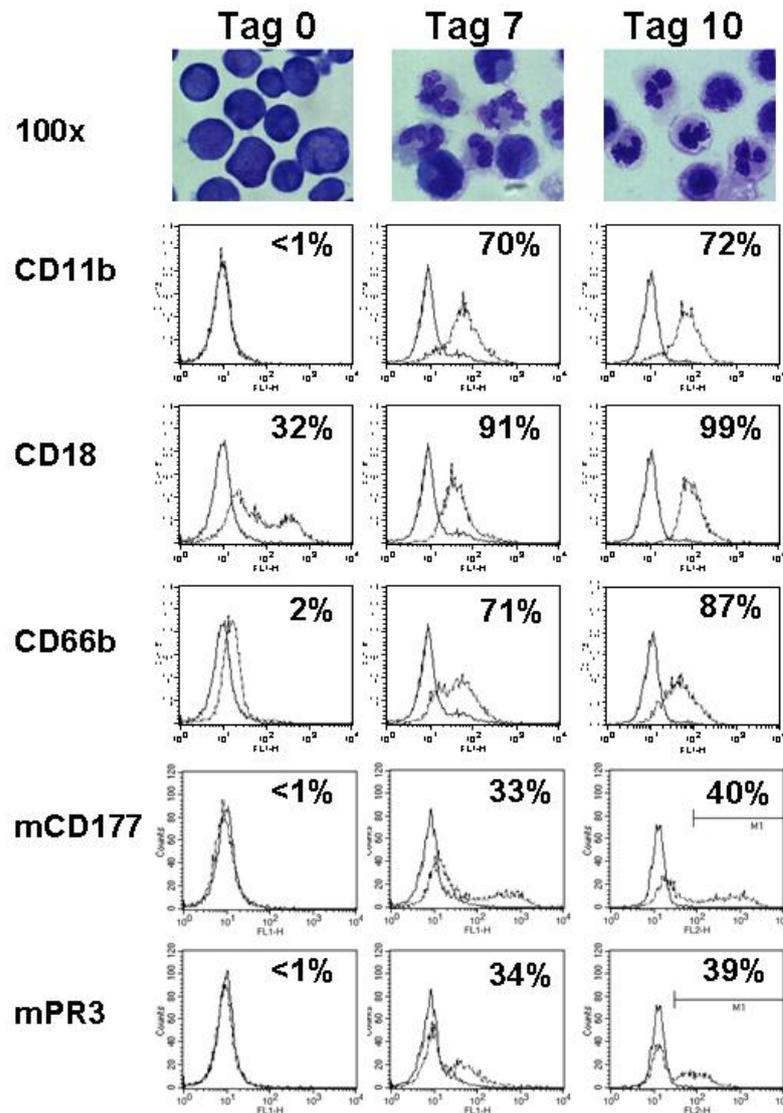


Abb. 25: Durchflusszytometrische Analyse des Oberflächenmarkers mCD177 und mPR3 sowie von anderen typischen neutrophilen Granulozytenmarkern (CD11b, CD18 und CD66b) in dem *in vitro* Differenzierungsmodell CD34-positiver hämatopoetischer Stammzellen. Dargestellt wurden die Ergebnisse an Tag null, sieben und zehn der Differenzierung. Die durchflusszytometrische Messung der Zellmembranexpression von Markerproteinen zeigte, dass die CD34-positiven Zellen zu neutrophilen Granulozyten differenzierten. Der Differenzierungsstatus in der Zellmorphologie wurde mittels Giemsa-Färbung und anschließender Mikroskopie mit 100-facher Vergrößerung dokumentiert. Am Tag sieben konnte eine eindeutige CD177- und PR3-Zellmembranexpression beobachtet werden. In den durchflusszytometrischen Abbildungen wurde durch die x-Achse die Fluoreszenzintensität (FL1-H) und durch die y-Achse die Zellzahl (Counts) wiedergegeben. Damit der Differenzierungsstatus einfacher erfasst werden konnte, wurde der Prozentsatz an positiven Zellen in jeder Abbildungen dokumentiert (von Vietinghoff u. a. 2007).

Es konnte mit Hilfe der Giemsa-Färbung gezeigt werden, dass die Zellen bereits am Tag sieben die typische Morphologie mit polymorphen Zellkernen von reifen neutrophilen

Granulozyten besaßen. Des Weiteren konnte ein Expressionsanstieg typischer Oberflächenmarker detektiert werden. Hierbei erhöhte sich die Oberflächenexpression von CD11b von weniger als ein Prozent am Tag null auf 70 Prozent am Tag sieben, bei CD66b von zwei Prozent am Tag null auf 71 Prozent am Tag sieben und bei CD18 von 32 Prozent am Tag null auf 91 Prozent am Tag sieben. Die Analyse der mCD177- und mPR3-Expression zeigte, eine fehlende Expression am Tag null, welche aber bis zum Tag sieben auf 33-34 Prozent anstieg. Beim Vergleich der Ergebnisse von Tag sieben mit dem Tag zehn wurde deutlich, dass die Zellen bereits am Tag sieben vollständig zu neutrophilen Granulozyten differenziert waren und dass die Expression der betrachteten Oberflächenmarker ein Plateau erreicht hatte. Interessant bei der Analyse der Differenzierung war, dass die CD34-positiven Zellen auch im *in vitro* Zellsystem zu mPR3^{hoch}/mCD177^{positiven} und mPR3^{niedrig}/mCD177^{negativen} neutrophilen Granulozyten differenzierten. Im Folgenden sollte an diesem Modellsystem gezeigt werden, ob die detektierte bimodale mCD177-Expression auf das Fehlen der mRNA-Transkription, wie bei reifen neutrophilen Granulozyten aus Vollblut, zurückzuführen ist.

3.2.2.2. Genexpressionsanalyse von CD177 und PR3 während des Differenzierungsverlaufs

Während der Differenzierung der CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen zu neutrophilen Granulozyten wurde die CD177- und PR3-Genexpression analysiert. In der folgenden Abbildung 26 wurden die Genexpressionsdaten von vier unabhängigen Differenzierungsexperimenten zusammengefasst.

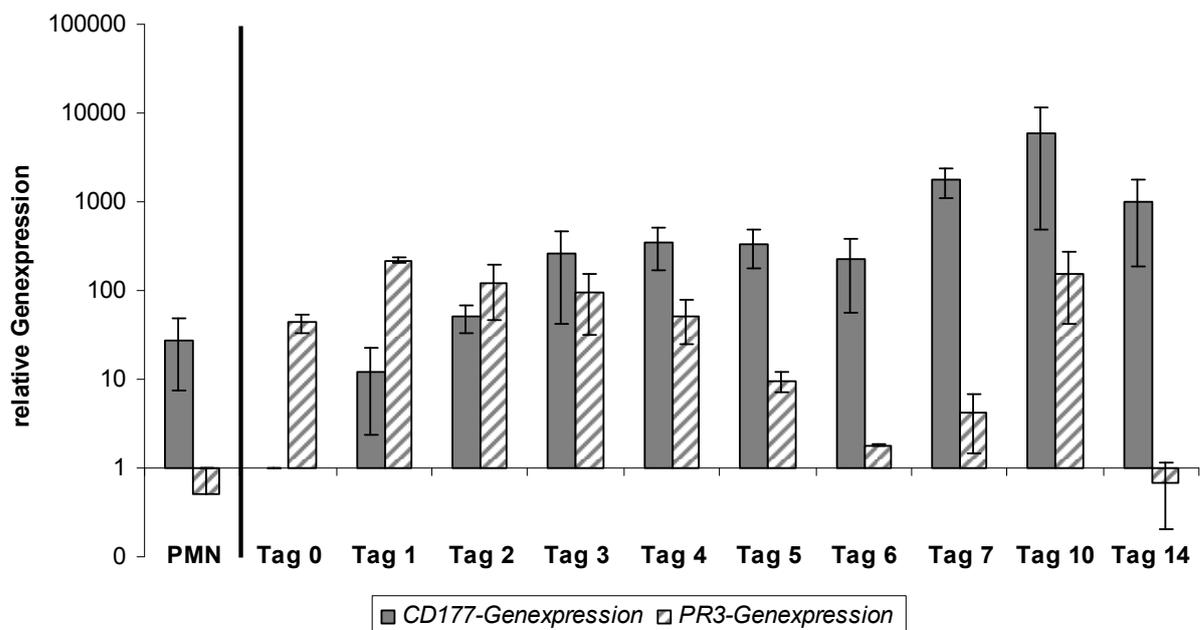


Abb. 26: Genexpressionsanalyse der CD177- und PR3-mRNA mittels quantitativer Real-Time-PCR im *in vitro* Differenzierungsmodell. Auf der linken Seite der Grafik wurden die CD177- und PR3-Genexpressionsdaten von reifen polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) aus dem Nabelschnurvollblut dargestellt. Rechts davon wurden die Genexpressionsdaten von

Tag null bis Tag 14 der Differenzierung CD34-positiver hämatopoetischer Stammzellen aus dem Nabelschnurblut dokumentiert (x-Achse). Auf der y-Achse wurde die relative Genexpression der betrachteten Gene in logarithmischer Darstellung abgebildet. Als interner Standard diente das Referenzgen *18S-rRNA*.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Genexpressionsverläufe von *CD177* und *PR3* während der Differenzierung der CD34-positiven Zellen aus Nabelschnurblut in neutrophile Granulozyten unterschieden. *PR3*-mRNA wurde bereit in undifferenzierten CD34-positiven Zellen (Tag null) exprimiert. Die *PR3*-Genexpression zeigte am Tag eins ein Maximum und nahm danach bis Tag 14 wieder ab. Am Tag 14 war keine signifikante *PR3*-mRNA mehr nachweisbar, ähnlich wie bei den ausdifferenzierten neutrophilen Granulozyten aus dem Blut. Warum die Genexpression am Tag zehn der Differenzierung einen zwischenzeitlichen Anstieg zeigte, war unklar. Im Gegensatz zum *PR3*-Gen konnte in undifferenzierten CD34-positiven Zellen noch keine *CD177*-mRNA-Expression gezeigt werden. Diese begann erst ab Tag eins nach Gabe der Differenzierungszusätze. Die *CD177*-Genexpression stieg im Verlauf der Differenzierung bis Tag zehn immer weiter an, wobei am Tag 14 die Expression leicht rückläufig zu verzeichnen schien. Ähnlich wie bei ausdifferenzierten neutrophilen Granulozyten aus dem Blut war eine signifikante *CD177*-mRNA Menge am Ende des Differenzierungsprozesses der CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen nachweisbar. Als Referenzgen wurde das Gen für die ribosomale RNA 18S mitgeführt.

Die *in vitro* Experimente zeigten ein reproduzierbares bimodales Membranexpressionsmuster, sowie eine reproduzierbare distinkte mRNA-Kinetik für *PR3* und *CD177* in differenzierenden CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen. Dieses Zellmodell war somit für Experimente zur Aufdeckung der Regulation von *CD177* geeignet.

3.2.3. Vergleich der $mPR3^{\text{hoch}}/mCD177^{\text{positiven}}$ - mit den $mPR3^{\text{niedrig}}/mCD177^{\text{negativen}}$ CD34-positiven differenzierten Stammzellen

Während der *in vitro* Differenzierung von CD34-positiven Stammzellen zu neutrophilen Granulozyten wurde deutlich, dass sowohl $mPR3^{\text{hoch}}/mCD177^{\text{positiven}}$ - als auch $mPR3^{\text{niedrig}}/mCD177^{\text{negativen}}$ Zellen entstanden. In der Abbildung 27 der durchflusszytometrischen Analyse wurden zwei distinkte *mCD177*-exprimierende bzw. -nicht exprimierenden Populationen detektiert.

Diese beiden Populationen von *CD177*-membranexprimierenden Zellen wurden nachfolgend bezüglich der Zellmorphologie, der endogenen Proteinexpression und der mRNA-Expression verglichen.

3.2.3.1. Sortierungsanalyse der CD34-positiven differenzierten Stammzellen mittels der Durchflusszytometrie

Damit die beiden unterschiedlich mCD177-exprimierenden Zellpopulationen separat voneinander untersucht werden konnten, wurde eine Sortierung dieser neutrophilen Granulozyten mit Hilfe der Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Sortierung der Zellen erfolgte standardisiert nach vorheriger durchflusszytometrischen Kontrolle am Tag sechs der Differenzierung. Die Zellsortierung erfolgte aufgrund der CD177-Zellmembranexpression unter Einsatz eines Fluoreszenzfarbstoff-markierten CD177-Antikörpers. Um auszuschließen, dass sich in den sortierten Zellpopulation noch undifferenzierte bzw. noch nicht vollständig differenzierte Zellen befanden, wurden die Zellen gleichzeitig mit einem zweiten neutrophilen granulozytenspezifischen Marker sortiert. Wir wählten den Oberflächenmarker CD16, welcher ausschließlich auf reifen neutrophilen Granulozyten nachzuweisen ist (CD16). Zur Kontrolle wurde von jeder sortierten Populationen ein Aliquot mit Hilfe der Durchflusszytometrie überprüft. Ein repräsentatives Ergebnis der Kontrollmessung mittels Durchflusszytometrie wurde in der Abbildung 27 dargestellt.

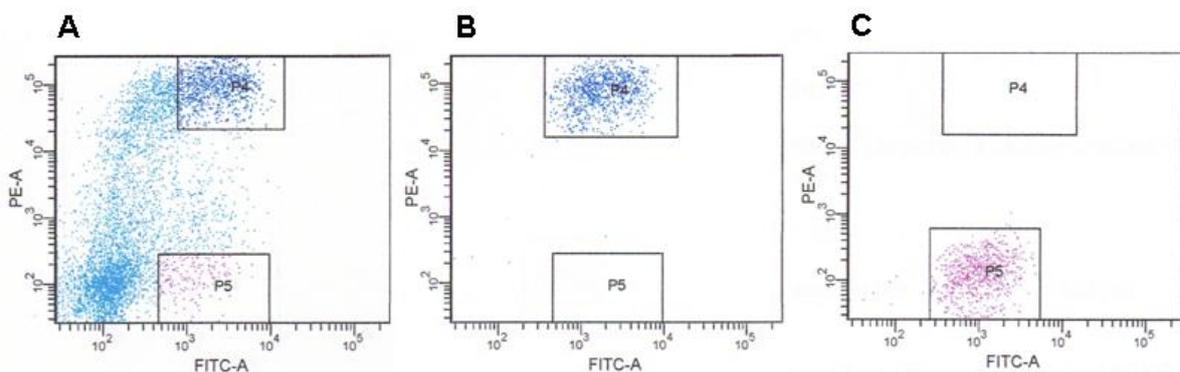


Abb. 27: Durchflusszytometrische Dokumentation der Zellsortierung von differenzierten CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen. In allen drei Grafiken wurde die Färbung für mCD177 (PE-markierter monoklonaler Antikörper für CD177) auf der y-Achse und die Färbung für CD16 (FITC-markierter monoklonaler Antikörper für CD16) auf der x-Achse dargestellt. In der Abbildung A wurden die unsortierten Ausgangszellen abgebildet sowie die für die Sortierung gesetzten Grenzen (Viereck P4 und P5). In der Abbildung B wurden die mCD177^{positiven}/CD16^{positiven} sortierten Zellen und in der Abbildung C die mCD177^{negativen}/CD16^{positiven} sortierten Zellen dargestellt. Sowohl in Abbildung B als auch in C befanden sich ca. 98% der sortierten Zellen in den vorgegebenen Grenzen P4 und P5, was eine sehr hohe Reinheit der Zellpopulationen dokumentierte.

Die durchflusszytometrische Kontrolldokumentation zeigte zum einem in der Abbildung A, dass noch undifferenzierte Zellen im Ausgangsmaterial enthalten waren (CD16^{negative} Zellen) und zum anderen, dass durch die stringente Grenzsetzung während der Sortierung, eine hohe Reinheit an mCD177^{positiven}- und mCD177^{negativen} Zellen erzielt wurde. Somit war die Verwendung eines spezifischen neutrophilen Granulozytenmarkers für reife Zellen, wie

CD16, von größter Notwendigkeit. Anhand der Abbildungen B und C wurde bewiesen, dass die $mCD177^{\text{positive}}$ als auch die $mCD177^{\text{negative}}$ Zellpopulation über eine sehr hohe Reinheit der Zellen verfügte. Somit konnte in den Folgeexperimenten mit gut separierten Zellpopulationen gearbeitet werden.

3.2.3.2. Giemsa-Färbungen der differenzierten $mCD177^{\text{positiven}}$ - und $mCD177^{\text{negativen}}$ neutrophilen Granulozyten

Zum direkten Vergleich der Zellmorphologie der sortierten neutrophilen Granulozyten aus der *in vitro* Differenzierung wurden die Zellen mit der Giemsa-Färbung angefärbt und mittels Mikroskopie dokumentiert (s. Abb. 28).

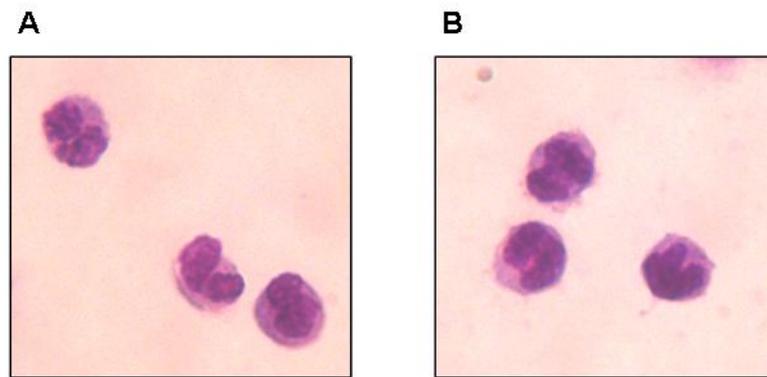


Abb. 28: Giemsa-Färbung zur Untersuchung der Morphologie der sortierten $mCD177^{\text{positiven}}$ - und $mCD177^{\text{negativen}}$ Zellen aus dem *in vitro* Differenzierungsverlauf CD34-positiver hämatopoetischer Stammzellen. In der Abbildung A wurden die $mCD177^{\text{positiven}}/mCD16^{\text{positiven}}$ neutrophilen Granulozyten und in der Abbildung B die $mCD177^{\text{negativen}}/mCD16^{\text{positiven}}$ neutrophilen Granulozyten mit einer Giemsa-Färbung dargestellt. Die Mikroskopie erfolgte mit einer 100-fachen Vergrößerung der Zellen.

Die zwei Zellpopulationen von $mCD177^{\text{positiven}}/CD16^{\text{positiven}}$ - und $mCD177^{\text{negativen}}/CD16^{\text{positiven}}$ Zellen unterschieden sich nicht in der Giemsa-Färbung in ihrer Morphologie und ihrem Reifungsgrad. Beide Zellpopulationen wiesen eine sehr ähnliche Zellgröße auf und besaßen einen für neutrophile Granulozyten typischen polymorphen Zellkern.

3.2.3.3. Analyse der Proteinexpression von PR3 und CD177 in differenzierten $mCD177^{\text{positiven}}$ - und $mCD177^{\text{negativen}}$ neutrophilen Granulozyten

Im folgenden Abschnitt der Arbeit wurde die PR3- und CD177-Proteinexpression zwischen der $mPR3^{\text{hoch}}/mCD177^{\text{positiven}}$ und $mPR3^{\text{niedrig}}/mCD177^{\text{negativen}}$ Zellpopulation aus CD34-positiven neutrophil-differenzierten hämatopoetischen Stammzellen durchgeführt. Hierfür wurden von beiden Populationen Zelllysate mit gleichen Zellzahlen hergestellt und anschließend eine SDS-Gelelektrophorese mit Western Blot-Analyse durchgeführt. In der

Abbildung 29 wurde ein typisches Ergebnis der PR3- und CD177-Proteinanalyse von mehr als fünf unabhängigen *in vitro* Differenzierungen und Zellsortierungen abgebildet.

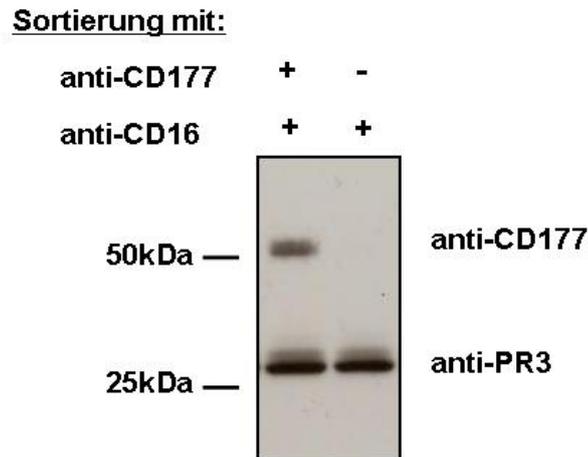


Abb. 29: Western Blot-Analyse für das CD177-Protein (oben) und das PR3-Protein (unten) an den zwei sortierten Zellpopulationen. Sortiert wurde mit Antikörpern gegen CD177 und CD16. Im oberen Bereich des Western Blots war die Expression der exprimierten Oberflächenmoleküle auf der Zellmembran aufgeführt. In der linken Spur wurde das Gesamtprotein der $mCD177^{\text{positiven}}/CD16^{\text{positiven}}$ Zellen aufgetragen und in der rechten Spur das Gesamtprotein der $mCD177^{\text{negativen}}$, jedoch $CD16^{\text{positiven}}$ Zellen. Zur Detektion des Proteins CD177 wurde der Antikörper anti-CD177 (IgG1; Klon MEM166) und zur Detektion von PR3 der Antikörper anti-PR3 (IgG1; Klon 4A5) verwendet.

Beim Vergleich der PR3-Proteinexpression der $mCD177^{\text{positiven}}/mCD16^{\text{positiven}}$ - mit den $mCD177^{\text{negativen}}/CD16^{\text{positiven}}$ Zellen konnte anhand der Western Blot-Analyse kein Unterschied detektiert werden. Die PR3-Proteinbanden sind in beiden Spuren gleichmäßig ausgeprägt, wobei auch die Proformen des PR3-Proteins jeweils erfasst wurden.

Bei der Betrachtung der CD177-Gesamtproteinanalyse in den beiden Zellpopulationen konnte gezeigt werden, dass das CD177-Protein in den $mCD177^{\text{positiven}}/CD16^{\text{positiven}}$ Zellen, jedoch nicht in den $mCD177^{\text{negativen}}/CD16^{\text{positiven}}$ Zellen nachgewiesen werden konnte. Es konnte, wie bereits bei den reifen neutrophilen Granulozyten aus Vollblut gezeigt wurde, keine endogene Proteinexpression von CD177 in den $mCD177^{\text{negativen}}$ Zellen detektiert werden. Die Daten bestätigten die Annahme, dass die Regulation von CD177 auf mRNA Ebene stattfindet. Aus diesem Grunde wurde an den $mCD177^{\text{positiven}}/CD16^{\text{positiven}}$ und den $CD177^{\text{negativen}}/CD16^{\text{positiven}}$ Zellen eine Analyse der mRNA-Expression dieses Gens durchgeführt.

3.2.3.4. mRNA-Genexpressionsanalyse von *PR3* und *CD177* in differenzierten mCD177^{positiven}- und mCD177^{negativen} neutrophilen Granulozyten

In diesen Teil sollte, analog zu den Untersuchungen in reifen neutrophilen Granulozyten aus frischem Vollblut, untersucht werden, ob die Regulation der CD177-Proteinexpression bereits auf der Ebene der mRNA-Genexpression erfolgt. Hierfür wurde aus gleichen Mengen an differenzierten mCD177^{positiven}/CD16^{positiven} und mCD177^{negativen}/CD16^{positiven} Zellen RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR untersucht. In der folgenden Abbildung 30 wurden die Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalysen von drei unabhängigen *in vitro* Differenzierungen mit Zellsortierung zusammengefasst.

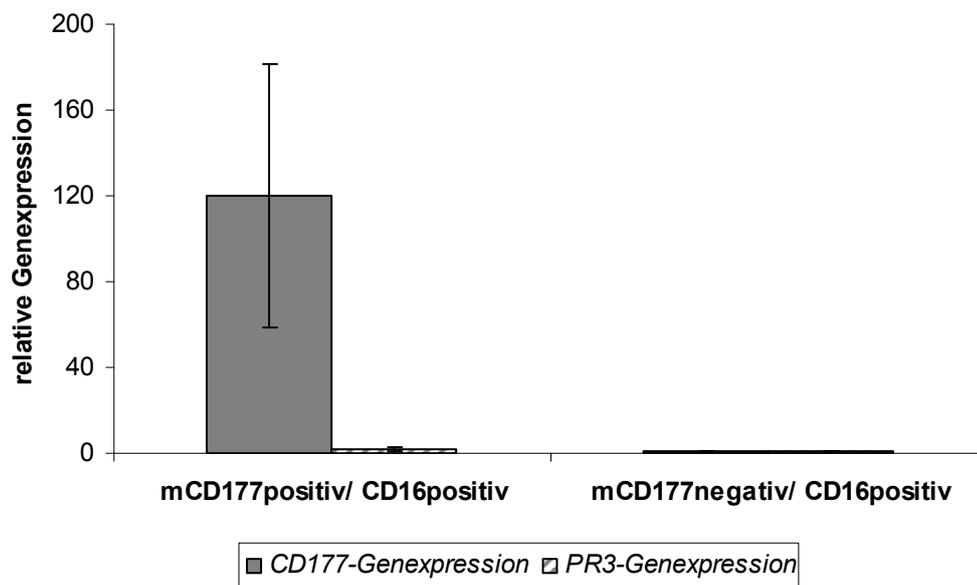


Abb. 30: Genexpressionsanalyse der *CD177*- und *PR3*-mRNA mittels quantitativer Real-Time-PCR an den beiden aus CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen differenzierten und sortierten Granulozytenpopulationen von mCD177^{positiven}- und mCD177^{negativen} Zellen. Anhand der y-Achse wurde die relative Genexpression der betrachteten Gene angegeben. Als interner Standard wurde das Referenzgen *18S-rRNA* verwendet.

Die Analyse der *PR3*-Genexpression zeigte keinen Unterschied beim Vergleich der mCD177-positiven/CD16-positiven Zellen gegenüber den mCD177^{negativen}/CD16^{positiven} Zellen. In beiden Zellpopulationen konnte nur eine minimale Expression detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich in den mCD177^{positiven}/CD16^{positiven} Zellen eine 120-fach erhöhte relative Genexpression des *CD177*-Gens gegenüber den mCD177^{negativen}/CD16^{positiven} Zellen. Die hohe Standardabweichung ist in der hohen Expressionsvarianz zwischen den Zellen verschiedener CD34-positiver hämatopoetischer Stammzellspender begründet.

Zusammenfassend konnte für die aus CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen differenzierten mCD177^{positiven} neutrophilen Granulozyten festgestellt werden, dass sowohl eine *CD177*-mRNA als auch ein Protein gebildet wird, welches dann auf der Zellmembran präsentiert werden kann. Für die differenzierten mCD177^{negativen} neutrophilen Granulozyten hingegen konnte keine Transkription des *CD177*-Gens in eine mRNA und kein Protein auf oder in der Zelle nachgewiesen werden.

Wir hypothesierten, dass die Ursachen für die unterschiedlich *CD177*-exprimierenden Zellpopulationen von neutrophilen Granulozyten auf genetischer oder epigenetischer Regulationsebene des *CD177*-Gens liegen müsste. Aus diesem Grunde wurden in den folgenden Abschnitten der vorliegenden Arbeit verschiedene Hypothesen zur Regulation des *CD177*-Gens untersucht.

3.3. Charakterisierung der genetischen Regulation der *CD177*-Expression

Im letzten Teil der Arbeit sollte die genetische Regulation der *CD177*-Genexpression näher untersucht werden, um der Frage nachzugehen, warum die zwei Zellpopulationen von mPR3^{niedrig}/mCD177^{negativen}- und PR3^{hoch}/mCD177^{positiven} Zellen entstehen und warum das quantitative Verhältnis der beiden Populationen in einem gegebenen Individuum konstant bleibt.

Wie bereits im Einleitungsteil erwähnt wurde, belegte die vorangegangene Zwillingsstudie (Schreiber u. a. 2003) einen starken genetischen Hintergrund als Ursache für die quantitativen Populationsanteile an mPR3^{niedrig}/mCD177^{negativen} und mPR3^{hoch}/mCD177^{positiven} Zellen. In dieser Studie konnte eine deutliche Korrelation zwischen den mPR3-Expressionen der neutrophilen Granulozyten in eineiigen (monozygoten) Zwillingen im Gegensatz zu zweieiigen (dizygoten) Zwillingen nachgewiesen werden. Ausgehend von den historischen und aktuellen Daten dieser Arbeit wurden verschiedene Hypothesen untersucht, die möglicherweise eine Stilllegung der *CD177*-Genexpression erklären könnten.

3.3.1. Untersuchung der *CD177*-Genregion auf intrachromosomale Rekombination mit dem Pseudogen

In der Literatur wurde 2002 von Stankiewicz und Lupski beschrieben, dass eine intrachromosomale Rekombination zwischen einem Gen und einer inversen hoch homologen Region, wie beispielsweise einem Pseudogen, durch Ausbildung eines „*stem-loops*“ bei einem der Chromatiden zur Deletion, Insertion oder Inversion der betreffenden Region führen kann (Stankiewicz & Lupski 2002). Bettinotti und andere beschrieben 2002 erstmalig ein revers auf dem Antisense-Strang des Chromosom 19 liegendes Pseudogen von *CD177* (Bettinotti u. a. 2002). Dieses Pseudogen besitzt eine hohe genomische Homologie zum *CD177*-Gen von Exon 4 bis 9. Aus diesem Grunde untersuchten wir die Hypothese, ob es

zwischen dem *CD177*-Gen und seinem Pseudogen zur somatischen intrachromosomalen Rekombination kommt. Es wäre in diesem Falle möglich, dass es bedingt durch die somatische intrachromosomale Rekombination zum Verlust oder zur Verminderung der Transkription des Gens kommen könnte und damit kein CD177-Protein mehr entstehen würde.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden Southern Blots an genomischer DNA von $mPR3^{\text{hoch}}/mCD177^{\text{positiven}}$ und $mPR3^{\text{niedrig}}/mCD177^{\text{negativen}}$ neutrophilen Granulozyten von drei Probanden und an genomischer DNA von einem vollständigen $mCD177^{\text{negativen}}$ Probanden durchgeführt. Die genomische DNA der verschiedenen Zellpopulationen wurde für die eindeutige Verifizierung separat mit den zwei Restriktionsenzymen *HindIII* bzw. *SacI* geschnitten und anschließend auf einem 0,8-prozentigem Agarosegel aufgetrennt. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde die aufgetrennte DNA auf eine Nylonmembran transferiert und die Analyse erfolgte mit zwei spezifischen ^{32}P -radioaktiv-markierten Sonden, die jeweils eine 800bp-lange genomische Region von Exon 4-5 und im Exon 9 detektierten. Mit den gewählten Sonden konnte sowohl das *CD177*-Gen als auch das Pseudogen eruiert werden. Im Southern Blot wurden durch die Restriktion mit *HindIII* bzw. *SacI* unterschiedlich große Fragmente des Gens und des Pseudogens nachgewiesen (s. Abb. 31).

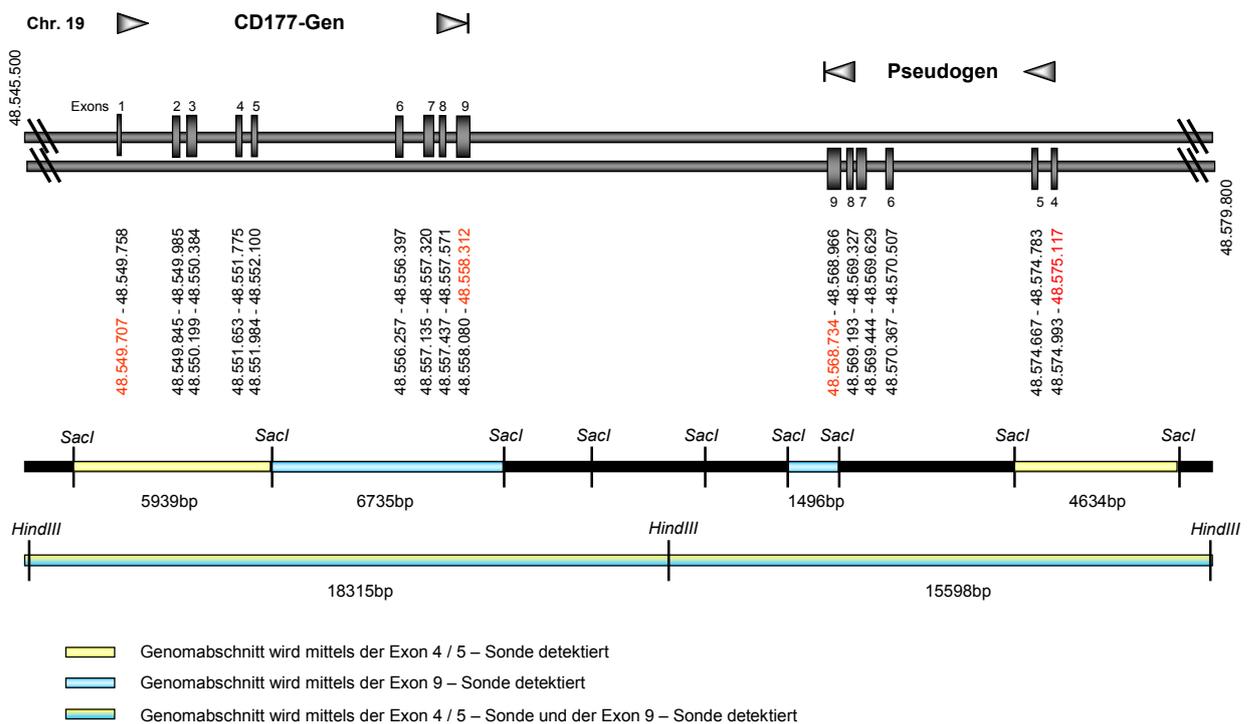


Abb. 31: Schematische Darstellung des *CD177*-Gens und des Pseudogens auf Chromosom 19q13.31 und den zu detektierenden Restriktionsfragmenten für eine Restriktion mit *SacI* oder *HindIII* und Verwendung der Exon 4/5- oder Exon 9-Sonde.

Bei Auftreten einer intrachromosomalen Rekombination zwischen dem *CD177*-Gen und dem Pseudogen hätte ein unterschiedliches Bandenmuster zwischen den

mPR3^{hoch}/mCD177^{positiv} und den mPR3^{niedrig}/mCD177^{negativ} neutrophilen Granulozyten dedektiert werden müssen. Die Untersuchung ergab, dass keine Rekombination der genomischen *CD177*-Genregion in den beiden Zellpopulationen nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 32 und Abb. 33).

Exon 4/5 – ³²P-Sonde:

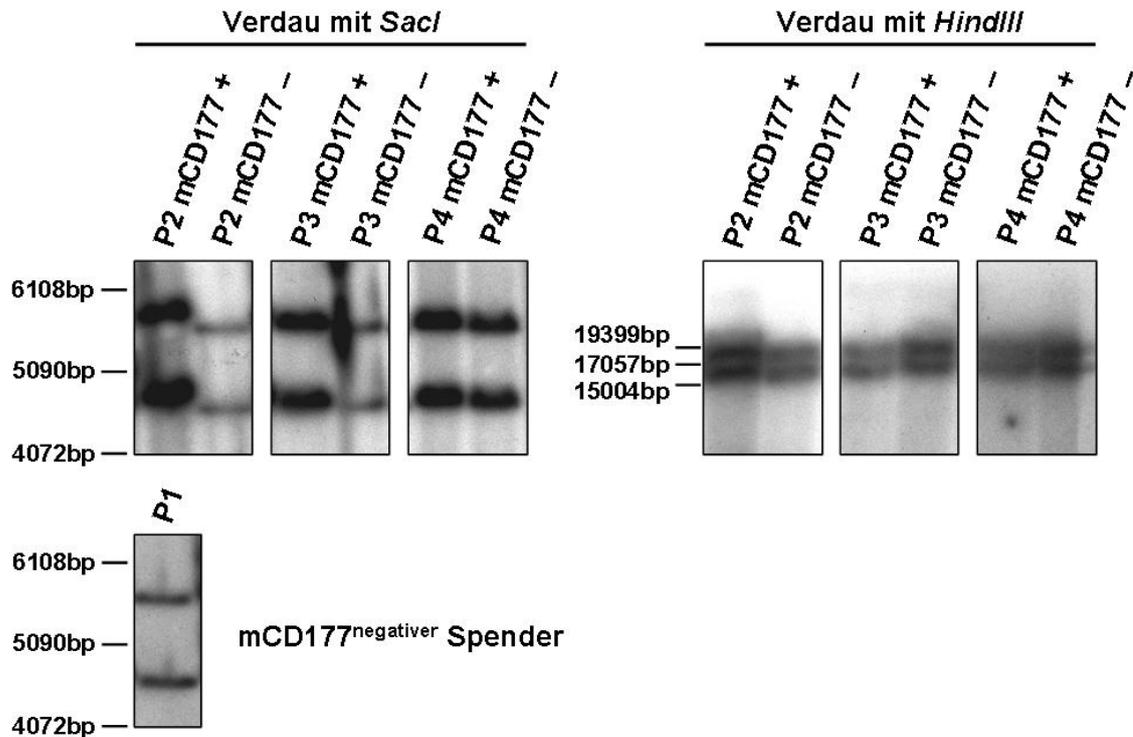


Abb. 32: Ergebnis der Southern Blots von *SacI* und *HindIII*-geschnittener genomischer DNA von mPR3^{hoch}/mCD177^{positiv} und mPR3^{niedrig}/mCD177^{negativ} sortierten neutrophilen Granulozyten an drei Probanden (P2-P4) sowie an der genomischen DNA von einem mCD177^{negativen} Probanden (P1; mCD177 null prozentig) mit der Exon 4/5-Sonde.

Exon 9 – ^{32}P -Sonde:

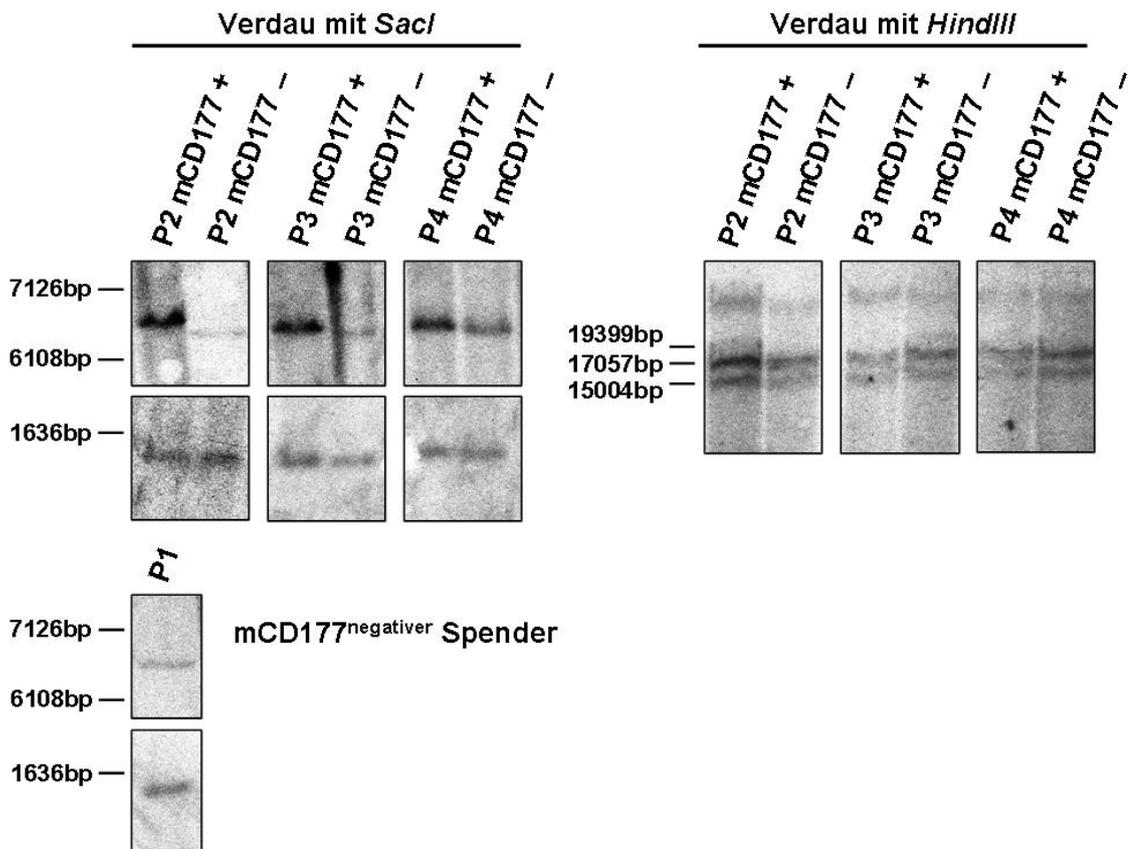


Abb. 33: Ergebnis der Southern Blots von *SacI* und *HindIII*-geschnittener genomischer DNA von $\text{mPR3}^{\text{hoch}}/\text{mCD177}^{\text{positiv}}$ und $\text{mPR3}^{\text{niedrig}}/\text{mCD177}^{\text{negativ}}$ sortierten neutrophilen Granulozyten an drei Probanden (P2-P4) sowie an der genomischen DNA von einem $\text{mCD177}^{\text{negativen}}$ Probanden (P1; mCD177 null prozentig) mit der Exon 9-Sonde.

3.3.2. Untersuchung der mCD177-Populationen auf Vorhandensein der Deletion 2244 auf genomischer Ebene

Eine weitere Hypothese basierte auf der Suche der *Copy number variation* (CNV) 2244 in den $\text{mPR3}^{\text{hoch}}/\text{CD177}^{\text{positiven}}$ und $\text{mPR3}^{\text{niedrig}}/\text{mCD177}^{\text{negativen}}$ neutrophilen Granulozyten auf genomischer Ebene. Diese CNV liegt im gleichen genomischen Bereich auf Chromosom 19, wie das *CD177*-Gen. Die CNV 2244 (Locke u. a. 2006) wurde neben zwei weiteren großen Deletionspolymorphismen (Redon u. a. 2006) in der Datenbank „Genomic Variants on Human Genome“ für den Bereich von Chromosom 19q13.31 beschrieben (s. Abb. 34).

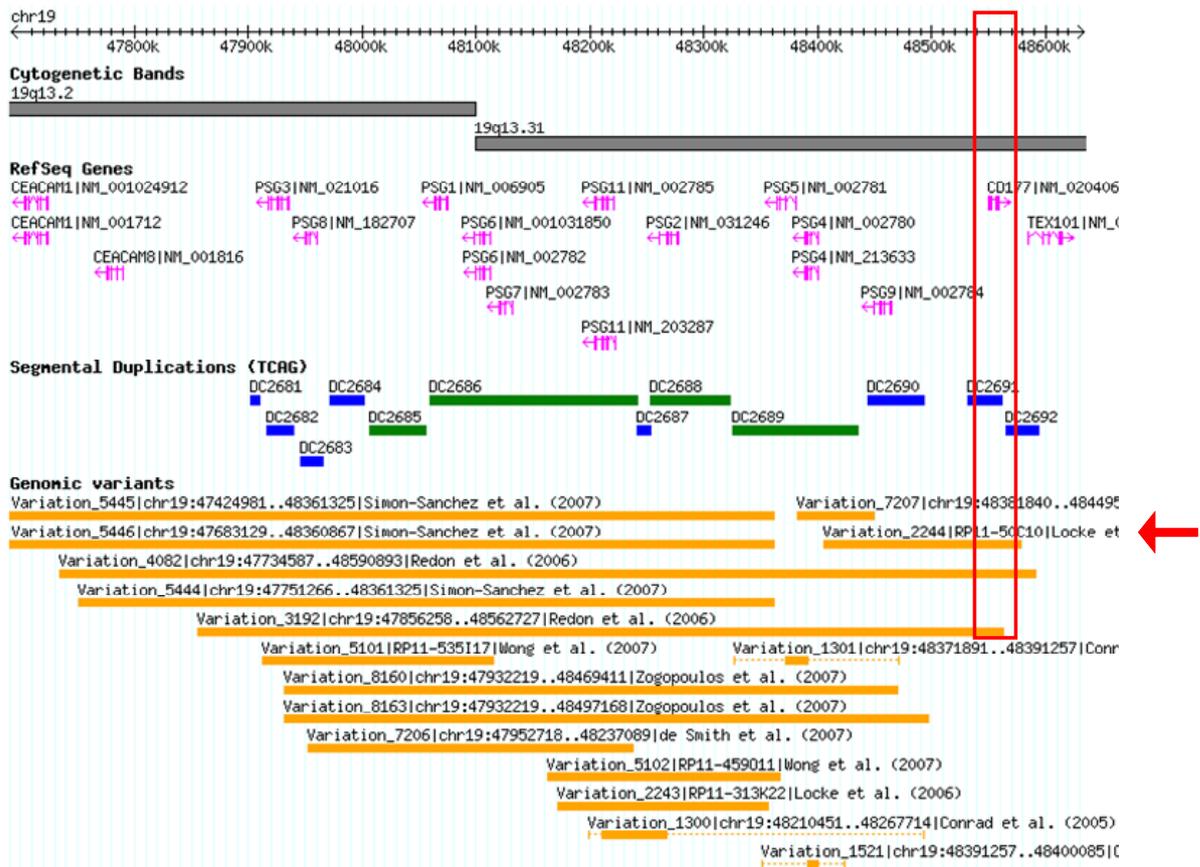


Abb. 34: Ausschnitt aus der Datenbank „Genomic Variants on Human Genome“ für den Bereich von Chromosom 19q13.31 mit den bekannten Deletionspolymorphismen. Durch den roten Rahmen wurde der interessante Bereich vom *CD177*-Gen hervorgehoben und die ausgewählte CNV 2244 wurde mit einem roten Pfeil gekennzeichnet.

Um diese Hypothese zu testen wurde die genomische DNA von neutrophilen Granulozyten von einem mCD177 null-prozentigen, einem mCD177 90-prozentigen und einem mCD177 50-prozentigen Spender, dessen neutrophilen Granulozyten in mCD177^{positive}- und mCD177^{negative} Zellen sortiert wurden, isoliert. Hierfür wurden die Zellen für einen schonenden Zellaufschluss und um eine geringe Scherung der genomischen DNA zu erzielen, in Agaroseblöckchen eingebettet. Der Zellaufschluss erfolgte durch die Behandlung mit Proteinase K und die Fragmentierung der dabei gewonnenen genomischen DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *PmeI* durchgeführt. Zur Auftrennung der hochmolekularen DNA wurde die von Schwartz und Cantor (1984) entwickelte Pulsfeldgelelektrophorese verwendet. Im Anschluss erfolgte der Transfer der DNA auf eine Nylonmembran und die Detektion wurde durch Hybridisierung einer ³²P-radioaktiv-markierten Sonde und Auflegen eines Röntgenfilms durchgeführt.

Bei Vorhandensein der CNV 2244 wäre nur ein Fragment von 257.061bp zu dedektieren gewesen und kein 305.119bp-Fragment (s. Abb. 35).

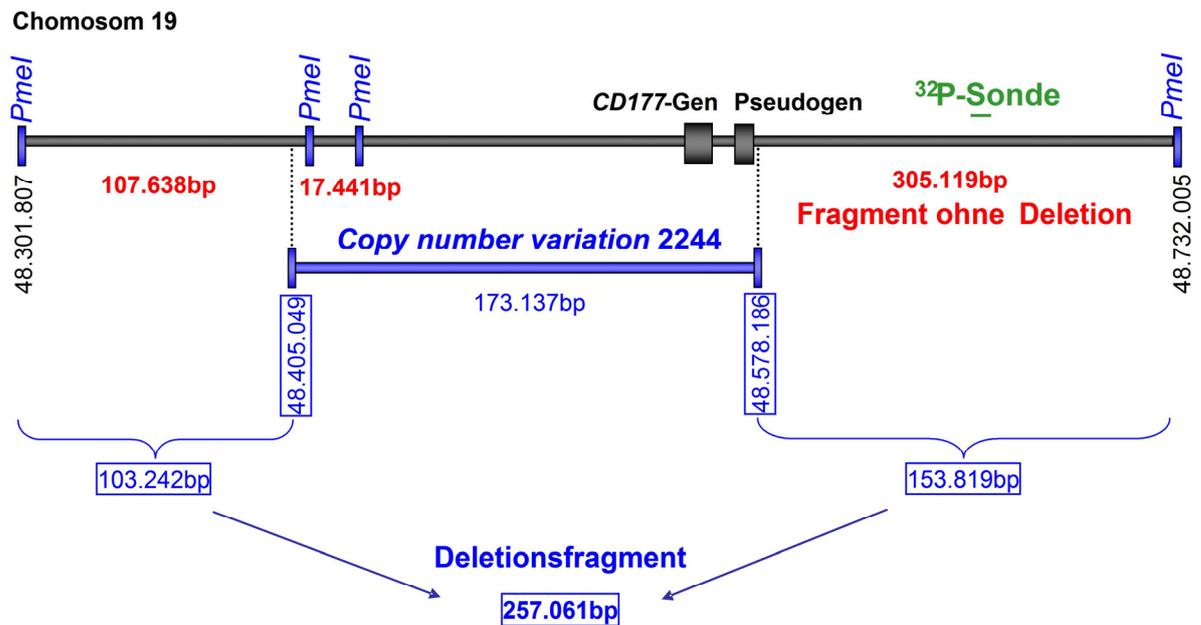


Abb. 35: Schematische Darstellung der möglichen Fragmentkonstellationen beim Southern Blot-Experiment. In blauer Schriftfarbe wurden die Schnittstellen des Restriktionsenzym *PmeI* und die Fragmentgrößen beim Auftreten der CNV 2244 angegeben. In roter Schriftfarbe wurden die Fragmentgrößen angegeben, die regulär entstehen sollten und in grün wurde die verwendete Sonde eingetragen.

Das Ergebnis der Southern Blots zeigte, dass eine Deletion des *CD177*-Gens nicht ursächlich für die bimodale Expressionsverteilung ist, da kein unterschiedliches Bandenmuster zwischen den verschiedenen Probanden zu verzeichnen war (s. Abb. 36).

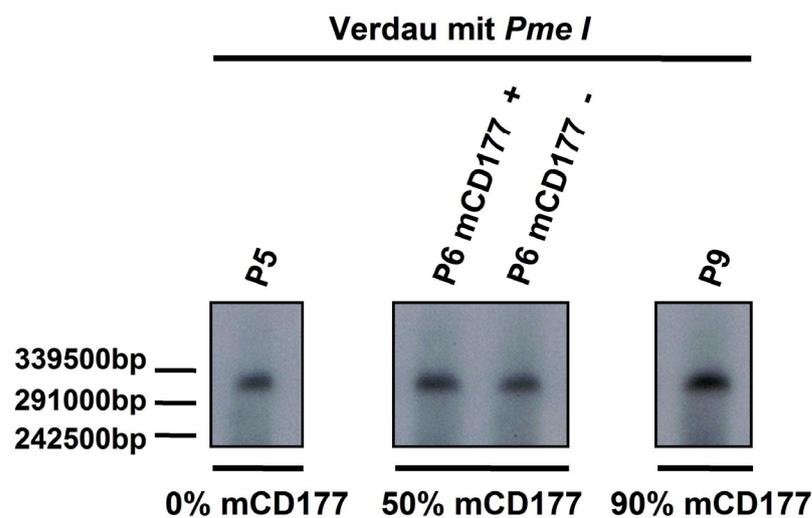


Abb. 36: Ergebnis des Southern Blots für die Untersuchung der CNV 2244 an genomischer DNA eines mCD177-negativen Probandens (P5), eines mCD177 50-prozentigen Probandens (P6), dessen neutrophile Granulozyten auf mCD177 hin sortiert wurden, und eines mCD177 90-prozentigen Probandens (P9).

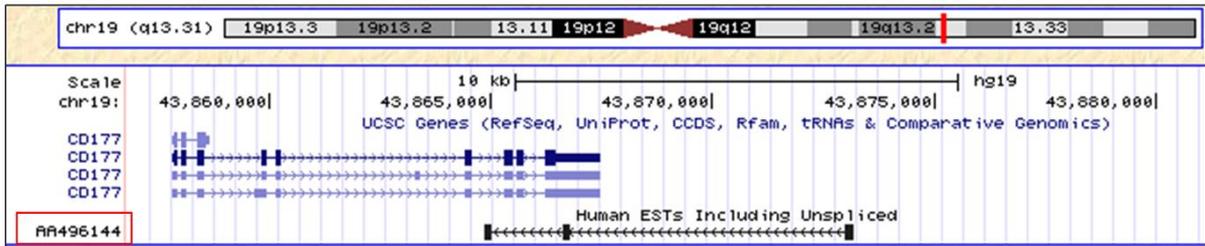
3.3.3. Untersuchung des Einflusses des Antisense-Transkriptes „*Expressed Sequence Tag*“ (*EST*) AA496144 auf die *CD177*-Gen- und Proteinexpression

Als weitere Hypothese für die Erklärung einer $mPR3^{\text{hoch}}/mCD177^{\text{positiven}}$ und $mPR3^{\text{niedrig}}/mCD177^{\text{negativen}}$ neutrophilen Granulozytenpopulation sollte das Vorhandensein eines Antisense-Transkriptes für das *CD177*-Gen untersucht werden.

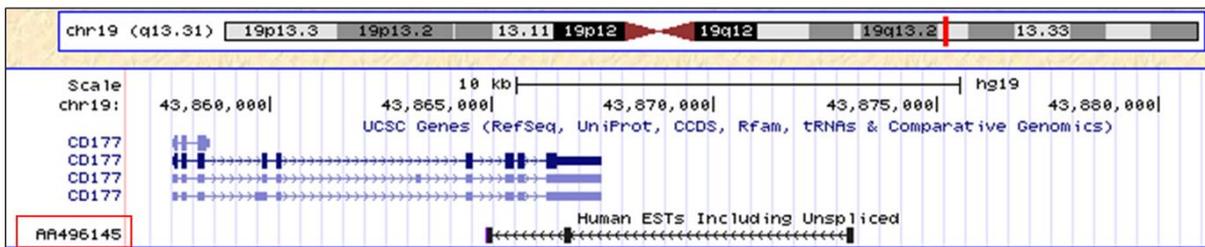
Bei Antisense-Transkripten handelt es sich um komplementäre Sequenzen, die auf dem komplementären Strang zum Zielgen auf der genomischen DNA liegen und durch Überlappung mit dem Zielgen dessen Expression beeinflussen können (Yelin u. a. 2003; Lapidot & Pilpel 2006; Faghihi & Wahlestedt 2009). Lapidot und Pilpel beschrieben 2006, dass die Wirkung eines Antisense-Transkriptes auf ein Zielgen auf drei verschiedenen Wegen erfolgen kann. Zum einen können sich die beiden RNA-Polymerase-Komplexe auf den gegenüber liegenden DNA-Strängen beim Ablesen des Zielgens und des Antisense-Transkriptes aufgrund ihrer Größe gegenseitig behindern. Die Folge dieser Beeinträchtigung wäre, dass beide oder eins der beiden Transkripte nicht mehr abgelesen werden können. Eine zweite Möglichkeit der Wirkung eines Antisense-Transkriptes auf ein Zielgen wäre, dass durch die Bindung des Antisense-Transkriptes an die Zielgen-RNA eine doppelsträngige RNA entsteht, wodurch diese wie beim siRNA-Modell abgebaut oder deren Translation verhindert werden würde. Ebenso könnten die in der doppelsträngigen RNA enthaltenen Adenosine durch Desaminierung in Inosine umgewandelt werden, wodurch die veränderte RNA im Zellkern zurückgehalten oder im Cytoplasma als falsch erkannt werden würde. Die dritte Wirkungsweise eines Antisense-Transkriptes wäre, dass durch die Bildung einer doppelsträngigen RNA unterschiedliche Splicevarianten entstehen könnten. Diese Splicevarianten des Zieltranskriptes wiederum könnten zu einem nicht intakten Protein führen, welches vom Proteasom abgebaut werden würde.

Mit Hilfe der Datenbank „UCSC Genome Browser“ wurde nach bereits bekannten Antisense-Transkripten gesucht. Bis zu diesem Zeitpunkt waren nur zwei sehr homologe „*Expressed Sequence Tags*“ (*ESTs*) bekannt. Aufgrund der hohen Homologie wurde alle nachfolgenden Untersuchungen nur mit dem längeren *EST*, das *EST AA496144*, durchgeführt. Die Homologie dieses *ESTs* bezieht sich auf die Sequenz zum Exon 9 und zum Intron zwischen Exon 6 und 7 des *CD177*-Gens (s. Abb. 37).

A



B



homologe Bereiche vom *CD177*-Gen mit den analysierten ESTs

Abb. 37: Ausschnitt der Datenbank „Genomic Variants on Human Genome“ für den Bereich von Chromosom 19q13.31 mit der Lage des *CD177*-Gens und der zwei potentiellen Antisense-Transkripte (A: *EST AA496144* und B: *AA496145*; rot eingerahmt). Anhand der roten Pfeile wurden die homologen Bereiche des *CD177*-Gens mit den *ESTs* gekennzeichnet.

3.3.3.1. Analyse der *EST*- und *CD177*-Genexpression in neutrophil-differenzierten *CD34*-positiven hämatopoetischen-Stammzellen aus Nabelschnurblut

In diesem Abschnitt der Arbeit wurde der potentielle Einfluss des endogenen Antisense-Transkriptes *EST AA496144* auf das endogene Zieltranskript *CD177* untersucht. Als Versuchszellen wurden *CD34*-positive hämatopoetische Stammzellen aus Nabelschnurblut ausgewählt. Die Zellen wurden für sechs Tage mit dem „*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*“ (*G-CSF*) behandelt, um sie zu neutrophilen Granulozyten zu differenzieren. Zu diesem Zeitpunkt hat sich bereits eine bimodale *mCD177*-Expression manifestiert. Somit können $mPR3^{\text{hoch}}/mCD177^{\text{positive}}$ und $mPR3^{\text{niedrig}}/mCD177^{\text{negative}}$ Populationen unterschieden, sortiert und untersucht werden. Aus diesen Gründen sollte zu diesem Zeitpunkt auch die Expression des Antisense-Transkriptes *EST AA496144* differenziell zwischen diesen beiden Populationen analysiert werden. Die Untersuchung erfolgte mittels quantitativer Real-Time-PCR (s. Abb. 38).

Zur Kontrolle der Funktionalität des eingesetzten Primerpaares für die Detektion des *EST AA496144* wurde die cDNA des *EST*-Klons (RZPD, Berlin) analog zum *CD177*-Gen in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA4 subkloniert und anschließend in humanen HEK293 Zellen cotransfiziert. Im Anschluss wurde die endogene Expression beider Plasmide (*CD177* und *EST AA496144*) erfolgreich mittels quantitativer Real-Time-PCR nachgewiesen (Daten nicht gezeigt) und so die Funktionalität der verwendeten Primerpaare bestätigt.

Die relative Genexpression von *CD177* und *EST AA496144* in den differenzierten Stammzellen wurde auf eins gesetzt, sofern die Proben die gleiche Expression wie die Kontrollprobe ohne DNA zeigten und keinerlei Genexpression von *CD177* oder von *EST AA496144* nachweisbar war. Es konnte sowohl in den $mPR3^{\text{hoch}}/mCD177^{\text{positiven}}$ als auch in den $mPR3^{\text{niedrig}}/mCD177^{\text{negativen}}$ Zellen keine *EST AA496144*-Genexpression detektiert werden. Somit konnte eine transkriptionshemmende Wirkung des Antisense-Transkripts *EST AA496144*, auf die *CD177*-mRNA ausgeschlossen werden.

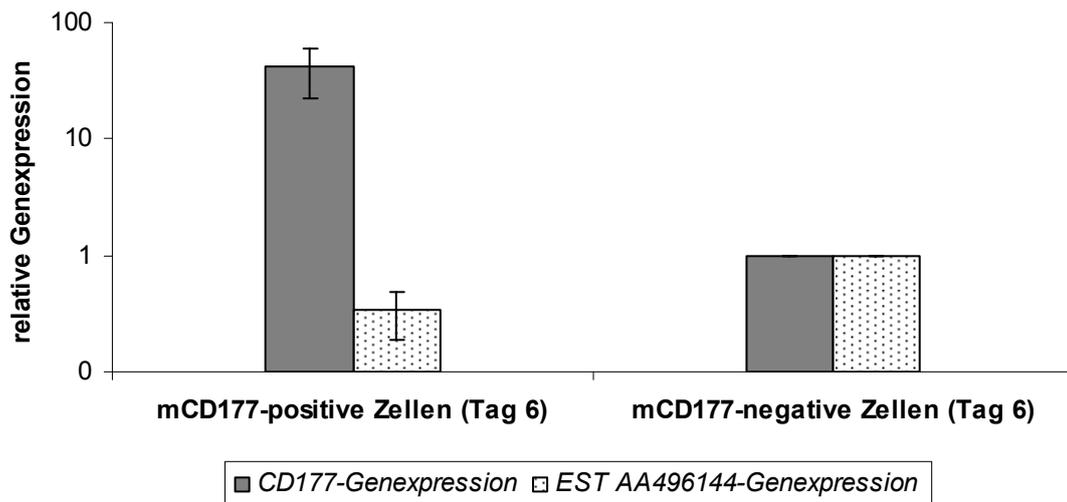


Abb. 38: Genexpressionsanalyse der *CD177*- und *EST AA496144*-mRNA mittels quantitativer Real-Time-PCR an sechs Tage differenzierten CD34-positive hämatopoetische Stammzellen. Die resultierenden neutrophilen Granulozyten wurden in $mCD177^{\text{positive}}$ - und $mCD177^{\text{negative}}$ Zellen aufgetrennt. Anhand der y-Achse wurde die relative Genexpression der betrachteten Gene angegeben. Als interner Standard wurde das Referenzgen *18S-rRNA* verwendet.

3.3.4. Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des *CD177*-Gens

Da im weiteren Verlauf der Arbeit Mutations- und Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP)-Analysen am *CD177*-Gen durchgeführt werden sollten, wurde zuerst der Transkriptionsstart des *CD177*-Gens bestimmt, um eine komplette Genstruktur zu erhalten.

Für die Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des *CD177*-Gens wurde das 5' *RACE* Kit der Firma Invitrogen verwendet (s. Abschnitt 2.2.2.10.). Das Kit garantiert ausschließlich die cDNA-Generierung von mRNAs mit intakter 5'-Cap-Struktur, um so ein vollständiges Transkript zwischen dem 5'-Cap und dem Translationsstart zu gewährleisten. Anschließend wurde an dieser cDNA von neutrophilen Granulozyten eine 5' *RACE*-PCR durchgeführt. Das Ergebnis wurde in der Abbildung 39 dargestellt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden aus dem Agarosegel isoliert, in einen pDrive-Vektor kloniert und anschließend sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung wurde in der Abbildung 40 abgebildet und der Transkriptionsstartpunkt markiert.

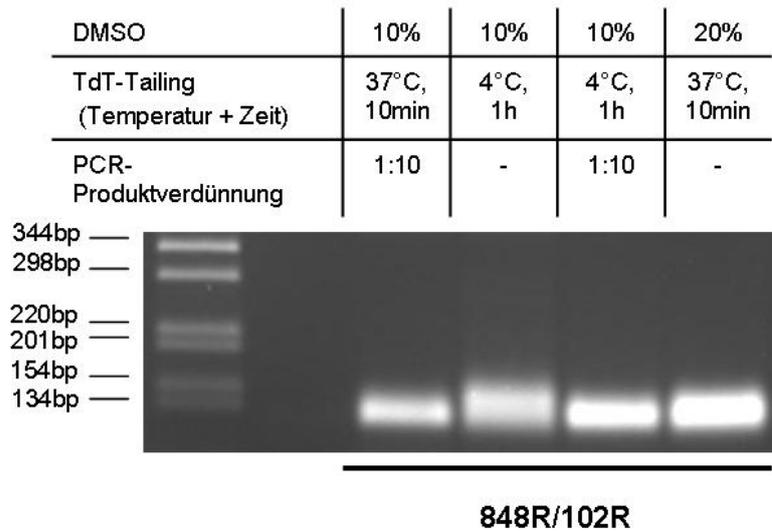
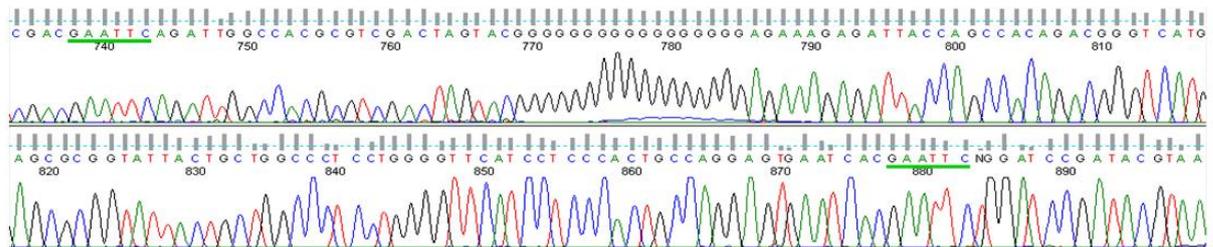


Abb. 39: Analyse der 5' RACE-PCR mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese. In der äußeren linken Spur ist der mitgeführte DNA-Marker abgebildet. Auf der rechten Seite des Agarosegels wurden die vier unterschiedlichen 5' RACE-PCR-Ansätze aufgetragen. Die verwendeten Bedingungen wurden oberhalb der Grafik aufgelistet und die verwendeten Rückwärtsprimer für die erste und zweite PCR wurden unterhalb der Grafik vermerkt.



... GAATT CAGATT GGCCACGCGT C GACTAGTACGGGGGGGGGGGGGGGGGGG GAAAGAGATTACCAGCCACAGACGGGTCATG
 NM_020406.2..... TGCTGAAAAGCAGAAAAGAGATTACCAGCCACAGACGGGTCATG

AGCGCGGTATTACTGCTGGCCCTCCTGGGGTTCATCCTCCCACTGCCAGGAGTGAAATCACGAATTC...
 AGCGCGGTATTACTGCTGGCCCTCCTGGGGTTCATCCTCCCACTGCCAGGAGTG...

EcoRI- Schnittstellen vom Klonierungsvektor pDrive und Vektorüberhänge

Abridged Universal Amplification Primer (AUAP)

Translationsstart

Transkriptionsstart

Genspezifischer Primer (CD177-102R)

Abb. 40: Sequenzierungsergebnis der 5' RACE-PCR-Produkte. Im oberen Teil der Abbildung wurde das Chromatogramm der Sequenzierung abgebildet. Unterhalb des Chromatogramms wurde die Sequenz nochmals wiedergegeben und die *EcoRI*-Schnittstellen des Klonierungsvektors (grün unterlegt), der verwendete Vorwärtsprimer (AUAP, unterstrichen) und der genspezifische Rückwärtsprimer (blau unterlegt) sowie der Translationsstart (gelb unterlegt) und der gesuchte Transkriptionsstart (rot unterlegt) eingezeichnet. Zum direkten Vergleich

wurde die Transkriptsequenz von *CD177* NM_020406.2 aus der NCBI-Datenbank darunter dargestellt.

Die Sequenzierungen der unterschiedlichen 5' RACE-PCR-Produkte ergab eine einheitliche Sequenz, welche in der Abbildung 40 dargestellt wurde. Es wurde neben dem Translationsstart (gelb unterlegt), der wichtig für die Proteinsynthese ist, der gesuchte Transkriptionsstart (rot unterlegt) für die mRNA-Transkription eingezeichnet. Des Weiteren wurde zur besseren Orientierung und Analyse des Sequenzierungsproduktes, die bei der zweiten PCR verwendeten PCR-Primer, eingezeichnet (Vorwärtsprimer wurde unterstrichen und der Rückwärtsprimer wurde blau unterlegt) sowie die *EcoRI*-Schnittstellen (grün unterlegt), die den Übergang in den Klonierungsvektor pDrive kennzeichneten, markiert. Bei der Auswertung der Sequenzierung zeigte sich, dass der Transkriptionsstart nicht weit vor dem Translationsstart lag. Als Transkriptionsstartpunkt wurde die Purinbase Adenin identifiziert, die 29 Basen vor dem Translationsstart befand.

Für den direkten Vergleich mit den bestehenden Datenbanksätzen wurde die Referenzsequenz der *CD177*-cDNA, wie sie bei NCBI (NM_020406.2) zu finden ist, unter unserer Sequenz dargestellt. Es zeigte sich, dass das Transkript der Datenbank den Transkriptionsstart 13 Basen vor unseren gefundenen Transkriptionsstart vorhersagte und der Transkriptionsstart dieser *CD177*-Sequenz (NM_020406.2) dadurch 42 Basen vor dem Translationsstart lag. Laut der Genome Browser-Datenbank beruhte die *CD177*-Sequenz NM_020406.2 auf einem EST-Klon (BX644504), wohingegen unser bestimmter Transkriptionsstartpunkt mit 131 ESTs der Datenbank übereinstimmte. Diese ESTs stammten aus verschiedensten Geweben, wie beispielsweise aus dem Dickdarm, der Prostata, dem Thymus, der Gebärmutter und dem Magen. Nach Datenbankaussage gibt es noch weitere ESTs mit anderen Transkriptionsstartpunkten, was möglicherweise für einen variablen Transkriptionsstart von *CD177* spricht.

Aus der Analyse wurden zwei wichtige Ergebnisse als Grundlage für weitere Versuche festgehalten. Zum einen liegt der Transkriptionsstart des *CD177*-Gens in neutrophilen Granulozyten des peripheren Blutes 29 Basen stromaufwärts des Translationsstarts und zum anderen konnte kein zusätzliches Exon vor dem eigentlichen Exon 1 detektiert werden. Beide Informationen wurden bei den folgenden Sequenzierungen berücksichtigt.

3.3.5. Untersuchung der genomischen DNA im Bereich des CD177-Gens in Bezug auf Mutationen und damit auf die Expression eines (funktionellen) CD177-Proteins

Die Hypothese dieser Untersuchungen war, dass somatische Mutationen, wie beispielsweise Basensubstitutionen, -insertionen und -deletionen, die während der Ausbildung der mCD177^{positiven} und mCD177^{negativen} Zellpopulationen entstehen, zu einem instabilen Transkript durch eine erhöhte RNA-Umsatzrate in den mCD177^{negativen} Zellen führen und somit die fehlende CD177-Proteinbildung erklärt werden könnte.

Es wurde der Teil der genomischen DNA sequenziert, welcher für die Kodierung der Exone des CD177-Proteins sowie die Übergänge zwischen den einzelnen Introns und Exons verantwortlich ist. Hierbei wurde ein Vergleich zwischen DNA-Sequenzierungen von mCD177^{positiven}- und mCD177^{negativen} neutrophilen Granulozyten von drei Probanden durchgeführt. Um eine möglichst hohe Ausbeute für die beiden Zellpopulationen bei der Zellsortierung zu erzielen, wurden Probanden mit einer etwa 50-prozentigen Verteilung ausgewählt.

Ein Problem während der Sequenzierung stellte dabei das bereits beschriebene Pseudogen vom *CD177*-Gen dar (Bettinotti u. a. 2002). Die hohe genomische Sequenzhomologie zwischen dem *CD177*-Gen und dem Pseudogen von Intron drei bis einschließlich der 3' untranslatierten Region (3'UTR) machte eine spezifische Amplifikation der Exone 4 bis 9 unmöglich. Aus diesem Grund wurde eine sogenannte „*long range*“ PCR unter Einsatz von spezifischen *CD177*-Genprimern eines kompletten 13kb-langen Fragmentes von Chromosom 19 (*CD177*-Exon 1-9) vorangeschaltet. Diese PCR wurde für alle zu sequenzierenden DNAs im Vorfeld durchgeführt und das Produkt für alle weiteren PCRs und Sequenzierungen aufgereinigt.

Aufgrund des Sequenzierungsergebnisses (Daten nicht abgebildet) konnten keine Unterschiede, wie Basensubstitutionen, -deletionen oder -insertionen in den proteinkodierenden Exonen bzw. in den Exon-Intron-Übergängen des *CD177*-Gens zwischen den mCD177^{positiven}- und mCD177^{negativen} neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die genomische DNA in den kodierenden Bereichen beider Zellpopulationen vollständig identisch ist.

3.3.6. Allel-abhängige Transkription führt zur differentiellen Expression von *CD177* in den neutrophilen Granulozyten

Nachdem sowohl chromosomale Rearrangements, intragenische kodierende Mutationen als auch die Interaktion von Antisense-Transkript als kausaler Mechanismus bei der Entstehung bimodaler Granulozytenpopulationen bezüglich mCD177 ausgeschlossen wurden, sollte der Fokus auf epigenetische Regulationsmechanismen gelegt werden. Es sollte die Hypothese geprüft werden, ob „*Imprinting*“ zu parental-abhängiger Expression von *CD177* in

Granulozyten führt. Der determinierte Mechanismus des „*Imprinting*“ würde ebenfalls die starke Korrelation zwischen mPR3-Expressionsverteilung der neutrophilen Granulozyten in monozygoten Zwillingen im Gegensatz zu dizygoten Zwillingen erklären. Unsere Differenzierungsdaten der CD34-positiven Stammzellen zu neutrophilen Granulozyten zeigten, dass undifferenzierte Stammzellen *CD177* nicht exprimieren, wohingegen in sechs Tage differenzierten Zellen eine bimodale Expressionverteilung detektiert wurde und in mCD177^{positiven} Zellen auch eine Genexpression nachgewiesen werden konnte. Epigenetische Prozesse als somatische Ereignisse könnten zur klonalen Aktivierung der *CD177*-Genexpression während der Differenzierung führen, wodurch eine bimodale Populationsverteilung bedingt werden würde.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde zunächst eine Haplotypenanalyse des *CD177*-Locus anhand von drei Trios (Eltern und ein Kind) mit dem Fokus auf kodierende SNPs im *CD177*-Gen auf genomischer DNA-Ebene durchgeführt. Dazu wurden alle heterozygoten SNPs jedes Kindes auf Transkriptebene genotypisiert, so dass das exprimierende Allel (maternal oder paternal) der Mutter oder dem Vater zugeordnet werden konnte. Analog dazu wurden alle Individuen bezüglich der *CD177*-Zellmembranexpression mittels durchflusszytometrischer Messung analysiert. Die Untersuchung wurde zu Beginn an drei Trios ausgetestet. Im Anschluss wurde die Anzahl der Familien auf 8 erweitert, wobei bei 4 Familien mehrere Kinder analysiert wurden. Wird jedes Kind und seine zugehörigen Eltern einzeln betrachtet (Trio), wurde das Ergebnis an insgesamt 13 Trios verifiziert (Abbildungen 41 bis 47). Alle analysierten SNPs wurden im Anhang 7.3. (Tabelle 24) mit ihren genomischen Positionen und den entsprechenden Exonlokalisationen im *CD177*-Gen zusammengefasst.

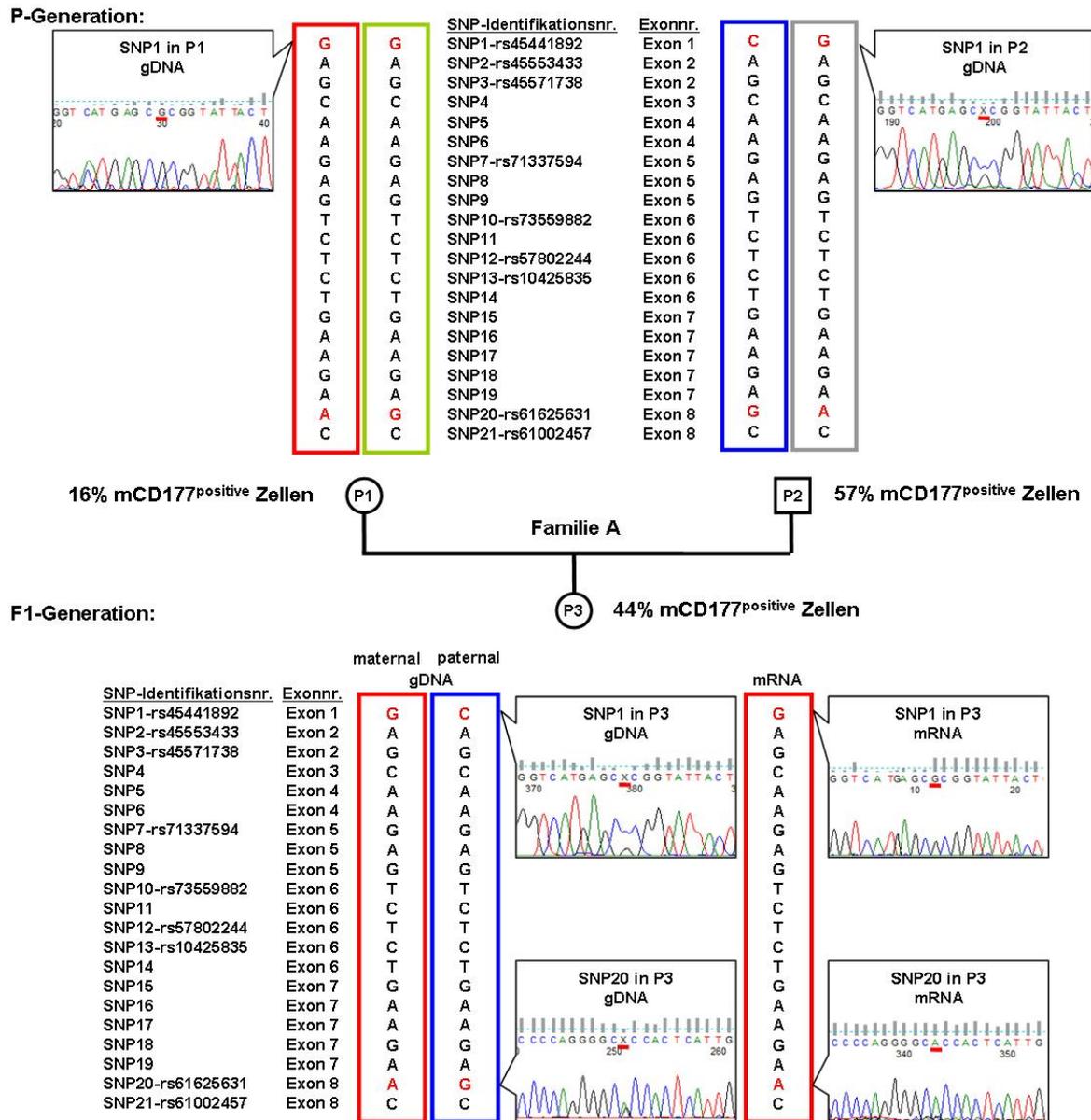


Abb. 41: Haplotypenanalyse am *CD177*-Locus im Trio (Eltern und ein Kind) der Familie A. Bei den Eltern wurde die Untersuchung auf die genomische Ebene beschränkt, wohingegen bei dem Kind die genomische - und die Transkript-Ebene analysiert wurde. In der Darstellung wurden alle genotypisierten Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP, engl. *Single Nucleotide Polymorphism*) mit dem entsprechenden Exon aufgelistet, welche sich ausschließlich in der proteinkodierenden *CD177*-Genregion befinden. Sofern die untersuchten SNPs in der NCBI-Datenbank eingetragen waren, wurde die Identifikationsnummer neben dem SNP vermerkt. Die Allele wurden in unterschiedlichen Farben dargestellt, um eine Zuordnung zum maternalen und paternalen Allel zu vereinfachen. Beim Kind wurde neben den genomischen Allelen das endgültig exprimierte Allel (mRNA) in rot dargestellt. Sofern die Basen von heterozygoten SNPs nicht eindeutig den beiden genomischen Allelen zugeordnet werden konnten, wurden sie durch einen Schrägstrich getrennt nebeneinander aufgeführt. Die interessanten heterozygoten SNPs wurden farblich rot hervorgehoben und die dazugehörigen Chromatogramme (zu betrachtende Base wurde rot unterstrichen) wurden daneben abgebildet. P1, P2, und P3

bezeichnen die verschlüsselten Probennummern und die daneben stehenden Prozentzahlen geben den Anteil an mCD177^{positiven} Zellen im Spender wieder, der mittels Durchflusszytometrie mit einem monoklonalen Antikörper für CD177 gemessen wurde. Das Gen *CD177* wird im Spender P3 vom maternalen Allel exprimiert.

Am Beispiel des Trios der Familie A (s. Abb. 41) konnte eine monoallelische Expression des *CD177*-Gens nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass entweder nur das maternale oder das paternale Allel im Bereich des *CD177*-Gens als mRNA exprimiert wird und nicht wie bei dem Großteil aller Gene bei denen beide Allele exprimiert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass im Falle des heterozygoten Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*; SNP) Nummer 20 (NCBI-Datenbank: rs61625631) im weiblichen Kind (P3) die Basen Adenin und Guanin für beide Allele auf genomischer DNA-Ebene detektiert wurden. Jedoch auf der Transkriptebene konnte nur die Base Adenin nachgewiesen werden. Bei der Translation des Basentriplets mit einem Adenin an dieser Stelle würde die essentielle Aminosäure Threonin (**A**CC) entstehen, wohingegen ein Guanin für die nicht-essentielle Aminosäure Alanin (**G**CC) kodieren würde.

Für den SNP1 (NCBI-Datenbank: rs45441892) konnte bei dem Kind (P3) auf genomischer DNA-Ebene ein Cytosin und Guanin nachgewiesen werden. Auf Transkriptebene hingegen wurde wiederum nur eine der beiden Basen detektiert und zwar das Guanin. An diesem Beispiel konnte nicht nur das Vorliegen einer monoallelischen Expression detektiert, sondern es konnten auch gezeigt werden, dass ausschließlich das maternale Allel transkribiert wurde. Diese Schlussfolgerung konnte gezogen werden, weil die Mutter (P1) vom Kind P3 an der Stelle des SNP1 homozygot für Guanin und der Vater (P2) heterozygot (Cytosin und Guanin) war. Nach dem Ausschlussprinzip konnte der heterozygote SNP1 im Kind P3 nur so erklärt werden, dass das maternale Allel für das Guanin und das paternale Allel für das Cytosin kodiert. Im Transkript wurde somit das Guanin vom maternalen Allel nachgewiesen. Die Base Guanin kodiert an dieser Stelle für die nicht-essentielle Aminosäure Alanin (**G**CG). Im Gegensatz dazu würde das Cytosin zur Kodierung der ebenfalls nicht-essentiellen Aminosäure Prolin (**C**CC) führen.

Um diese monoallelische Expression weiter zu verifizieren und um zu untersuchen, ob immer nur das maternale Allel exprimiert wird, wurden weitere Trios untersucht.

Am Beispiel-Trio der Familie B (s. Abb. 42) konnte ebenfalls eine monoallelische Expression des maternalen Allels des *CD177*-Gens verifiziert werden. Der heterozygote SNP1 (NCBI-Datenbank: rs45441892) im weiblichen Kind (P6) wies die Basen Cytosin und Guanin für beide Allele auf genomischer Ebene auf. Bei Betrachtung der Transkriptebene konnte nur die Base Guanin detektiert werden. Bei der Translation des Basentriplets mit Guanin an dieser Stelle würde die nicht-essentielle Aminosäure Alanin (**G**CG) gebildet werden, wohingegen

bei der Translation des Basentriplets mit Cytosin an dieser Stelle die nicht-essentielle Aminosäure Prolin (CCG) entstehen würde. Da die Mutter (P4) vom Kind P6 an der Stelle des SNP1 heterozygot für Cytosin und Guanin und der Vater (P5) homozygot für Cytosin war, konnte wiederum ein allelspezifischer Rückschluss auf das exprimierende Allele gemacht werden. Der heterozygote SNP1 im Kind P6 setzte sich damit aus dem Guanin des maternalen Allels und dem Cytosin des paternale Allels zusammen, wobei nur das maternale Allel als mRNA transkribiert wurde.

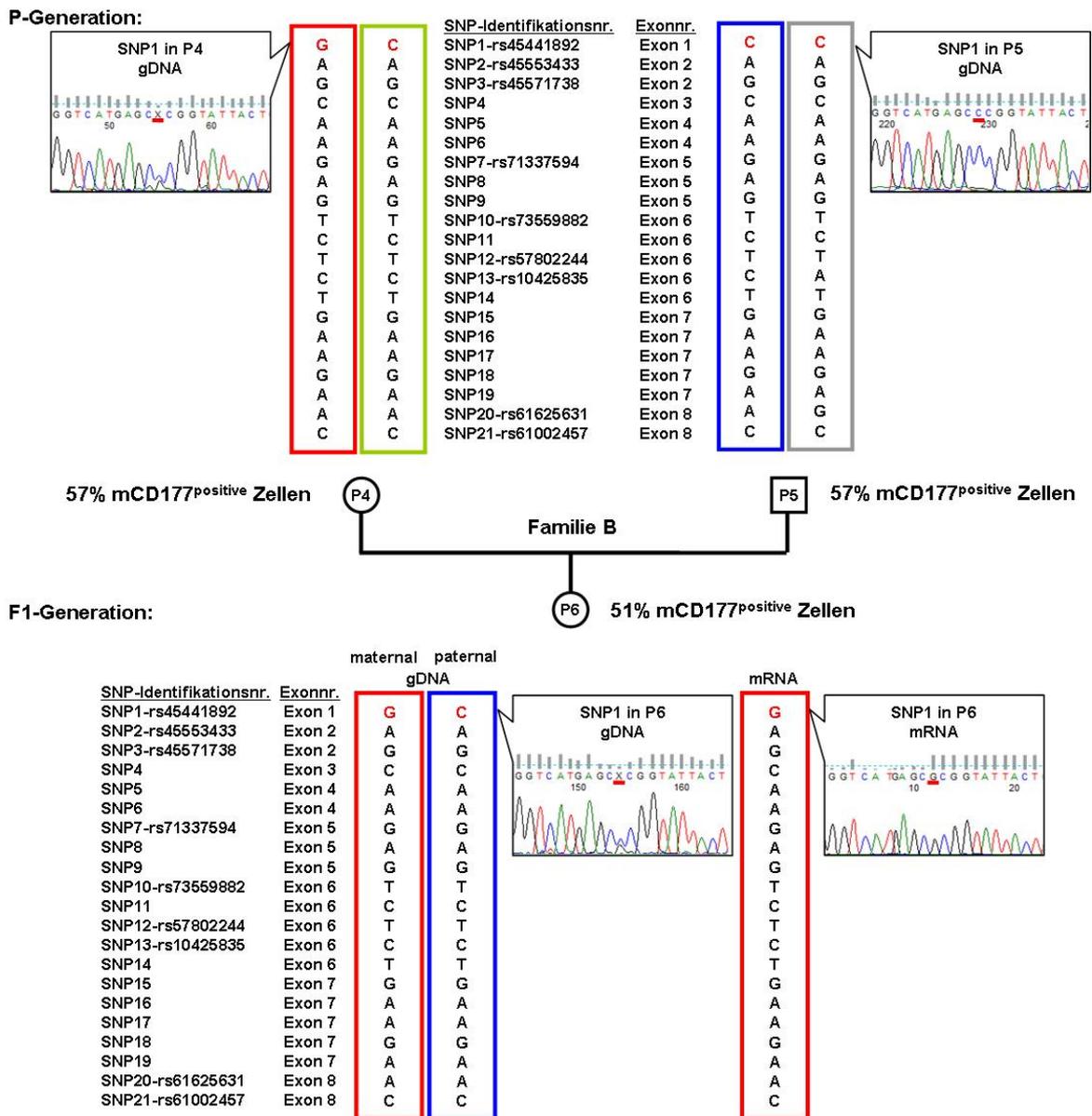


Abb. 42: Haplotypenanalyse am *CD177-Locus* im Trio (Eltern und ein Kind) der Familie B. Der Aufbau der Grafik wurde wie in der vorhergehenden Abbildung Nummer 41 übernommen. P4, P5, und P6 bezeichnen die verschlüsselten Probennummern und die daneben stehenden Prozentzahlen geben den Anteil an mCD177^{positiven} Zellen im Spender wieder, der mittels Durchflusszytometrie mit einem monoklonalem Antikörper für CD177 gemessen wurde. Das Gen *CD177* wird im Spender P6 vom maternalen Allel exprimiert.

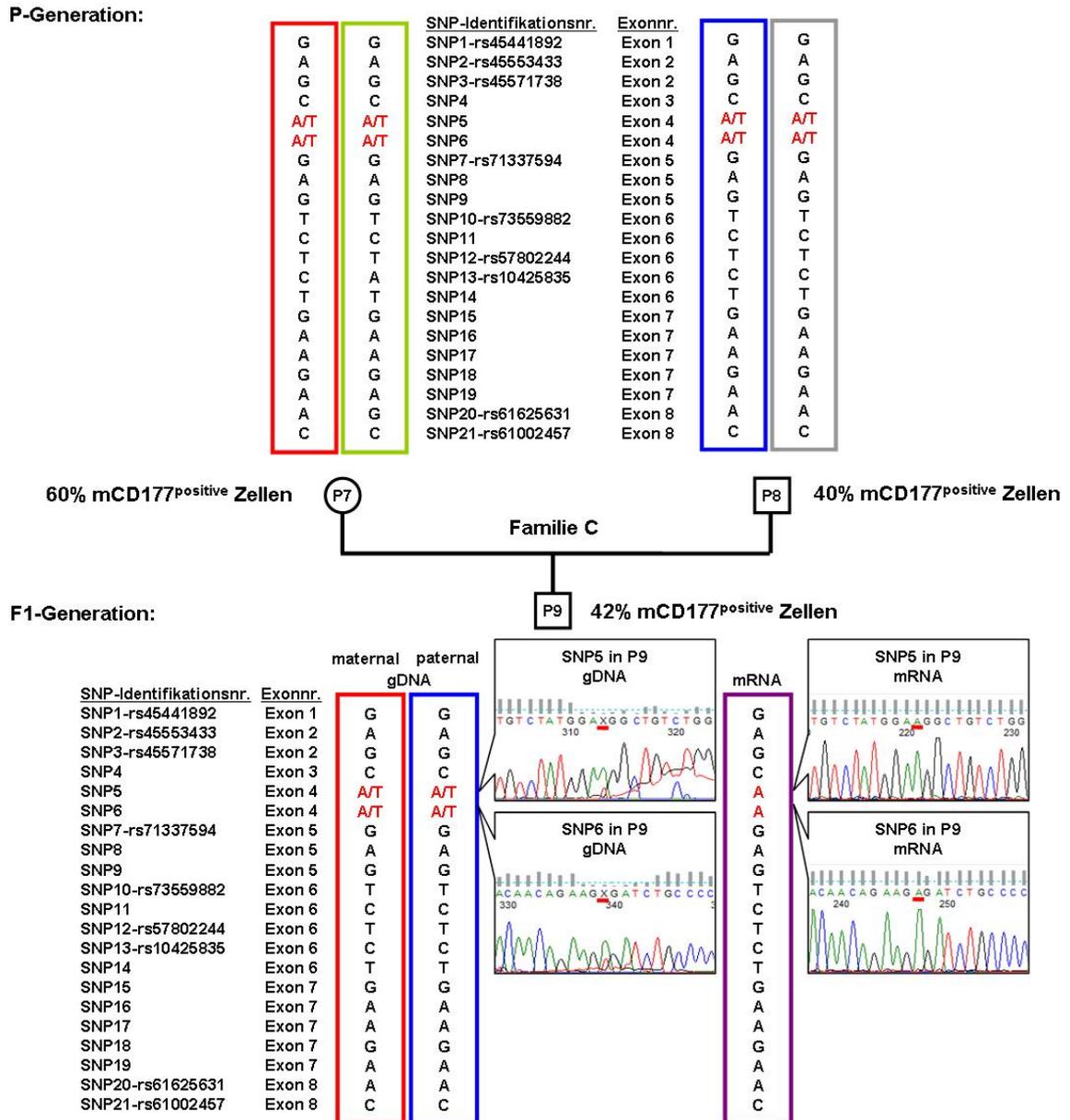


Abb. 43: Haplotypenanalyse am *CD177*-Locus im Trio (Eltern und ein Kind) der Familie C. Der Aufbau der Grafik wurde wie in der Abbildung Nummer 41 übernommen. P7, P8, und P9 bezeichnen die verschlüsselten Probennummern und die daneben stehenden Prozentzahlen geben den Anteil an mCD177^{positiven} Zellen im Spender wieder, der mittels Durchflusszytometrie mit einem monoklonalem Antikörper für CD177 gemessen wurde. Die Expression von *CD177* ist monoallelisch, jedoch konnte das parentale Allel nicht näher definiert werden.

Im Trio der Familie C (s. Abb. 43) konnte eine monoallelische Expression an den heterozygoten SNP5 und SNP6 im Exon 4 des *CD177*-Gens nachgewiesen werden. Der heterozygote SNP5 zeigte in der Sequenzierung vom männlichen Kind (P9) ein Adenin und ein Thymin. Jedoch auf Transkriptebeve konnte nur das Adenin nachgewiesen werden. Adenin kodiert an dieser Stelle im Basentriplett für die nicht-essentielle Aminosäure Glutaminsäure (GAA) und Thymin für die nicht-essentielle Aminosäure Asparaginsäure

(GAT). Der heterozygote SNP6 des Kindes P9 wies ebenfalls ein Adenin und ein Thymin auf und im Transkript wurde wiederum nur ein Adenin detektiert. An dieser Stelle im Basentriplett kodierte Adenin bei der Translation ebenfalls für die nicht-essentielle Aminosäure Glutaminsäure (GAG) und das Thymin für die essentielle Aminosäure Valin (GTG). Bei beiden SNPs konnte zwar die monoallelische Expression des *CD177*-Gens verifiziert werden, jedoch konnten keine Rückschlüsse auf die Herkunft des exprimierten Allels gezogen werden. Beide SNPs waren sowohl in der Mutter (P7) als auch im Vater (P8) heterozygot.

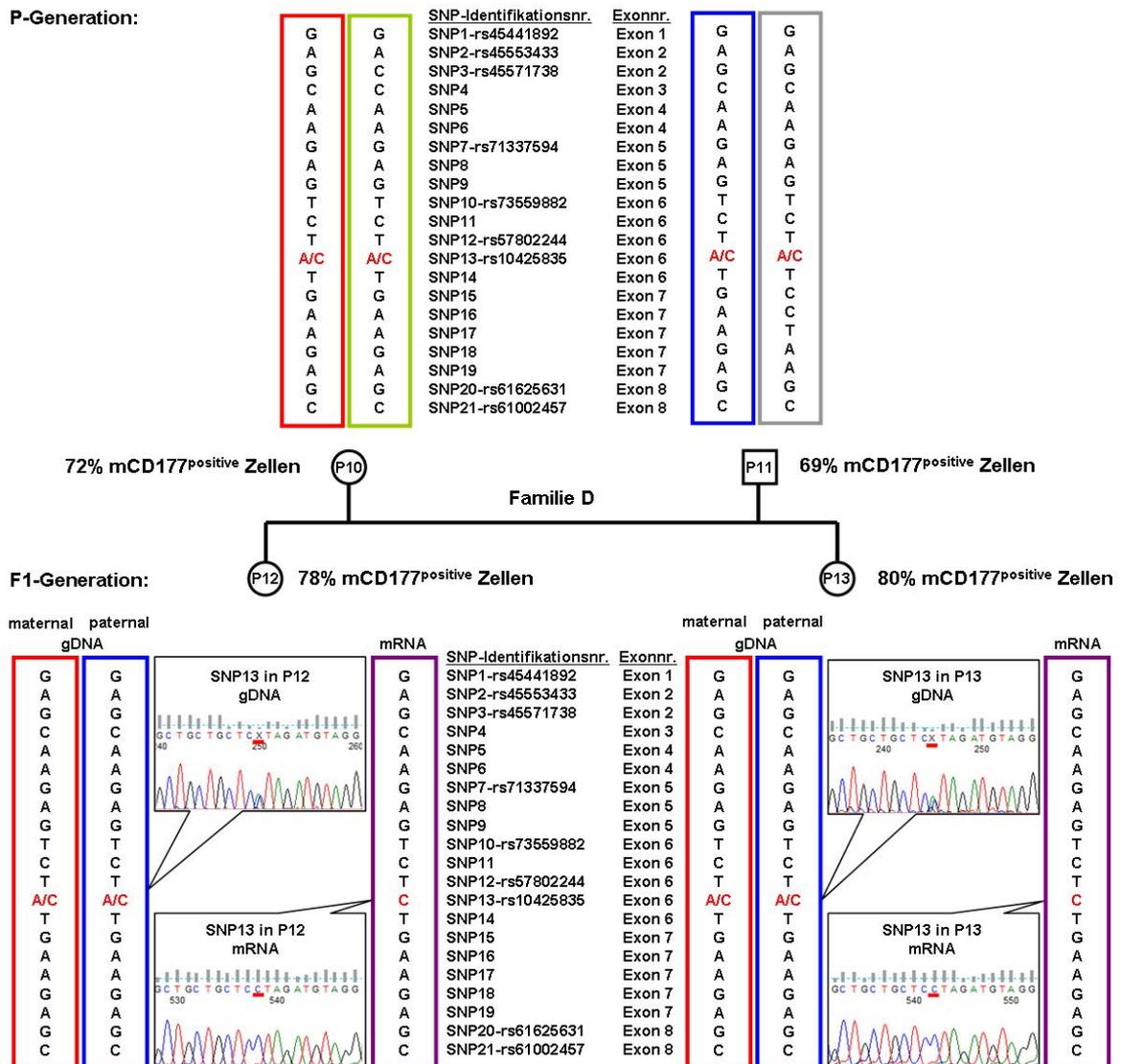


Abb. 44: Haplotypenanalyse am *CD177*-Locus der Familie D (Eltern und zwei Kinder). Der Aufbau der Grafik wurde wie in der Abbildung Nummer 41 übernommen. P10, P11, P12 und P13 bezeichnen die verschlüsselten Probennummern und die daneben stehenden Prozentzahlen geben den Anteil an mCD177^{positiven} Zellen im Spender wieder, der mittels Durchflusszytometrie mit einem monoklonalem Antikörper für CD177 gemessen wurde. Das Gen *CD177* wird in den Spendern P12 und P13 monoallelisch exprimiert, jedoch konnte der parentale Ursprung nicht definiert werden.

Anhand der Familie D und der Analyse des heterozygoten SNP13 (NCBI-Datenbank: rs10425835; s. Abb. 44) im Exon 6 des *CD177*-Gens konnte die Hypothese einer monoallelischen Expression weiter gefestigt werden. Der heterozygote SNP13 zeigte sowohl in der Sequenzierung vom Kind P12 als auch vom Kind P13 ein Adenin und ein Cytosin und auf der Transkriptebene jeweils nur das Cytosin. Die Base Cytosin kodiert an dieser Stelle für die essentielle Aminosäure Leucin (CTA), wohingegen Adenin für die essentielle Aminosäure Isoleucin (ATA) kodieren würde. Des Weiteren konnte bei diesem SNP weder im Kind P12 noch im Kind P13 ermittelt werden, ob das Allel mit der Base Cytosin an der Stelle des SNP13 maternalen oder paternalen Ursprungs war, da der SNP13 sowohl in der Mutter (P10) als auch im Vater (P11) heterozygot vorlag.

Die Haplotypenanalyse der Familie F (s. Abb. 45) ergab, dass das weibliche Kind (P19) keinen heterozygoten und damit auswertbaren SNPs innerhalb der proteinkodierenden Region des *CD177*-Gens enthielt. Dafür konnte jedoch im männlichen Kind (P20) anhand der Analyse des heterozygoten SNP20 (NCBI-Datenbank: rs61625631) im Exon 8 des *CD177*-Gens eine monoallelischen Expression bestätigt werden. Der heterozygote SNP20 zeigte in der Sequenzierung des männlichen Kindes P20 ein Adenin und ein Guanin. Auf der Transkriptebene wurde sequenziell ein Guanin festgestellt. Bei der Translation des Basentriplets mit einem Guanin an dieser Stelle würde die nicht-essentielle Aminosäure Alanin (GCC) gebildet werden, wohingegen ein Adenin für die essentielle Aminosäure Threonin (ACC) kodieren würde. Aufgrund der Sequenzierung dieser genomischen Region in der Mutter (P17) und im Vater (P18) der Familie F konnte ein unterschiedlicher genetischer Hintergrund nachgewiesen werden. Die Mutter (P17) war an der Stelle des SNP20 homozygot für Guanin und der Vater (P18) war an dieser Stelle heterozygot (Adenin und Guanin). Somit wurde das als Transkript exprimierte Allel mit Guanin an der Stelle des SNP20 von der Mutter vererbt. Das zweite Allel mit Adenin an dieser Stelle stammte demnach vom Vater und wurde in den Zellen nicht exprimiert.

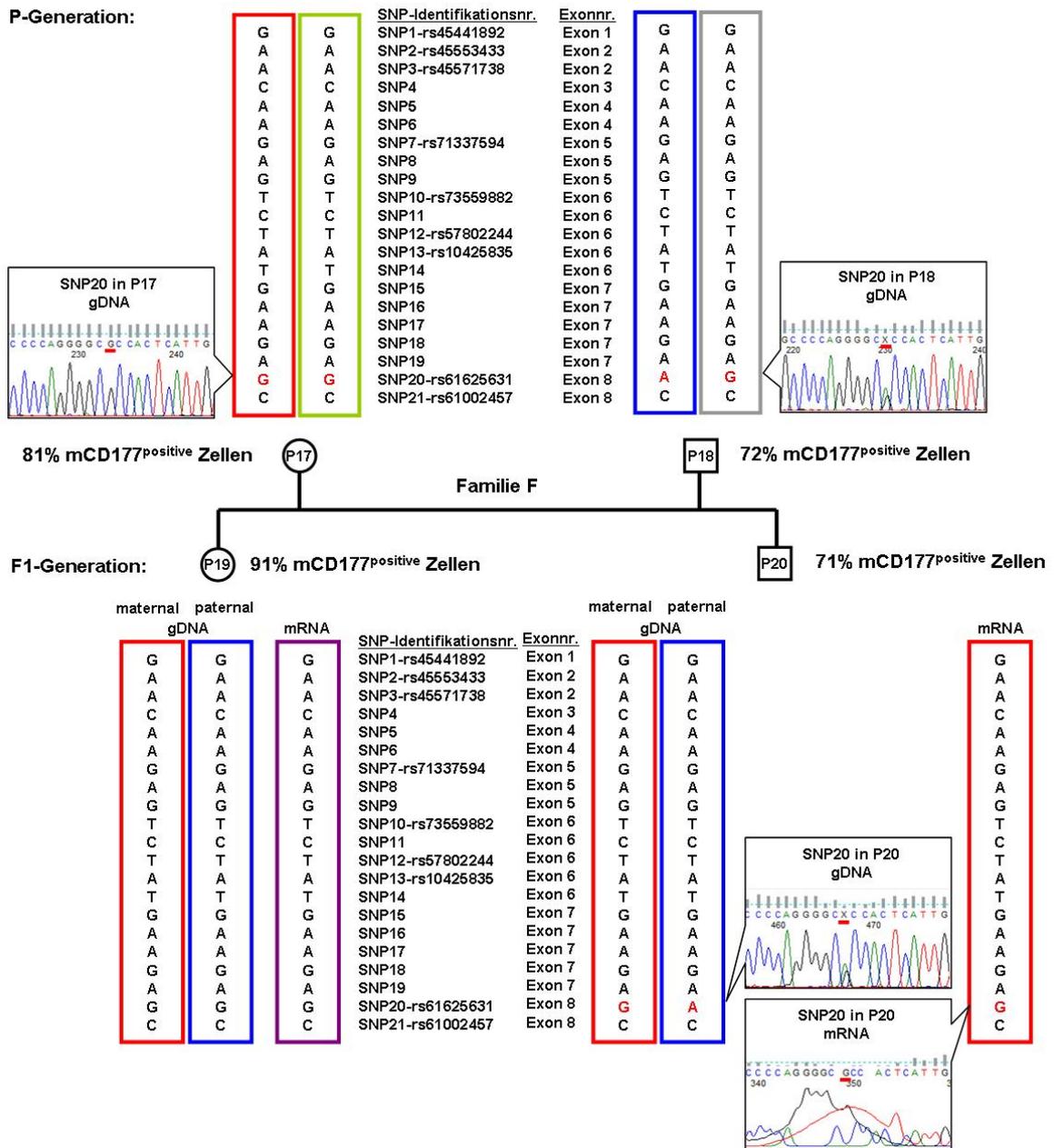


Abb. 45: Haplotypenanalyse am *CD177*-Locus der Familie F (Eltern und zwei Kinder). Der Aufbau der Grafik wurde wie in der Abbildung Nummer 41 übernommen. P17, P18, P19 und P20 bezeichnen die verschlüsselten Probennummern und die daneben stehenden Prozentzahlen geben den Anteil an mCD177^{positiven} Zellen im Spender wieder, der mittels Durchflusszytometrie mit einem monoklonalem Antikörper für CD177 gemessen wurde. Im Spender P19 konnte kein informativer SNP für eine Auswertung detektiert werden. Im Spender P20 hingegen wurde das *CD177*-Gen vom maternalen Allel exprimiert.

Die Haplotypenanalyse der Familie G mit Eltern und zwei Kindern (Abb. 46) wurde aufgrund der Abbildungsgröße dem Anhang 7.4. beigefügt.

Bei beiden Kindern der Familie G konnte eine monoallelische Expression des *CD177*-Gens nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde im Falle des Kindes P23 eine maternale und im Falle des Kindes P24 eine paternale Expression detektiert.

Die Haplotypenanalyse des Trios der Familie H (Eltern und Kind) hingegen ergab keine heterozygoten und damit auswertbaren SNP innerhalb der proteinkodierenden Region des *CD177*-Gens (s. Abb. 47).

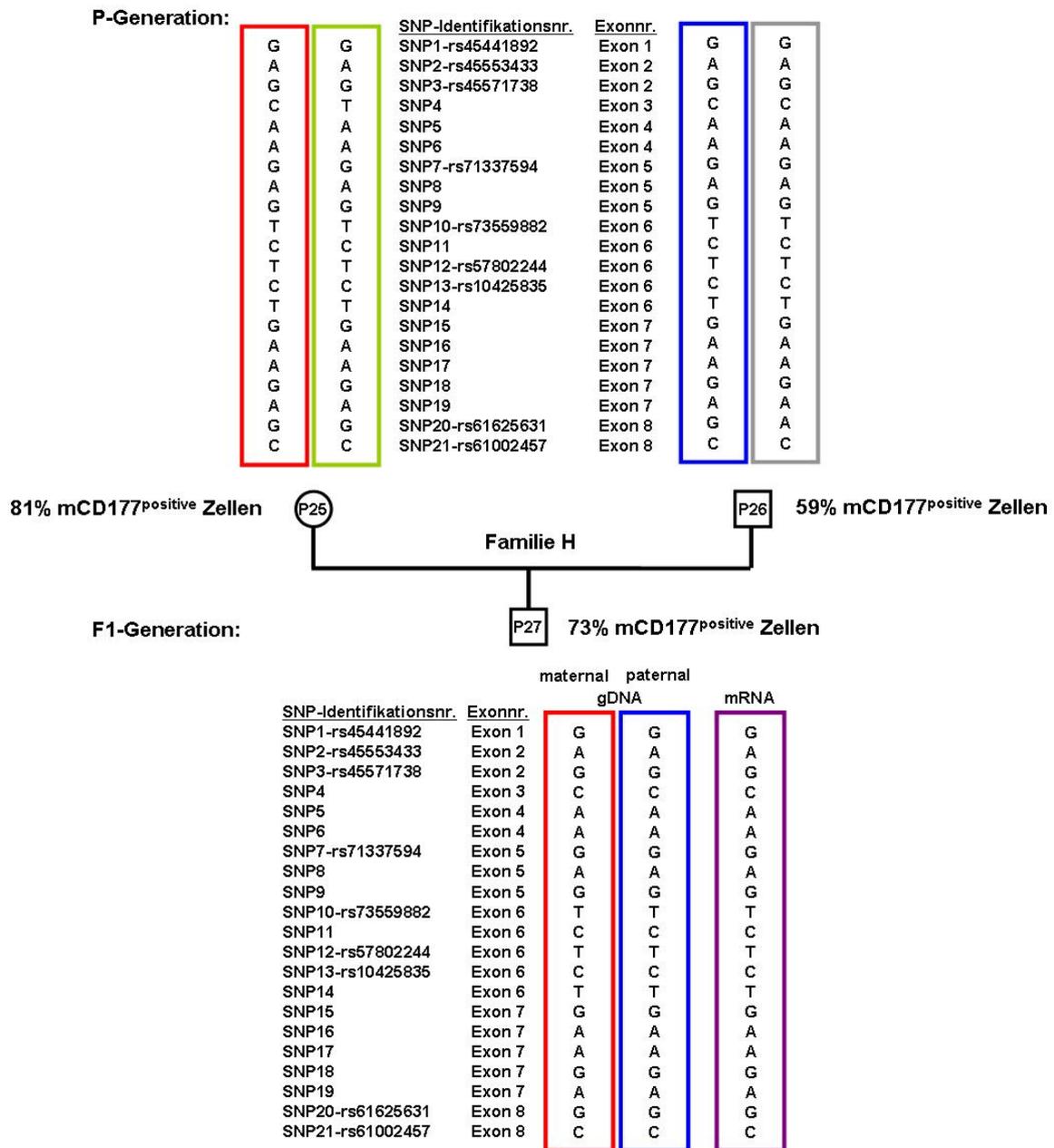


Abb. 47: Haplotypenanalyse am *CD177*-Locus im Trio (Eltern und ein Kind) der Familie H. Der Aufbau der Grafik wurde wie in der Abbildung Nummer 41 übernommen. Es wurden in diesem Trio auf genomischer Ebene keine aussagekräftigen heterozygoten SNPs zur weiteren Analyse gefunden. P25, P26, und P27 bezeichnen die verschlüsselten Probennummern. Es konnte nicht bestimmt werden, ob eine monoallelische Expression des *CD177*-Gens vorliegt, da kein heterozygoter SNP in der proteinkodierenden Region detektiert werden konnte.

heterozygoten SNP2 und 3 im Kind P32 (s. Abb. 48) verifiziert werden. Beim heterozygoten SNP3 wurde in allen drei Kindern in der Sequenzierung ein Allel mit Adenin und ein Allel mit Guanin detektiert. Auf Transkriptebene gab es jedoch Unterschiede. Bei den Kindern P30 und P31 wurde an dieser Stelle das maternal vererbte Guanin und beim Kind P32 das paternal vererbte Adenin detektiert. Hierbei kodiert sowohl das Guanin (CTG) als auch das Adenin (CTA) im Basentriplett für die essentielle Aminosäure Leucin. Es erfolgte aufgrund des SNPs also kein Aminosäureaustausch im CD177-Protein. Im Falle des heterozygoten SNP2 wurden im weiblichen Kind (P32) auf genomischer Ebene die Basen Thyminid und Adenin ermittelt. Auf Transkriptebene jedoch wurde nur das paternale Allel mit der Base Thyminid exprimiert. Dieses Ergebnis bestätigte die monoallelisch paternale *CD177*-Genexpression im Kind P32, wie es bereits für SNP3 festgestellt wurde. Die Base Thyminid kodierte an der Stelle des SNP2 für die essentielle Aminosäure Leucin (CTT). Im Falle von Adenin an dieser Stelle im Basentriplett wäre die Aminosäure Histidin (CAT) im *CD177*-Protein translatiert worden.

In den folgenden Tabellen 25, 26 und 27 sind alle heterozygoten SNPs (rot) auf mRNA-Ebene tabellarisch zur besseren Übersichtlichkeit zusammengefasst. Des Weiteren wurde in den Tabellen die kodierten Aminosäuren (AS) der untersuchten SNPs mit ihren dazugehörigen Basentriplets (Basen des SNPs wurden fett geschrieben und unterstrichen) im richtigen Leserahmen festgehalten.

maternale Expression								
SNP-Nr.:	Kind P3 mRNA:	Kind P6 mRNA:	Kind P20 mRNA:	Kind P24 mRNA:	Kind P30 mRNA:	Kind P31 mRNA:	AS:	alternative AS:
SNP1	G	G	G	G	G	G	Alanin (<u>GCG</u>)	Prolin (<u>CCG</u>)
SNP2	A	A	A	A	A	A	Histidin (<u>CAT</u>)	Leucin (<u>CTT</u>)
SNP3	G	G	A	A	G	G	Leucin (<u>CTG</u>)	Leucin (<u>CTA</u>)
SNP4	C	C	C	C	C	C	Asparagin (<u>AAC</u>)	Asparagin (<u>AAT</u>)
SNP5	A	A	A	A	A	A	Glutaminsäure (<u>GAA</u>)	Asparaginsäure (<u>GAT</u>)
SNP6	A	A	A	A	A	A	Glutaminsäure (<u>GAG</u>)	Valin (<u>GIG</u>)
SNP7	G	G	G	G	G	G	Glycin (<u>GGT</u>)	Valin (<u>GIT</u>)
SNP8	A	A	A	A	A	A	Asparaginsäure (<u>GAT</u>)	Asparagin (<u>AAT</u>)
SNP9	G	G	G	G	G	G	Phenylalanin (<u>ATG</u>)	Arginin (<u>AGG</u>)
SNP10	T	T	T	T	T	T	Phenylalanin (<u>ITT</u>)	Valin (<u>GTT</u>)
SNP11	C	C	C	C	C	C	Leucin (<u>CTG</u>)	Leucin (<u>ITG</u>)

SNP12	T	T	T	T	T	T	Methionin (<u>ATG</u>)	Threonin (<u>ACG</u>)
SNP13	C	C	A	A	A	A	Isoleucin (<u>ATA</u>)	Leucin (<u>CTA</u>)
SNP14	T	T	T	T	T	T	Asparagin- säure (<u>GAT</u>)	Asparagin- säure (<u>GAC</u>)
SNP15	G	G	G	G	G	G	Glycin (<u>GGG</u>)	Alanin (<u>GCG</u>)
SNP16	A	A	A	A	A	A	Threonin (<u>ACA</u>)	Threonin (<u>ACC</u>)
SNP17	A	A	A	A	A	A	Lysin (<u>AAA</u>)	Stopp-Codon (<u>TAA</u>)
SNP18	G	G	G	G	G	G	Glycin (<u>GGC</u>)	Serin (<u>AGC</u>)
SNP19	A	A	A	A	A	A	Threonin (<u>ACT</u>)	Alanin (<u>GCT</u>)
SNP20	A	A	G	G	G	G	Threonin (<u>ACC</u>)	Alanin (<u>GCC</u>)
SNP21	C	C	C	C	C	C	Leucin (<u>CTC</u>)	Phenylalanin (<u>TTC</u>)

Tabelle 25: Übersicht über alle betrachteten SNPs der maternal exprimierten *CD177*-Allele sowie der möglichen Aminosäuren (AS). Die kodierten Aminosäuren der untersuchten SNPs wurden mit ihren dazugehörigen Basentriplets aufgeführt. Die betreffenden Basen der SNPs wurden fett geschrieben und unterstrichen. Die heterozygoten SNPs, die für die Aussage einer monoallelischen Expression wichtig waren, wurden in rot markiert.

paternale Expression				
SNP-Nr.:	Kind P23 mRNA:	Kind P32 mRNA:	AS:	alternative AS:
SNP1	G	G	Alanin (<u>GCG</u>)	Prolin (<u>CCG</u>)
SNP2	T	T	Leucin (<u>CIT</u>)	Histidin (<u>CAT</u>)
SNP3	A	A	Leucin (<u>CTA</u>)	Leucin (<u>CTG</u>)
SNP4	C	C	Asparagin (<u>AAC</u>)	Asparagin (<u>AAT</u>)
SNP5	A	A	Glutaminsäure (<u>GAA</u>)	Asparaginsäure (<u>GAT</u>)
SNP6	A	A	Glutaminsäure (<u>GAG</u>)	Valin (<u>GIG</u>)
SNP7	G	G	Glycin (<u>GGT</u>)	Valin (<u>GIT</u>)
SNP8	A	A	Asparagin (<u>AAT</u>)	Asparaginsäure (<u>GAT</u>)
SNP9	G	G	Arginin (<u>AGG</u>)	Phenylalanin (<u>ATG</u>)
SNP10	T	T	Phenylalanin (<u>ITT</u>)	Valin (<u>GTT</u>)
SNP11	C	C	Leucin (<u>CTG</u>)	Leucin (<u>ITG</u>)
SNP12	T	T	Methionin (<u>ATG</u>)	Threonin (<u>ACG</u>)
SNP13	C	A	Isoleucin (<u>ATA</u>)	Leucin (<u>CTA</u>)
SNP14	T	T	Asparaginsäure (<u>GAT</u>)	Asparaginsäure (<u>GAC</u>)

SNP15	G	G	Glycin (<u>G</u>G)	Alanin (<u>G</u>CG)
SNP16	A	A	Threonin (<u>A</u>CA)	Threonin (<u>A</u>CC)
SNP17	A	A	Lysin (<u>A</u>AA)	Stopp-Codon (<u>T</u>AA)
SNP18	G	G	Glycin (<u>G</u>GC)	Serin (<u>A</u>GC)
SNP19	A	A	Threonin (<u>A</u>CT)	Alanin (<u>G</u>CT)
SNP20	A	G	Threonin (<u>A</u>CC)	Alanin (<u>G</u>CC)
SNP21	C	C	Leucin (<u>C</u>TC)	Phenylalanin (<u>T</u>TC)

Tabelle 26: Übersicht über alle betrachteten SNPs der paternal exprimierten *CD177*-Allele sowie der möglichen Aminosäuren (AS). Die kodierten Aminosäuren der untersuchten SNPs wurden mit ihren dazugehörigen Basentriplets sind aufgeführt. Die betreffenden Basen der SNPs wurden fett geschrieben und unterstrichen. Die heterozygoten SNPs, die für die Aussage einer monoallelischen Expression wichtig waren, wurden in rot markiert.

parental unbekannte Expression							
SNP-Nr.:	Kind P9 mRNA:	Kind P12 mRNA:	Kind P13 mRNA:	Kind P19 mRNA:	Kind P27 mRNA:	AS:	alternative AS:
SNP1	G	G	G	G	G	Alanin (<u>G</u>CG)	Prolin (<u>C</u>CG)
SNP2	A	A	A	A	A	Histidin (<u>C</u>AT)	Leucin (<u>C</u>IT)
SNP3	G	G	G	A	G	Leucin (<u>C</u>TG)	Leucin (<u>C</u>TA)
SNP4	C	C	C	C	C	Asparagin (<u>A</u>AC)	Asparagin (<u>A</u>AT)
SNP5	A	A	A	A	A	Glutaminsäure (<u>G</u>AA)	Asparaginsäure (<u>G</u>AT)
SNP6	A	A	A	A	A	Glutaminsäure (<u>G</u>AG)	Valin (<u>G</u>TG)
SNP7	G	G	G	G	G	Glycin (<u>G</u>GT)	Valin (<u>G</u>IT)
SNP8	A	A	A	A	A	Asparaginsäure (<u>G</u>AT)	Asparagin (<u>A</u>AT)
SNP9	G	G	G	G	G	Phenylalanin (<u>A</u>TG)	Arginin (<u>A</u>GG)
SNP10	T	T	T	T	T	Phenylalanin (<u>T</u>TT)	Valin (<u>G</u>TT)
SNP11	C	C	C	C	C	Leucin (<u>C</u>TG)	Leucin (<u>T</u>TG)
SNP12	T	T	T	T	T	Methionin (<u>A</u>TG)	Threonin (<u>A</u>CG)
SNP13	C	C	C	A	C	Isoleucin (<u>A</u>TA)	Leucin (<u>C</u>TA)
SNP14	T	T	T	T	T	Asparaginsäure (<u>G</u>AT)	Asparaginsäure (<u>G</u>AC)
SNP15	G	G	G	G	G	Glycin (<u>G</u>GG)	Alanin (<u>G</u>CG)
SNP16	A	A	A	A	A	Threonin (<u>A</u>CA)	Threonin (<u>A</u>CC)

SNP17	A	A	A	A	A	Lysin (<u>A</u> AA)	Stopp-Codon (<u>T</u> AA)
SNP18	G	G	G	G	G	Glycin (<u>G</u> GC)	Serin (<u>A</u> GC)
SNP19	A	A	A	A	A	Threonin (<u>A</u> CT)	Alanin (<u>G</u> CT)
SNP20	A	G	G	G	G	Threonin (<u>A</u> CC)	Alanin (<u>G</u> CC)
SNP21	C	C	C	C	C	Leucin (<u>C</u> TC)	Phenylalanin (<u>T</u> TC)

Tabelle 27: Übersicht über alle betrachteten SNPs der parental unbekanntem exprimierten *CD177*-Allele sowie der möglichen Aminosäuren (AS). Die kodierten Aminosäuren der untersuchten SNPs wurden mit ihren dazugehörigen Basentriplets sind aufgeführt. Die betreffenden Basen der SNPs wurden fett geschrieben und unterstrichen. Die heterozygoten SNPs, die für die Aussage einer monoallelischen Expression wichtig, waren wurden in rot markiert.

Bei genauerer Betrachtung der Aminosäuren, die durch die Selektion eines der beiden parental Allele, entstanden sind und welche hätten alternativ entstehen können, waren keine auffälligen Muster für die Aminosäureaustausche zu erkennen. Die beiden möglichen Aminosäuren waren in der Regel in der Struktur ihres Aminosäurerestes sehr ähnlich und zeigten weiterhin die gleichen Eigenschaften an Polarität und Base-Säure-Verhalten. Eine Ausnahme stellte der SNP17 dar. Bei diesem SNP hätte neben der Aminosäure Lysin (AAA) bei einer anderen Allelausprägung auch ein Stopp-Codon (TAA) entstehen können, was zum Peptidabbruch geführt hätte und wodurch ein trunkiertes Protein hätte entstehen können. In den analysierten Spendern war dies jedoch nicht der Fall. Man könnte daher vermuten, dass wahrscheinlich immer das Allel exprimiert wurde, was zu einem vollständig intakten Protein führte.

Eine weitere Auffälligkeit bei Betrachtung der SNP-Daten der exprimierten Allele war, dass ausschließlich bei der paternal-abhängigen *CD177*-Expression beim SNP2 ein Thymin auftrat. Sofern ein Thymin sich an dieser Stelle befand entstand die Aminosäure Leucin anstatt eines Histidins. Leucin besitzt im Gegensatz zum Histidin einen aliphatischen und keinen aromatischen Aminosäurerest. Des Weiteren ist Leucin eine unpolare und neutrale Aminosäure, die einen geringen Einfluss auf die Struktur eines Proteins hat, wohingegen Histidin eine polare und basische Aminosäure darstellt und einen größeren Einfluss auf die Proteinstruktur besitzt. Die Fragestellung, ob es einen direkten Zusammenhang zwischen diesem SNP2 und einer paternal-abhängigen Expression gibt, soll in weiterführenden Experimenten außerhalb dieser Arbeit geklärt werden. Hierzu muss die Zahl der untersuchten Trios erhöht werden.

Ein weiterer interessanter Polymorphismus ist SNP1, bei dem ein Guanin statt eines Cytosins in allen untersuchten exprimierten Allelen zu detektieren war. Dieser SNP wurde bereits in der Literatur von Jelinek und anderen 2007 (Jelinek u. a. 2007) im Zusammenhang

mit *PRV-1* beschrieben. *PRV-1* ist neben *CD177* eine der beiden Proteinisoformen des *CD177*-Gens. In dieser Publikation wurde gezeigt, dass eine Assoziation zwischen drei methylierten Cytosinbasen (C30, C41 und C43) in der näheren Umgebung des Translationsstarts und der Expression der Proteinisoform *PRV-1* in sortierten *PRV-1*^{positiven} und *PRV-1*^{negativen} Zellen vorlag. Sie konnten zeigen, dass in den *PRV-1*^{positiven} Zellen eine höhere Methylierungsrate der Cytosine im Gegensatz zur Methylierungsrate der *PRV-1*^{negativen} Zellen vorherrschte. Dabei konnte nur für C30 und C41 ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zellpopulationen detektiert werden. Des Weiteren untersuchten sie die Assoziation zwischen dem SNP G42C, welcher mit unseren SNP1 übereinstimmt, und den Cytosinen 30 und 43. Sie untersuchten jedoch nicht die Assoziation mit dem Cytosin 41 näher, welches durch die Expression des Allels mit einem Guanin eine potentiell methylierbare CpG-Stelle generieren oder bei der Expression des Cytosin-Allels eine potentielle Methylierungsstelle verhindern würde. Sie wiesen ausschließlich eine Korrelation zwischen einem hohen Methylierungsstatus von C43 und dem Genotyp G/G des SNPs und einer geringen Methylierung bei einem Genotyp von C/C nach. Eine Assoziation zwischen dem Methylierungsstatus von C30 und dem SNP G42C konnten sie jedoch nicht detektieren. Im weiteren Verlauf der Arbeit fokussierten sie sich auf den erhöhten Methylierungsstatus von C30 und der Korrelation mit einer verringerten Genexpression von *PRV-1* in gesunden Spendern. Im Vergleich dazu konnten sie in Patienten mit Polycythemia rubra Vera und essentieller Thrombocytemia eine erhöhte *PRV-1*-Genexpression mit einem verringerten Methylierungsstatus von C30 assoziieren, was sie anhand eines *in vitro* Zellmodelles verifizierten. Anhand der Studie wurde zwar eine Assoziation zwischen unserem SNP1, einem hohen Methylierungsstatus von C43 und einer verringerten Genexpression beim Genotyp G/G des SNPs gezeigt, jedoch kann damit nicht das bimodale Expressionsmuster der neutrophilen Granulozyten erklärt werden. Zum einen untersuchten sie in ihren Studien nicht C41 näher und zum anderen detektierten wir in unseren monoallelisch exprimierten Allelen stets ein Guanin an der Stelle des SNP1, wodurch eine potentiell methylierbare CpG-Stelle generiert wurde. Ob diese Stelle in unseren untersuchten Zellen methyliert vorlag haben wir nicht untersucht, jedoch wiesen wir in den Zellen eine *CD177*-Genexpression als auch eine *CD177*-Zellmembranexpression nach.

Die Betrachtung der Prozentsätze an *CD177*^{positiven} neutrophilen Granulozyten in allen Spendern zeigte bei der bisherigen Spenderanzahl noch keinen sichtbaren Zusammenhang zwischen der Höhe der Prozentigkeit und dem parentalen Allel, welches das *CD177*-Gen exprimiert wird. Dieser Ansatz muss über diese Arbeit hinaus durch Erweiterung der Spenderzahl näher analysiert werden.

Bei der Zusammenfassung der *CD177*-Genexpressionsdaten konnte einheitlich für 11 der 13 untersuchten Kinder eine monoallelische Expression des *CD177*-Gens nachgewiesen werden. In den verbleibenden zwei Kindern konnte kein zur Auswertung notwendiger

heterozygoter SNP im proteinkodierenden *CD177*-Gen gefunden werden. Die Hypothese, dass die Regulation des *CD177*-Gens dem Mechanismus des *Imprintings* unterliegt, konnte nicht bestätigt werden, da sowohl eine maternale als auch eine paternale monoallelische *CD177*-Genexpression nachweisbar war.

4. Diskussion

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Analyse der Präsentation von Membran-Proteinase 3 (mPR3), welche ein Zielantigen der Anti-Neutrophilen Cytoplasmatischen Antikörper (ANCA) darstellt. Die Interaktion von ANCA und membranexprimiertem PR3 auf neutrophilen Granulozyten ist ein zentraler Effektormechanismus bei der Entstehung von ANCA-assoziierten Vaskulitiden. ANCA-assoziierte Vaskulitiden sind systemische Erkrankungen, die sich als nekrotisierende Entzündungen von kleinen Blutgefäßen manifestieren. Jedes Organ im menschlichen Körper kann von diesen Entzündungsvorgängen betroffen werden. Kenntnisse über die Mechanismen und die Regulation der mPR3-Expression tragen zum besseren Krankheitsverständnis bei und könnten neue therapeutische Vorgehensweisen begründen.

4.1. Die Charakterisierung von CD177 als Membran-PR3-Rezeptor

Bei PR3 handelt es sich um ein 29kDa Protein, welches erstmalig von Ohlsson und Olsson im Jahr 1973 beschrieben wurde (Ohlsson & Olsson 1973). Das *PR3*-Transkript kodiert für insgesamt 256 Aminosäuren, wovon die ersten 25 Aminosäuren für ein Signalpeptid und die nachfolgenden zwei Aminosäuren für ein Prodipeptid und die letzten 8 Aminosäuren des Proteins für ein Propeptid kodieren. Sofern die Abspaltung dieser Proteinabschnitte erfolgt ist, erfährt das Protein eine Faltung zu einer enzymatisch aktiven Protease und es erfolgen Glykosylierungen an den Aminosäuren 129 und 174. Das reife, vollständig prozessierte PR3 mit seinen 221 Aminosäuren wurde in primären, in sekundären und auch in sekretorischen Vesikeln neutrophiler Granulozyten nachgewiesen (Goldschmeding u. a. 1989). PR3 kommt nicht nur intrazellulär vor, sondern wird auch auf der Membran der Zellen (mPR3) exprimiert. Das mPR3-Expressionsmuster ist bimodal mit zwei distinkten Zellpopulationen, mPR3^{hoch}- und mPR3^{niedrig} exprimierenden neutrophilen Granulozyten. Ein hoher Prozentsatz an mPR3^{hoch} exprimierenden neutrophilen Granulozyten stellt einen Risikofaktor für das Auftreten ANCA-assoziiierter Vaskulitiden dar und ist mit einem prognostisch ungünstigen Krankheitsverlauf assoziiert (Witko-Sarsat, Lesavre, u. a. 1999; Rarok u. a. 2002; Schreiber u. a. 2005). Witko-Sarsat und andere konnten nachweisen, dass der Prozentsatz an mPR3^{hoch} exprimierenden neutrophilen Granulozyten stabil ist und keine Korrelation mit dem Alter oder Geschlecht der Spender aufweist (Witko-Sarsat u. a. 1999; Witko-Sarsat u. a. 1999). Wie mPR3 auf der Zelloberfläche von neutrophilen Granulozyten verankert ist, war bis zum Beginn dieser Arbeit unbekannt. Wir testeten die Hypothese, dass ein Membranrezeptor eine hohe mPR3-Expression, die auf einem stabilen Prozentsatz neutrophiler Granulozyten detektiert werden kann, vermittelt. Wir konnten zeigen, dass mPR3 durch den GPI-verankerten Membranrezeptor CD177 (mCD177) auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten mit einer hohen mPR3-Expression präsentiert wird (von Vietinghoff u. a. 2007).

Sowohl mPR3 als auch mCD177 zeigten bei der Detektion der Proteine auf der Zellmembran mittels Durchflusszytometrie ein charakteristisches bimodales Expressionsmuster, welches für mPR3 bereits von Bangalore und Travis als auch von Halbwachs-Mecarelli und anderen beschrieben wurde (Bangalore & Travis 1994; Halbwachs-Mecarelli u. a. 1995). Interessanterweise waren mPR3 und mCD177 in hoher Menge auf der Zelloberfläche derselben neutrophilen Granulozytenpopulation zu detektieren. Diese Eigenschaft lässt sich zuverlässig in der durchflusszytometrischen Analyse charakterisieren. Der Prozentsatz $mPR3^{\text{hoch}}/mCD177^{\text{positiver}}$ Zellen konnte dabei objektiv und reproduzierbar quantifiziert werden. Demgegenüber konnten Zellen, die mPR3 und mCD177 nur sehr gering oder gar nicht auf der Zelloberfläche präsentierten und daher in der durchflusszytometrischen Analyse als $mPR3^{\text{niedrig}}/mCD177^{\text{negative}}$ Zellen erschienen. Dieser Befund machte mCD177 zu einem Kandidaten für einen potentiellen mPR3-Rezeptor. Der Prozentsatz $mPR3^{\text{hoch}}/mCD177^{\text{positiver}}$ Zellen rangierte zwischen 0 und 100 Prozent. mCD177 ist ein GPI-verankerter Rezeptor. Diese Moleküle können mittels Phospholipase C von der Zelloberfläche abgespalten werden. Wir beobachteten, dass eine enzymatische Entfernung des GPI-Ankers von mCD177 mittels Phospholipase C zu einer reduzierten mPR3 Expression führte. Es gibt auch Krankheiten, die mit einer somatischen Mutation im *PIG-A*-Gen einhergehen. Hierdurch kommt es zu einer Funktionsstörung der N-Acetylglukosaminyltransferase und damit zu einer gestörten GPI-Ankerbildung (Edberg u. a. 1991; Rosti 2000). Wir hatten Zugang zu einem Patienten mit einer solchen Erkrankung, der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie (PNH). Wir konnten in den neutrophilen Granulozyten dieses Patienten zeigen, dass die GPI-verankerten Rezeptoren CD16, CD66b als auch mCD177 auf der Zelloberfläche im Vergleich zu gesunden Spenderzellen nur sehr gering oder gar nicht zu detektieren waren. Verursacht durch die fehlende Membranexpression des Rezeptors mCD177 konnte in diesen Zellen des PNH-Patienten auch keine PR3-Membranexpression detektiert werden. Diese Daten stützten zusätzlich unsere Hypothese, dass mCD177 als mPR3-Rezeptor fungiert.

In einem nächsten Schritt konnten wir an humanen neutrophilen Granulozyten zeigen, dass exogen zugeführtes PR3 nur durch $mPR3^{\text{hoch}}/mCD177^{\text{positive}}$ Zellen gebunden werden kann, wobei der Prozentsatz an $mPR3^{\text{hoch}}$ Zellen stets konstant blieb (von Vietinghoff u. a. 2007). Ähnliche Ergebnisse wurden nahezu gleichzeitig zu unserer Veröffentlichung von Bauer und anderen publiziert (Bauer u. a. 2007). Über die gemeinsame Membranexpression von mPR3 und mCD177 auf derselben Population neutrophiler Granulozyten, konnten wir demonstrieren, dass beide Moleküle auf der Membran colokalisieren. Für andere GPI-verankerte Rezeptoren, wie beispielsweise CD16 und CD66b, konnten diese Colokalisationsergebnisse mit mPR3 nicht nachgewiesen werden (von Vietinghoff u. a. 2007). Die direkte Interaktion zeigten wir, indem wir mPR3 und mCD177 copräzipitieren konnten.

Weitere wichtige Befunde wurden in einem ektopen Expressionssystem an HEK293 Zellen erhoben. Wir konnten mittels durchflusszytometrischer Analyse zeigen, dass mCD177 auf der Zellmembran von *CD177*-transfizierten HEK293 Zellen exprimiert wurde. Bei Einzeltransfektionen der verschiedenen *PR3*-Konstrukte mit dem Kontrollplasmid konnte kein mPR3 auf der Zelloberfläche der HEK293 Zellen detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte mPR3 nach einer Cotransfektion mit dem *CD177*-Plasmid nachgewiesen werden. Es gab jedoch deutliche Unterschiede zwischen den drei *PR3*-Konstrukten. Die Cotransfektion des *CD177*-Plasmids mit dem *PR3F*-Plasmid führte zu keinen membranständigen PR3. Dies könnte damit begründet werden, dass das *PR3F*-Konstrukt noch das Dipeptid enthielt, welches bei der Prozessierung zum reifen PR3-Protein hätte abgespalten werden müssen. Es ist denkbar, dass nur reifes PR3-Protein so gefaltet ist, dass es auf der Zellmembran von mCD177 präsentiert werden kann. HEK293 Zellen besitzen jedoch endogene keine Dipeptidylpeptidase 1, welche für die Abspaltung eines Dipeptids verantwortlich ist. Dadurch war eine vollständige Prozessierung des PR3-Proteins, welches aus dem *PR3F*-Plasmid resultiert, nicht möglich. Bei der Cotransfektion des *CD177*-Plasmids mit dem *PR3*-Plasmid war nur eine sehr geringe Menge an mPR3 zu detektieren. Dieses *PR3*-Konstrukt besaß ebenso wie das *PR3F*-Konstrukt noch das Dipeptid, wodurch eine vollständige Prozessierung zu einem reifen Protein wiederum nicht möglich war. Die detektierte Menge an mPR3, die sich in einer leichten Rechtsverschiebung der Kurve im Vergleich zur Kontrollkurve mit einem Isotypenantikörper äußerte, ist möglicherweise damit zu begründen, dass im Falle des *PR3*-Konstruktes die drei Serine für eine katalytische Triade noch intakt waren. Durch diese Gegebenheit könnte die Faltung des Proteins im Gegensatz zum *PR3F*-Protein in leicht veränderter Form vorgelegen haben. Konformationänderungen können eine wesentliche Rolle bei Bindungsspezifitäten spielen. Beim *PR3F*-Konstrukt wurde ein Serin der katalytischen Triade gegen ein Alanin ausgetauscht, wodurch diese drei Aminosäuren nicht in die ursprünglichen Interaktionen treten konnten und eine untypische Faltung verursachten. Eine deutliche mPR3-Expression der HEK293 Zellen konnte bei der Cotransfektion des *CD177*-Plasmids mit dem *PR3k*-Plasmid erzielt werden. Beim *PR3k*-Protein fehlte bereits das Dipeptid und eine weitere Prozessierung zu einem reifen Protein war daher nicht mehr notwendig. Dieses vollständig prozessierte mPR3 konnte aus diesem Grunde auch durch seinen Rezeptor mCD177 auf der Zelloberfläche von HEK293 Zellen präsentiert werden.

Unsere Daten zeigten, dass die Expression von mCD177 in HEK293 Zellen, diese Zellen in die Lage versetzte exogenes PR3, nicht aber verschiedene andere Kontrollproteine, auf der Zelloberfläche zu präsentieren. Letztlich führten wir einen zusätzlichen Beweis in HEK293 Zellen an und demonstrierten, dass die Cotransfektion beider Moleküle zu deren Expression auf derselben Zellpopulation führte (von Vietinghoff u. a. 2008).

Wir schlussfolgerten aus den hier diskutierten Befunden, dass mCD177 zumindest eine Möglichkeit darstellte, wie mPR3 auf der Zellmembran präsentiert werden kann. Unsere bisherigen Analysen zeigten nicht nur eine bimodale mPR3, sondern auch eine korrespondierende bimodale mCD177-Expression. Damit entstand die neue Frage nach der Charakterisierung der CD177-Expression auf Protein und RNA-Ebene.

4.2. Charakterisierung der distinkten mPR3^{niedrig}/mCD177^{negativen} und mPR3^{hoch}/mCD177^{positiven} Populationen neutrophiler Granulozyten und neutrophil differenzierter hämatopoetischer Stammzellen

Basierend auf der funktionellen Bedeutung der mCD177-Expression für die mPR3-Präsentation, führten wir eine detaillierte Charakterisierung der mPR3^{hoch}/mCD177^{positiven}- und mPR3^{niedrig}/mCD177^{negativen} neutrophilen Granulozyten durch. Diese Untersuchungen schlossen terminal differenzierte neutrophile Granulozyten aus dem peripheren Blut und neutrophil differenzierte CD34-positive hämatopoetische Stammzellen ein. Wir separierten die beiden Populationen und analysierten die Morphologie der Zellen sowie die Protein- und Genexpression von PR3 und CD177.

Während wir keine Unterschiede hinsichtlich der Morphologie und des Reifungsgrades beider Zellpopulationen fanden, konnten wir deutliche Unterschiede bezüglich der CD177 Protein- und mRNA-Expression demonstrieren. Wir konnten weder ein Protein noch eine mRNA für CD177 in den mCD177^{negativen} Zellen nachweisen. Diese Befunde waren in neutrophilen Granulozyten aus dem Blut und *in vitro* differenzierten Neutrophilen identisch.

mCD177 wird in der überwiegenden Mehrheit aller Individuen bimodal exprimiert. Es wurde bereits gezeigt, dass der mCD177-Prozentsatz in gesunden Spendern stabil ist (Goldschmeding u. a. 1992; Wolff u. a. 2003). Neben Individuen mit einer bimodalen mCD177-Expression existieren einige wenige Individuen, die monomodal mCD177-negativ sind. Solche „natürlichen *Knock-outs*“, die kein CD177-Protein generieren, wurden bereits 1971 von Lalezari und anderen untersucht. Die Autoren konnten zeigen, dass CD177-defizienten Mütter während einer vorangegangenen Schwangerschaft einen Anti-CD177-Antikörper gegen ihr ungeborenes Kind entwickelten. Bei einer erneuten Schwangerschaft wurde dieser Alloantikörper diaplazentar übertragen und führte bei den Kindern, die CD177^{positive} neutrophile Granulozyten hatten zu einer schweren neonatalen Neutropenie (Lalezari u. a. 1971). Weitere Untersuchungen an schwangeren Frauen, die ausschließlich CD177-defiziente neutrophile Granulozyten besitzen, wurden erst 2002 von Kissel und anderen durchgeführt (Kissel u. a. 2002). Sie konnten in den von ihnen untersuchten zwei CD177-defizienten schwangeren Frauen weder intrazelluläres noch membranständiges CD177-Protein auf neutrophilen Granulozyten nachweisen. Des Weiteren konnten die Autoren aus diesen Zellen eine mRNA für *CD177* isolieren, die sie anschließend mit intakter *CD177*-mRNA aus einem CD177-positiven Spender verglichen. Es zeigte sich, dass in

beiden Spenden eine Baseninsertion von 118bp bzw. 145bp an verschiedenen Stellen in der mRNA zu verzeichnen war, die ein zusätzliches Exon bilden könnten. Jedoch wurde bei beiden Insertionen im Leserahmen ein Stopp-Codon gefunden, was einen vorzeitigen Proteintranslationsabbruch bedingte. Die Autoren schlussfolgerten, dass diese alternative mRNA durch einen Defekt im Spleißkomplex verursacht wird und es daher zu keinem intakten CD177-Protein kommt. Solch eine alternative mRNA konnten wir in den mCD177^{negativ} sortierten Zellen jedoch nicht nachweisen und vermuten daher, dass der CD177-Regulationsmechanismus in den mCD177^{positiven}- als auch mCD177^{positiven} Zellen eines Spenders mit gemischter Population ein anderer ist als der Kontrollmechanismus in vollständig CD177-defizienten Spendern.

Es existiert ein weiteres Krankheitsbild, das von der mCD177-Expression abhängig ist. Untersuchungen von Sachs und anderen wiesen eine bedeutsame Rolle für mCD177 bei der Transfusions-assoziierten akuten Lungeninsuffizienz (engl. *transfusion related acute lung injury*; TRALI) nach. Sie konnten zeigen, dass eine Aktivierung der neutrophilen Granulozyten über Alloantikörper gegen das Membranprotein CD177 eine Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen bewirkt. Diese reaktiven Sauerstoffradikale verursachen eine Endothelzellschädigung in den Lungengefäßwänden, wodurch wiederum Blutplasma ins umliegende Gewebe austreten kann und dort ein Lungenödem verursacht (Sachs u. a. 2006).

Inzwischen wurde ein weiterer Interaktionspartner für mCD177 beschrieben. Hierbei handelt es sich um das auf endothelialen Zellen exprimierte PECAM-1 (engl. *platelet endothelial cell adhesion molecule-1*; CD31) (Sachs u. a. 2007). PECAM-1 ist ein konstitutiv exprimiertes Protein, das in den endothelialen Zell-Zell-Kontakten entlang aller Gefäßwände lokalisiert ist (Muller u. a. 1989; Albelda u. a. 1990). Das für PECAM-1-Protein kodierende Gen befindet sich auf Chromosom 17 (Newman u. a. 1990; Gumina u. a. 1996). Dangerfield und andere konnten 2002 zeigen, dass geringe Mengen an PECAM-1 auch auf neutrophilen Granulozyten exprimiert werden und dass eine homophile Interaktionen zwischen dem PECAM-1 auf den neutrophilen Granulozyten und dem PECAM-1 von den Endothelzellen einen wichtige Rolle bei der Leukozytenmigration spielt (Dangerfield u. a. 2002). Sachs und andere konnten 2007 demonstrieren, dass das PECAM-1-Protein der Endothelzellen direkt an CD177 der neutrophilen Granulozyten binden kann und dass diese Bindung eine wichtige Rolle bei der Interaktion dieser beiden Zelltypen während der Transmigration spielt (Sachs u. a. 2007). Sie konnten diese Interaktion unter Verwendung von Antikörpern gegen mCD177 oder PECAM-1 zwischen CD177-stabil transfizierten U937 und immobilisierten PECAM-1 inhibieren.

Die aufgeführten Beispiele weisen auf die Bedeutung von CD177 für verschiedene physiologische und pathophysiologische Prozesse hin. Die Präsentation von mPR3, dem ANCA-Antigen bei Patienten mit ANCA-assoziiierter Vaskulitis ist Schwerpunkt unseres

Forschungsinteresses. Daher sollten zwei weitere Aspekte dieses Themas diskutiert werden, die mCD177-mPR3 Interaktion auf Proteinebene und die PR3-ANCA induzierte Zellaktivierung, die über einen GPI-verankerten Rezeptor ohne intrazelluläre Domäne erfolgen muss. In den Cotransfektionsstudien dieser Arbeit in HEK293 Zellen konnte gezeigt werden, dass nur vollständig prozessiertes PR3 von CD177 auf der Zellmembran von neutrophilen Granulozyten präsentiert werden kann und nicht die Proform des PR3-Proteins. Im reifen PR3-Protein ist sowohl das Signalpeptid am N-Terminus als auch das Dipeptid vom PR3 abgespalten. Unsere Daten ließen vermuten, dass der N-Terminus im PR3-Protein mit der potentiellen CD177-Bindungsstelle interferiert. Im Gegensatz zur Bedeutung des N-Terminus für die Bindung zu mCD177, beeinflusst das Vorhandensein des PR3-N-Terminus nicht das Bindungsverhalten zwischen mPR3 und den PR3-ANCA von Patienten mit Vaskulitis (Witko-Sarsat u. a. 1996; Sun u. a. 1998; van der Geld u. a. 2000; Rarok u. a. 2003; Farrag u. a. 2007). Die klinischen Daten zeigten sogar, dass ANCA, die die unreife Pro-PR3 Form erkennen eine bessere Vorhersage für die Krankheitsprognose der Patienten mit ANCA-assoziiertes Vaskulitis erlauben (Russell u. a. 2001; Finkielman u. a. 2007). Korkmaz und andere konnten die genaue Bindungsstelle von mPR3, mit der das Protein an den mCD177-Rezeptor bindet, identifizieren (Korkmaz u. a. 2008). Diese Bindungsstelle existiert ausschließlich im PR3 und konnte nicht auf den beiden anderen neutrophilen Serinproteasen Elastase und Cathepsin G nachgewiesen werden. Die Autoren generierten verschiedene PR3-Hybride. Dabei zeigte sich, dass ein Konstrukt bei dem der N-terminale PR3-Teil vom menschlichen PR3 stammt und der C-terminale PR3-Teil von Gibbon (*Hylobates pileatus*)-PR3 nicht mit mCD177 interagieren kann. Bestand das verwendete Konstrukt jedoch aus einem N-terminalen PR3-Teil vom Gibbon (*Hylobates pileatus*)-PR3 und dem C-terminalen humanen PR3-Teil, erfolgte eine starke Bindung des PR3-Hybriden mit mCD177. In weiteren Versuchen substituierten die Autoren die hydrophoben Reste (F166L, W218R, G219A und L223H) im C-terminalen PR3-Teil vom Gibbon-PR3 gegen die entsprechenden Reste, wie sie im menschlichen PR3 vorkommen. Dieser PR3-Hybrid aus einem N-terminalen PR3-Teil vom menschlichen PR3 und einem veränderten C-terminalen PR3-Teil vom Gibbon-PR3 mit veränderten hydrophoben Resten, konnte wiederum an mCD177 binden. Anhand dieser Ergebnisse konnten gezeigt werden, dass diese Cluster aus hydrophoben Resten für die Bindung von mPR3 an mCD177 essentiell sind. Die genaue Kenntnis der mCD177-mPR3 Bindungsstelle kann hilfreich sein, um Substanzen zu generieren, die die Bindung beider Moleküle verhindern oder sogar mPR3 aus der mCD177-Bindung verdrängen. Ein anderer Weg solche Blocker zu identifizieren wurde von uns in einem sogenannten „*compound screening*“ besprochen. Wir exprimierten CD177 in HEK293 Zellen und testeten eine Substanzenbibliothek von 20000 Einzelsubstanzen. Wir identifizierten 2 vielversprechende Substanzen, die die Bindung von exogenem PR3 and mCD177 in HEK293 Zellen inhibierte und die cytokin-induzierte Hochregulation von mPR3

auf mCD177^{positiven} neutrophilen Granulozyten signifikant verminderte. Diese Substanzen mussten allerdings im mikromolaren Bereich verwendet werden und benötigen weitere Optimierungsschritte (Choi, Eulenberg u. a. 2010).

Der mCD177-Rezeptor besitzt zwar einen GPI-Anker zur Integration in die Zellmembran der neutrophilen Granulozyten, jedoch keine intrazelluläre Domäne, um Signale ins Zellinnere weiterzuleiten. Diese Signaltransduktion nach der Bindung von ANCA an CD177-präsentiertes mPR3 ist jedoch die Voraussetzung für die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten. David und andere zeigten bereits 2003 in Colokalisationsstudien und Coimmunpräzipitationen, dass mPR3 mit dem Integrinkomplex CD11b/CD18 auf der Zellmembran von neutrophilen Granulozyten interagiert. Sie spekulierten, dass über diesen Komplex möglicherweise eine Signalweiterleitung erfolgen könnte (David u. a. 2003). Fridlich und andere konnten 2006 zeigen, dass mPR3 zusammen mit CD11b, CD18 und dem Fcγ-Rezeptor IIIb in Mikrodomänen der neutrophilen Granulozytenmembranen, den sogenannten „lipid rafts“, lokalisiert sind (Fridlich u. a. 2006). Hierbei handelt es sich um eine dynamische Plattform innerhalb der Zellmembran, in der sich Proteine für die Signalweiterleitung konzentrieren und die durch das Vorhandensein des Proteins Flotillin-1 gekennzeichnet sind. Unsere Arbeitsgruppe untersuchte die Signalweiterleitung bei der PR3-ANCA vermittelte Zellaktivierung über mCD177. Wir testeten die Hypothese, dass der PR3-CD177-Membrankomplex weitere Komponenten enthält, die für die Signaltransduktion erforderlich sind. 2011 konnten wir zeigen, dass eine PR3-ANCA vermittelte Zellaktivierung zur Degranulation und zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies führen und charakterisierten essentielle transmembrane Corezeptoren (Jerke u. a. 2011). Anhand von Plasmamembranpräparationen, der Extraktion von Membranproteinen mit anschließender Coimmunpräzipitationen und Tandem-Massenspektroskopieanalysen, wurde nach potentiellen Bindungspartnern von mCD177 gesucht. Dies führte zur Identifizierung von Mac-1, welches für die Signalweiterleitung verantwortlich ist. Mac-1 ist ein Dimer aus CD11b und CD18. Die Interaktion von mCD177 und Mac-1 wurde nachfolgend anhand von Coimmunpräzipitationen verifiziert. mCD177, mPR3 sowie CD11b und CD18 fanden sich gemeinsam in den sogenannten „lipid rafts“.

Bartunková und andere zeigten 1997, dass Antikörper gegen das Protein mCD177 ähnlich wie PR3-ANCA eine Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies in vorstimulierten neutrophilen Granulozyten induziert (Bartunková u. a. 1997). Aufbauend auf diesen Daten wurde von Jerke und anderen gezeigt, dass die PR3-ANCA vermittelte Degranulation und extrazelluläre Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies in mPR3^{hoch}/mCD177^{positiven} neutrophilen Granulozyten gegenüber mPR3^{niedrig}/mCD177^{negativen} neutrophilen Granulozyten signifikant erhöht war (Jerke u. a. 2011). Diese unterschiedliche Funktionalität der beiden Zellpopulationen konnte nur für PR3-ANCA, nicht jedoch für andere Stimuli wie MPO-ANCA oder das bakterielle Peptid N-Formylmethionyl-Lencyl-Phenylalanin (fMLP) gezeigt werden.

Die vorangegangene Diskussion belegt die Bedeutung von mCD177 für die ANCA-assoziierte Vaskulitis, aber auch darüber hinaus. Somit ist das Verständnis der Regulation der CD177-Proteinexpression für verschiedene physiologische und pathophysiologische Prozesse der Neutrophilenbiologie wichtig. Unsere Genexpressionsdaten von *PR3* und *CD177* während der Differenzierung der CD34-positiven Stammzellen zu neutrophilen Granulozyten zeigten unterschiedliche Expressionsverläufe beider Gene. Undifferenzierte Zellen exprimierten bereits *PR3*-mRNA und die Expression stieg bis zum Tag 6 an, um dann langsam zurückzugehen. Im Gegensatz dazu wurde die *CD177*-mRNA in undifferenzierten Zellen nicht exprimiert, aber im Laufe der Differenzierung stieg die Expression an. In Übereinstimmung dazu fand in zirkulierenden neutrophilen Granulozyten aus Blut eine abgeschaltete *PR3* und eine aktive *CD177*-Gentranskription statt. Diese zeitliche distinkte Expression von *PR3* und *CD177* führt zu einer unterschiedlichen Sortierung beider Proteine in unterschiedliche intrazelluläre Speicherorte, den sogenannten „Granula“. So wird PR3 in vorrangig in primären und sehr gering in sekundären Granula und CD177 hauptsächlich in sekundären und tertiären Granula gespeichert (von Vietinghoff u. a. 2008). Die verschiedenen Granula werden während einer Entzündung nicht uniform mobilisiert. Tertiäre Granula sind leichter zu mobilisieren als primäre. Basierend auf den unterschiedlichen Speicherorten von PR3 und CD177 vermuten wir auch eine unabhängige Translokation der beiden Proteine auf die Zellmembran der neutrophilen Granulozyten, wo sich dann Antigen und Rezeptor binden.

Unsere Daten bezüglich der Charakterisierung von mPR3^{hoch}/mCD177^{positiven} und mPR3^{niedrig}/mCD177^{negativen} neutrophilen Granulozyten zeigte eine fehlende Protein- und mRNA-Expression in der letzteren Granulozytenpopulation. Damit rückte die Charakterisierung der *CD177*-Genexpression in den Fokus unserer nachfolgenden Untersuchungen.

4.3. Genetische Regulation der CD177 Genexpression

Eine bimodale mPR3-Expression, hängt vom Vorhandensein des CD177-Rezeptors ab. Dabei weisen unsere Daten darauf hin, dass die CD177-Regulation bereits auf mRNA-Ebene erfolgt. Unsere Zwillingsstudie zur prozentualen Verteilung der mPR3^{hoch}/mCD177^{positiven} und mPR3^{niedrig}/mCD177^{negativen} neutrophilen Granulozyten legte eine genetische Ursache nahe (Schreiber u. a. 2003). Aus diesem Grunde sollte im letzten Teil der vorliegenden Arbeit die genetische Regulation der *CD177*-Genexpression näher charakterisiert werden. Zunächst konnten wir einige Aspekte einer potentiellen Regulation des *CD177*-Gens, welches auf dem Chromosom 19 liegt, ausschließen.

Wir untersuchten die Hypothese, dass eine intrachromosomale Rekombination mit dem *CD177*-Pseudogen, welches sich *revers* auf dem Antisense-Strang von Chromosom 19 befindet, zu einer fehlenden *CD177*-mRNA führt. Diese Ursache konnte ausgeschlossen

werden. Des Weiteren wurden von uns sowohl eine Deletion des *CD177*-Gens auf genomischer Ebene, die durch die *Copy number variation* (CNV) 2244 hätte verursacht werden können, als auch der regulatorische Einfluss eines Antisense-Transkriptes auf die *CD177*-Gen- und Proteinexpression ausgeschlossen.

In den folgenden Experimenten führten wir Mutations- und Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. *Single Nucleotide Polymorphism*, SNP)-Analysen im *CD177*-Gen durch. Hierfür war es zunächst notwendig die komplette Genstruktur zu charakterisieren, gegebenenfalls zusätzliche Exone zu identifizieren und den Transkriptionsstart (TSS) des *CD177*-Gens in neutrophilen Granulozyten zu bestimmen. Die cDNA-Referenzsequenz der NCBI-Datenbank (NM_020406.2) sagte eine 5'-untranslatierte Region (5'-UTR) von 42 Basen vor dem Translationsstart vorher. Unsere Analyse legte den TSS 29 Basen vor dem Start-Codon fest. Weitere Transkriptinformationen der Datenbank, die zum Ende dieser Arbeit verfügbar waren, zeigten den von uns ermittelten TSS als vorzugten Startort der *CD177*-Transkription. Der TSS der Referenzsequenz basiert auf der cDNA-Sequenz eines einzelnen ESTs (BX644504). Zusätzliche Exone wurden nicht gefunden. Wir konnten anhand von Sequenzierungen nachweisen, dass das *CD177*-Gen auf genomischer Ebene innerhalb der proteinkodierenden Regionen, der Intron-Exon-Übergänge sowie in der 5'-UTR zwischen $mPR3^{\text{hoch}}/mCD177^{\text{positiven}}$ und $mPR3^{\text{niedrig}}/mCD177^{\text{negativen}}$ Zellen identisch ist. Wir schlussfolgerten, dass die bimodale *mCD177*-Verteilung einem anderen Regulationsmechanismus zu Grunde liegen muss.

Wir erweiterten unseren Focus auf epigenetische Regulationsmechanismen. *Imprinting* als epigenetisches Phänomen könnte ebenfalls die nahezu identische bimodale *mPR3/mCD177*-Verteilung in monozygoten Zwillingen erklären. Genomisches *Imprinting* oder auch genomische Prägung definiert das genetische Phänomen bei dem nur ausschließlich ein bestimmtes parentales Allel für die Expression eines Gens verantwortlich ist. Das andere parentale Allel ist dabei inaktiv. Die Ursache von *Imprinting* liegt in geschlechtsspezifischen epigenetischen Modifikationen der genomischen Genbereiche in der frühen Phase der Keimzellentwicklung. Zu diesem Zeitpunkt deuteten unsere vorliegenden Daten zur *CD177*-Expression auf eine in differenzierten Stammzellen aktivierte *CD177*-Genexpression in $mPR3^{\text{hoch}}/mCD177^{\text{positiven}}$ neutrophilen Granulozytenpopulation hin. In undifferenzierten Stammzellen wurde *CD177* nicht exprimiert. Um die Hypothese des *Imprinting* zu überprüfen, war es notwendig, kodierende SNPs sowohl auf genomischer als auch auf mRNA-Ebene zu genotypisieren. Wir wählten für diese Untersuchungen Familien mit zwei Elternteilen und mindestens einem Kind, sogenannte „*Trios*“, aus. Wir begannen mit der Analyse der kindlichen mRNA und DNA, die parallel durchgeführt wurden. Interessanterweise zeigten unsere Daten eine bislang für das *CD177*-Gen unbekanntes monoallelische Expression. Diese monoallelische Expression konnte in elf Kindern eindeutig nachgewiesen werden. Es wurden insgesamt dreizehn Kinder untersucht, wobei in zwei

Individuen kein heterozygoter SNP in der proteinkodierenden Region des *CD177*-Gens gefunden werden konnte und damit eine Auswertung bezüglich monoallelischer Expression nicht möglich war.

Aufgrund des neuen Befundes der monoallelischen *CD177*-Expression, erweiterten wir unsere Untersuchungen auf die Eltern, um den Ursprung des exprimierten Allels bestimmen zu können. Hierzu wurde die SNP-Analyse an der elterlichen DNA durchgeführt. Anhand dieser Ergebnisse konnten wir in den elf Kindern sechsmal eine mütterliche (maternale) und zweimal eine väterliche (paternale) monoallelische *CD177*-Genexpressionen nachweisen. In den restlichen drei Kindern konnten wir aufgrund der SNP-Konstellation den elterlichen (parentalen) Ursprung der kindlichen monoallelischen *CD177*-Expression nicht bestimmen. Da wir sowohl mehrfach eine maternale als auch eine paternale Herkunft der Allel-abhängigen Transkription vorfanden, ist der Befund nicht als klassisches „*Imprinting*“ zu bezeichnen. Hierbei wäre eine strikte maternale oder paternale Allel-spezifische Expression in allen Kindern aller Trios vorauszusetzen.

Da wir 4 Familien analysierten, die mehr als ein Kind hatten, konnten wir auch bestimmen, ob zwei Kinder einer Familie, die den gleichen genetischen Hintergrund aufwiesen, das gleiche Allel exprimieren würden und somit immer nur das maternale oder das paternale Allel innerhalb einer Familie exprimiert werden würde. Diese Fragestellung konnten wir anhand der Allelkonstellation der Familie G beantworten. Bei dieser Familie konnte nachgewiesen werden, dass eines der beiden Kinder das maternale und das zweite Kind das paternale Allel des *CD177*-Gens exprimierte, wodurch eine zufällige Expressionswahl eines der Allele angenommen werden kann.

Unsere genetische Analyse gab uns die Möglichkeit weitere Aspekte zu untersuchen. Im Rahmen der Probenentnahme bei den Spendern führten wir an allen Individuen eine durchflusszytometrische Bestimmung der mCD177-Zelloberflächenexpression durch. Die Daten wurden in den Abbildungen im Abschnitt 3.3.6. bzw. im Anhang 7.4. vermerkt. Bei genauerer Datenbetrachtung konnte kein Zusammenhang zwischen dem Prozentsatz mCD177^{positiver} neutrophiler Granulozyten und dem elterlichen Ursprung des exprimierten *CD177*-Allels gefunden werden. Es muss hierzu jedoch angemerkt werden, dass der Datensatz für eine statistische Aussage nicht umfangreich genug war.

Wir analysierten unsere Daten auch bezüglich möglicher bevorzugter Expression allelischer Varianten, die in spezifische Aminosäureeigenschaften münden würden. Ein Beispiel aus der Literatur ist die Sichelzellanämie, bei der eine Mutation zu einem Basenaustausch und sogar zu einem Aminosäureaustausch führt. Hierbei wird die Aminosäure Glutaminsäure (Basentriplett GAG) des normalen Hämoglobins gegen ein Valin (Basentriplett GUG) ausgetauscht und führt zu einem funktionell defizienten Hämoglobin. Aus diesem Grunde verglichen wir die Aminosäuren, die sowohl beim exprimierten Allel als auch beim alternativ möglichen (nichtexprimierten) Allel entstehen würden. Es konnten allerdings keine auffälligen

Muster von Aminosäurevarianten nachgewiesen werden. Nicht alle SNPs führten zu Aminosäureänderungen. Fanden sich SNPs, die tatsächlich in Aminosäureaustausche resultierten, waren die Aminosäurevarianten sehr ähnlich in ihren Eigenschaften. Wir vermuteten deshalb, dass diese Veränderungen aufgrund der hohen Ähnlichkeit keinen weitreichenden Einfluss auf die Proteinstruktur von mCD177 nehmen sollten. Es wurden durch die Aminosäureaustausche auch keine Bindungen der Tertiärstruktur, wie beispielsweise Disulfidbrücken oder hydrophobe Wechselwirkungen, zerstört. Hierbei machte jedoch der Basenaustausch von SNP17 eine Ausnahme. Dieser Basenaustausch könnte neben der eigentlichen Aminosäure Lysin (AAA) auch zu einem Stopp-Codon mit dem Basentriplett TAA führen, wodurch ein trunkiertes CD177-Protein entstehen würde. In unseren untersuchten Spendern war dieses Allel jedoch nie exprimiert. Spekulativ könnte man formulieren, dass nur das Allel von der Zelle exprimiert wird, welches zu einem intakten Protein führen kann. Auffällig war ebenfalls, dass die Pyrimidinbase Thymin bei SNP2 mit einer paternalen und die Purinbase Adenin mit einer maternalen CD177-Allelexpression einhergeht. Für die Erhärtung dieser Aussagen sind jedoch weitere Untersuchungen an einer größeren Probandenzahl notwendig, was für ein zukünftiges Projekt vorgesehen ist.

SNP1 ist ein weiterer interessanter SNP von dem ausnahmslos, in allen Heterozygoten, ein Guanin anstatt eines Cytosins in den exprimierten Allelen zu detektieren war. Dieser SNP sowie weitere wurden bereits im Zusammenhang mit den Krankheiten Polycythemia rubra Vera und essentielle Thrombocytemia untersucht (Jelinek u. a. 2007). Die Autoren untersuchten das *Polycythemia rubra vera-1* (*PRV-1*)-Gen hinsichtlich dessen potentiellen Methylierungsstellen der CpG-Dinukleotide C30, C41 und C43 um den Translationsstartpunkt und die Höhe der Genexpression in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus. *PRV-1* ist neben CD177 eine der beiden Proteinisoformen des *CD177*-Gens (Caruccio u. a. 2004; Caruccio u. a. 2006). SNP1 (rs45441892) ist zwischen C41 und C43 lokalisiert. Sein G-Allel generiert die potentielle C41-Methylierungsstelle. Jelinek und andere konnten anhand ihrer Daten zeigen, dass in normalen neutrophilen Granulozyten die Methylierungsrate von C43 stark mit dem Genotyp von SNP1 korreliert war. C43 war am höchsten beim G/G- und am niedrigsten beim C/C-Genotyp methyliert, was mit höheren Expressionsraten assoziiert war. C41 wurde nicht in den Kontext der SNP1-Allele gesetzt. Im Gegensatz dazu war eine höhere Methylierungsrate von C30 mit einer niedrigeren Expression von *PRV-1* assoziiert. Hingegen wurde bei einer hohen *PRV-1*-Genexpression in Polycythemia rubra Vera und bei essentieller Thrombocytemia nur eine geringe Methylierungsrate dieser drei betrachteten CpG-Dinukleotide detektiert. Aus diesen Ergebnissen schlossen sie, dass eine Überexpression des *PRV-1*-Gens in den Krankheiten Polycythemia rubra Vera und essentieller Thrombocytemia eng assoziiert mit einer verringerten Methylierungsrate dieses Gens einhergeht. Zieht man Rückschlüsse zu unseren Daten, wurden alle untersuchten mRNAs mit einem Guanin an der SNP1-Position exprimiert, sowohl bei heterozygoten Status

C/G als auch bei homozygoten Status G/G (C/C-Genotyp war nicht im Datensatz enthalten). Ein Guanin an dieser Stelle generiert ein CpG-Dinukleotid. Dagegen führt ein Cytosin zum Verlust des CpGs und damit zu einer geringeren Methylierungsrate, was sich in Expression ausdrücken sollte. In allen untersuchten Spendern war jedoch ausschließlich das G-Allel exprimiert, wodurch die C41-Methylierungsstelle keinen Einfluss auf die *CD177*-Regulation hat. Unsere Hypothese lautet daher, dass eine Methylierung an C41 und C43 einen Einfluss auf Genexpressionshöhe hat, sie aber keine Rolle bei der Wahl des exprimierten Allels spielt. Andere Chromatinregionen sollten die monoallelische Genexpression beeinflussen. Benachbarte CpG-Dinukleotide könnten ebenso verantwortlich sein. Laut Datenbankanalyse gibt es in diesen Bereich allerdings keine CpG-Inseln, die häufig bei epigenetischen Mechanismen der Genregulationen eine wichtige Rolle spielen. Auch einzelne CpG-Dinukleotide sind nur sehr selten im genomischen *CD177*-Genbereich. So gibt es innerhalb von 1000bp aufwärts und 200bp abwärts des Translationsstarts nur 14 CpGs (Jelinek u. a. 2007). Da neuere Studien wie beispielsweise von Claus und anderen (Claus u. a. 2012) jedoch auch den Einfluss von einzelnen CpGs auf eine Genexpression nachweisen konnten, wollen wir in weiterführenden Experimenten mit einer größeren Spenderanzahl diese Thematik näher untersuchen.

Wir sind überzeugt, dass der neue Befund einer monoallelischen *CD177*-Expression von Interesse ist. Monoallelische Expression scheint häufiger der Fall zu sein, als bisher angenommen und ist nicht nur auf klassisches *Imprinting* beschränkt. Neben dem *Imprinting* tritt monoallelische Expression in Form von Geschlechtschromosom-spezifischer X-Inaktivierung als auch Autosomen-betreffender *random* (zufälliger) monoallelischer Expression auf (Gimelbrant u. a. 2007). Die X-Inaktivierung von Genen dient dem Ausgleich der Expressionsmenge von X-chromosomalen Genen. Der Prozess wird durch eine spezielle RNA (eng. *X inactiv specific transcript-RNA*; *XIST*) reguliert (Brown u. a. 1991; Pontier & Gribnau 2011). Über die Mechanismen der oberflächlich betrachtet scheinbar zufälligen monoallelischen Expression von Genen auf Autosomen ist bisher noch wenig bekannt. Jedoch unterliegen auch diese mit Sicherheit determinierten regulatorischen Prozessen. So konnten von mehreren Gruppen an den ersten Beispielen für *random* monoallelische Expression von Immunglobulingenen gezeigt werden, dass eine Regulation der DNA-Rearrangements durch eine *RAG* (*Rekombination-aktivierendes-Gen*)-Rekombinase vermittelt wird (Bergman 1999; Rada & Ferguson-Smith 2002; Hewitt u. a. 2009). Daneben werden aber auch noch weitere Regulationsmechanismen anhand von epigenetischen Markierungen, nicht-kodierender RNA, asynchroner DNA-Replikation und evolutionären Selektionseinflüssen diskutiert (Chess 2012). Weitere Beispiele an Genen, die einer *random* monoallelischen Expression unterliegen, sind Geruchsrezeptoren (Chess u. a. 1994; Lomvardas u. a. 2006), T-Zell-Rezeptoren (Agata u. a. 2007), Interleukine (Calado u. a. 2006) und Rezeptoren von natürlichen Killerzellen (Saleh u. a. 2004). Zusammengefasst

weisen 5 bis 10 Prozent aller humanen autosomalen Gene eine *random* monoallelische Expression auf (Gimelbrant u. a. 2007). Diese Art der monoallelischen Expression tritt nicht nur beim Menschen, sondern auch bei Primaten bis hin zu Nagern auf (Zwemer u. a. 2012). Die Tatsache, dass dieser Expressionsregulationsmechanismus viele Rezeptoren von verschiedensten peripheren Blutzellen, wie beispielsweise B- und T-Lymphozyten als auch natürlichen Killerzellen, einschließt, lässt die Vermutung zu, dass evolutionär betrachtet, um durch genotypische Variation eine größere phänotypische Vielfalt generiert werden kann. Des Weiteren wurde von Thomas und anderen 2011 am Beispiel des *IGF2BP1*-Gens (engl. *insulin-like growth factor 2 RNA-binding protein 1 gene*) der Mechanismus der autosomalen *random* monoallelischen Expression näher untersucht (Thomas u. a. 2011). Die Autoren konnten zeigen, dass weder Histonmodifikationen noch DNA-Methylierungen ursächlich für die monoallelische Expression des *IGF2BP1*-Gens sind, sondern dass es einen Zusammenhang zwischen der Genexpression und der Bildung des Polymerase II-Komplexes gibt. Es war ihnen möglich zu zeigen, dass in den *IGF2BP1*-defizienten Zellen der Polymerase II-Komplex nicht am genomischen *IGF2BP1*-Bereich gebunden vorliegt. Sie schlussfolgerten daher, dass die mRNA-Abwesenheit durch einen nicht intakten Polymerase II-Initiationskomplex verursacht wird.

Das Phänomen der autosomalen *random* monoallelischen Expression gewinnt derzeit an wissenschaftlicher Aufmerksamkeit. Die ursächlichen Hintergründe, weshalb ein Allel aktiviert wird bzw. stillgelegt bleibt, sind bis auf wenige Beispiele weitgehend unklar. In unserem Projekt bleibt der Zusammenhang zwischen klonaler, bimodaler Expression von *CD177* und monoallelischer Expression zu klären. Dazu werden wir in nachfolgenden Analysen nach Unterschieden in Histonmodifikationen, DNA-Methylierungen und im RNA-Polymerase II-Komplex zwischen $mPR3^{\text{hoch}}/mCD177^{\text{positiven}}$ und $mPR3^{\text{niedrig}}/mCD177^{\text{negativen}}$ neutrophilen Granulozyten suchen. Wir werden mit der weiteren Bearbeitung der monoallelischen Expression von *CD177* beispielhaft unseren Beitrag zum Beantworten der globaleren Fragestellungen, welches Potential monoallelische Expression für zelluläre Diversität und evolutionäre Vorteile besitzt, leisten.

5. Zusammenfassung

Anti-Neutrophile Cytoplasmatische Antikörper (ANCA) finden sich bei Patienten mit systemischen nekrotisierenden Entzündungen kleiner Gefäße. Neben der Bedeutung für die Krankheitsdiagnostik, ist die Interaktion der ANCA mit den ANCA-Antigen tragenden neutrophilen Granulozyten und Monozyten von pathogenetischer Bedeutung. ANCA erkennen entweder Proteinase 3 (PR3) oder Myeloperoxidase (MPO). Intrazelluläres PR3 wird während Entzündungsprozessen auf die Zelloberfläche transloziert, wo es von im Blut zirkulierenden PR3-ANCA erkannt wird. Das Membran-PR3 (mPR3) Expressionsmuster ist bimodal, wobei Neutrophile mit niedriger und hoher mPR3 Expression unterschieden werden können. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Identifizierung eines Rezeptors, der eine hohe mPR3-Präsentation ermöglicht. Wir konnten Membran-CD177 (mCD177) als mPR3-Rezeptor identifizieren. mCD177 zeigte ein identisches bimodales Membranexpressionsmuster wie mPR3. Beide Moleküle werden auf derselben Population an neutrophilen Granulozyten präsentiert, wo sie colokalisieren und copräzipitieren. Transfektionsexperimente in HEK293 Zellen demonstrierten, dass mCD177 reifes PR3, nicht aber dessen Proformen, auf der Zellmembran präsentieren kann (von Vietinghoff, Tunnemann, Eulenberg u. a. 2007; von Vietinghoff, Eulenberg u. a. 2008). Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Charakterisierung der beiden distinkten neutrophilen Granulozytenpopulationen, der mPR3^{niedrig}/mCD177^{negativen} sowie der mPR3^{hoch}/mCD177^{positiven} Zellen. Analysiert wurden die Zellmorphologie, die Protein- und Genexpression von PR3 und CD177 in reifen neutrophilen Granulozyten aus dem Blut und in einem *in vitro* Zellmodell von neutrophil differenzierten CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen. Wir fanden, dass mPR3^{hoch}/mCD177^{positive} Zellen mRNA für PR3 und CD177 transkribieren und dass beide Proteine sowohl intrazellulär als auch membranständig nachgewiesen werden konnten. Hingegen konnte in mPR3^{niedrig}/mCD177^{negativen} Zellen nur mRNA und Protein für PR3 detektiert werden. Im letzten Teil der Arbeit wurde die genetische Regulation der *CD177*-Genexpression untersucht. Wir konnten ausschließen, dass die fehlende *CD177*-Genexpression durch eine Rekombination mit einem benachbarten Pseudogen, durch ein Antisense-Transkript oder durch offensichtliche Gendelektionsmechanismen erklärt werden kann. Wir bestimmten den Transkriptionsstart des *CD177*-Gens und führten Mutations- und SNP-Analysen durch. Sequenzierungen des *CD177*-Gens innerhalb der beiden Zellpopulationen auf genomischer Ebene im Bereich der proteinkodierenden Regionen und der Intron-Exon-Übergänge zeigten eine identische Sequenz. Interessanterweise fanden wir eine monoallelische Expression von *CD177*. Dabei wurde entweder das maternale oder das paternale Allel exprimiert. Weiterführende Untersuchungen sollen die Mechanismen der monoallelischen Expression charakterisieren und die Frage beantworten, warum zwei distinkte Populationen bezüglich der *CD177*-Expression existieren.

6. Literaturverzeichnis

Abdgawad, M u. a., 2006. Increased neutrophil membrane expression and plasma level of proteinase 3 in systemic vasculitis are not a consequence of the - 564 A/G promotor polymorphism. *Clinical and Experimental Immunology*, 145(1), S.63–70.

Agata, Y. u. a., 2007. Regulation of T cell receptor beta gene rearrangements and allelic exclusion by the helix-loop-helix protein, E47. *Immunity*, 27(6), S.871–884.

Albelda, S.M. u. a., 1990. EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule. *The Journal of cell biology*, 110(4), S.1227–1237.

Albelda, S.M. u. a., 1991. Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *The Journal of Cell Biology*, 114(5), S.1059–1068.

Arnhold, J. u. a., 2001. Redox properties of the couple compound I/native enzyme of myeloperoxidase and eosinophil peroxidase. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 268(19), S.5142–5148.

Bangalore, N. & Travis, J., 1994. Comparison of properties of membrane bound versus soluble forms of human leukocytic elastase and cathepsin G. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 375(10), S.659–666.

Bartlett, J.M.S. & Stirling, D., 2003. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 226, S.3–6.

Bartůnková, J. u. a., 1997. Autoimmunity to polymorphonuclears: functional consequences of the binding of antibodies to membrane and cytoplasmic target antigens of polymorphonuclear leukocytes. *Journal of clinical immunology*, 17(6), S.455–461.

Bauer, S. u. a., 2007. Proteinase 3 and CD177 are expressed on the plasma membrane of the same subset of neutrophils. *Journal of leukocyte biology*, 81(2), S.458–464.

Bergman, Y., 1999. Allelic exclusion in B and T lymphopoiesis. *Seminars in immunology*, 11(5), S.319–328.

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

- Bevilacqua, M.P. u. a., 1989. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science (New York, N.Y.)*, 243(4895), S.1160–1165.
- Biffl, W.L. u. a., 1996. Interleukin-6 delays neutrophil apoptosis. *Archives of Surgery (Chicago, Ill.: 1960)*, 131(1), S.24–29; discussion 29–30.
- Boggs, D.R., 1967. The kinetics of neutrophilic leukocytes in health and in disease. *Seminars in Hematology*, 4(4), S.359–386.
- Borgmann, S. & Haubitz, M., 2004. Genetic impact of pathogenesis and prognosis of ANCA-associated vasculitides. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 22(6 Suppl 36), S.S79–86.
- Bories, D. u. a., 1989. Down-regulation of a serine protease, myeloblastin, causes growth arrest and differentiation of promyelocytic leukemia cells. *Cell*, 59(6), S.959–968.
- Borregaard, N. & Cowland, J.B., 1997. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, 89(10), S.3503–3521.
- Bruehl, R.E. u. a., 1997. Leukocyte activation induces surface redistribution of P-selectin glycoprotein ligand-1. *Journal of Leukocyte Biology*, 61(4), S.489–499.
- Bruehl, R.E., Springer, T.A. & Bainton, D.F., 1996. Quantitation of L-selectin distribution on human leukocyte microvilli by immunogold labeling and electron microscopy. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 44(8), S.835–844.
- Burns, A.R. u. a., 1997. Neutrophil transendothelial migration is independent of tight junctions and occurs preferentially at tricellular corners. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 159(6), S.2893–2903.
- Calado, D.P. u. a., 2006. Stochastic monoallelic expression of IL-10 in T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177(8), S.5358–5364.
- Caruccio, L. u. a., 2004. CD177 polymorphisms: correlation between high-frequency single nucleotide polymorphisms and neutrophil surface protein expression. *Transfusion*, 44(1), S.77–82.
- Caruccio, L. u. a., 2006. The gene overexpressed in polycythemia rubra vera, PRV-1, and the gene encoding a neutrophil alloantigen, NB1, are alleles of a single gene, CD177, in chromosome band 19q13.31. *Transfusion*, 46(3), S.441–447.

Chalifour, A. u. a., 2004. Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood*, 104(6), S.1778–1783.

Chavakis, T. u. a., 2004. The junctional adhesion molecule-C promotes neutrophil transendothelial migration in vitro and in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(53), S.55602–55608.

Chess, A u. a., 1994. Allelic inactivation regulates olfactory receptor gene expression. *Cell*, 78(5), S.823–834.

Chess, Andrew, 2012. Mechanisms and consequences of widespread random monoallelic expression. *Nature reviews. Genetics*, 13(6), S.421–428.

Choi, M. u. a., 2010. The use of small molecule high-throughput screening to identify inhibitors of the proteinase 3-NB1 interaction. *Clinical and experimental immunology*, 161(2), S.389–396.

Chomczynski, P. & Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*, 162(1), S.156–159.

Chou, T.N. u. a., 2000. Parvovirus B19 infection associated with the production of anti-neutrophil cytoplasmic antibody (ANCA) and anticardiolipin antibody (aCL). *Lupus*, 9(7), S.551–554.

Chu, G., Vollrath, D. & Davis, R.W., 1986. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science (New York, N.Y.)*, 234(4783), S.1582–1585.

Claus, R. u. a., 2012. Quantitative DNA Methylation Analysis Identifies a Single CpG Dinucleotide Important for ZAP-70 Expression and Predictive of Prognosis in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of clinical oncology*, Published online before print May 7, 2012, doi: 10.1200/JCO.2011.39.3090

Corman, L.C. & Staud, R., 1995. Association of Wegener's granulomatosis with parvovirus B19 infection: comment on the concise communication by Nikkari et al. *Arthritis and Rheumatism*, 38(8), S.1174–1175.

Csernok, E. u. a., 1994. Activated neutrophils express proteinase 3 on their plasma membrane in vitro and in vivo. *Clinical and Experimental Immunology*, 95(2), S.244–250.

- Dangerfield, J. u. a., 2002. PECAM-1 (CD31) homophilic interaction up-regulates alpha6beta1 on transmigrated neutrophils in vivo and plays a functional role in the ability of alpha6 integrins to mediate leukocyte migration through the perivascular basement membrane. *The Journal of Experimental Medicine*, 196(9), S.1201–1211.
- David, A u. a., 2003. Interaction of proteinase 3 with CD11b/CD18 (beta2 integrin) on the cell membrane of human neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 74(4), S.551–557.
- Davies, D.J. u. a., 1982. Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology? *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*, 285(6342), S.606.
- Delclaux, C. u. a., 1996. Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 14(3), S.288–295.
- Demetri, G.D. & Griffin, J.D., 1991. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*, 78(11), S.2791–2808.
- Deutsch, M. u. a., 2004. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies penetrate into human polymorphonuclear leukocytes and modify their apoptosis. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 22(6 Suppl 36), S.S35–40.
- Diamond, M.S. u. a., 1991. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell*, 65(6), S.961–971.
- Diamond, M.S. u. a., 1990. ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *The Journal of Cell Biology*, 111(6 Pt 2), S.3129–3139.
- Edberg, J.C. u. a., 1991. Preferential expression of human Fc gamma RIIPMN (CD16) in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Discordant expression of glycosyl phosphatidylinositol-linked proteins. *The Journal of clinical investigation*, 87(1), S.58–67.
- Elzouki, A.N. u. a., 1994. Strong link between the alpha 1-antitrypsin PiZ allele and Wegener's granulomatosis. *Journal of Internal Medicine*, 236(5), S.543–548.
- Enders, G. u. a., 1995. Expression of adhesion molecules on human granulocytes after stimulation with *Helicobacter pylori* membrane proteins: comparison with membrane proteins from other bacteria. *Infection and Immunity*, 63(7), S.2473–2477.

- Escribano, S. u. a., 1998. Delayed neutrophil apoptosis after total body irradiation in mice. The role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in neutrophil function. *Experimental Hematology*, 26(10), S.942–949.
- Esnault, V.L., Audrain, M.A. & Sesboué, R., 1997. Alpha-1-antitrypsin phenotyping in ANCA-associated diseases: one of several arguments for protease/antiprotease imbalance in systemic vasculitis. *Experimental and Clinical Immunogenetics*, 14(3), S.206–213.
- Faghihi, M.A. & Wahlestedt, C., 2009. Regulatory roles of natural antisense transcripts. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(9), S.637–643.
- Falk, R J u. a., 1990. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(11), S.4115–4119.
- Falk, R J & Jennette, J C, 1997. ANCA small-vessel vasculitis. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 8(2), S.314–322.
- Falk, R J & Jennette, J C, 1988. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *The New England Journal of Medicine*, 318(25), S.1651–1657.
- Farrag, L. u. a., 2007. A study of conformational restraints on reactivity of human PR3-specific autoantibodies (ANCA) facilitated through protein folding manipulations of a new recombinant proteinase 3 protein. *Autoimmunity*, 40(7), S.503–511.
- Finkel, T.H. u. a., 1994. Chronic parvovirus B19 infection and systemic necrotising vasculitis: opportunistic infection or aetiological agent? *Lancet*, 343(8908), S.1255–1258.
- Finkelstein, J.D. u. a., 2007. Antiproteinase 3 antineutrophil cytoplasmic antibodies and disease activity in Wegener granulomatosis. *Annals of internal medicine*, 147(9), S.611–619.
- Fridlich, R., David, Alina & Aviram, Irit, 2006. Membrane proteinase 3 and its interactions within microdomains of neutrophil membranes. *Journal of cellular biochemistry*, 99(1), S.117–125.
- van der Geld, Y M u. a., 2000. Recombinant proteinase 3 produced in different expression systems: recognition by anti-PR3 antibodies. *Journal of immunological methods*, 244(1-2), S.117–131.

Geng, J.G. u. a., 1990. Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature*, 343(6260), S.757–760.

Gimelbrant, A. u. a., 2007. Widespread monoallelic expression on human autosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5853), S.1136–1140.

Girard, D., Paquin, R. & Beaulieu, A.D., 1997. Responsiveness of human neutrophils to interleukin-4: induction of cytoskeletal rearrangements, de novo protein synthesis and delay of apoptosis. *The Biochemical Journal*, 325 (Pt 1), S.147–153.

Godman, G. & Churg, J., 1954. Wegener's granulomatosis: pathology and review of the literature. *A.M.A. Archives of Pathology*, 58(6), S.533–553.

Goldmann, W.H., Niles, J L & Arnaout, M.A., 1999. Interaction of purified human proteinase 3 (PR3) with reconstituted lipid bilayers. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 261(1), S.155–162.

Goldschmeding, R. u. a., 1992. Further characterization of the NB 1 antigen as a variably expressed 56-62 kD GPI-linked glycoprotein of plasma membranes and specific granules of neutrophils. *British Journal of Haematology*, 81(3), S.336–345.

Goldschmeding, R. u. a., 1989. Wegener's granulomatosis autoantibodies identify a novel diisopropylfluorophosphate-binding protein in the lysosomes of normal human neutrophils. *The Journal of Clinical Investigation*, 84(5), S.1577–1587.

Gross, W.L., Csernok, E. & Flesch, B.K., 1993. „Classic“ anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies (cANCA), „Wegener“s autoantigen' and their immunopathogenic role in Wegener's granulomatosis. *Journal of Autoimmunity*, 6(2), S.171–184.

Gumina, R.J. u. a., 1996. The human PECAM1 gene maps to 17q23. *Genomics*, 34(2), S.229–232.

Halbwachs-Mecarelli, L. u. a., 1995. Bimodal distribution of proteinase 3 (PR3) surface expression reflects a constitutive heterogeneity in the polymorphonuclear neutrophil pool. *FEBS Letters*, 374(1), S.29–33.

Hampton, M.B., Kettle, A.J. & Winterbourn, C.C., 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*, 92(9), S.3007–3017.

Harper, L. u. a., 2001. Neutrophil priming and apoptosis in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated vasculitis. *Kidney International*, 59(5), S.1729–1738.

- Hermann, J. u. a., 2005. Clinical interpretation of antineutrophil cytoplasmic antibodies: parvovirus B19 infection as a pitfall. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64(4), S.641–643.
- Hewitt, S.L. u. a., 2009. RAG-1 and ATM coordinate monoallelic recombination and nuclear positioning of immunoglobulin loci. *Nature immunology*, 10(6), S.655–664.
- Hogan, S L u. a., 2001. Silica exposure in anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated glomerulonephritis and lupus nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 12(1), S.134–142.
- Jelinek, J. u. a., 2007. Epigenetic control of PRV-1 expression on neutrophils. *Experimental hematology*, 35(11), S.1677–1683.
- Jennette, J C u. a., 1994. Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis and Rheumatism*, 37(2), S.187–192.
- Jerke, U. u. a., 2011. Complement receptor Mac-1 is an adaptor for NB1 (CD177)-mediated PR3-ANCA neutrophil activation. *The Journal of biological chemistry*, 286(9), S.7070–7081.
- Johnsson, S., 1948. A case of Wegener's granulomatosis. *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica*, 25(5), S.573–584.
- Ju, X.-S. & Zenke, M., 2003. Differentiation of human antigen-presenting dendritic cells from CD34+ hematopoietic stem cells in vitro. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 215, S.399–407.
- Kain, R u. a., 1995. A novel class of autoantigens of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies in necrotizing and crescentic glomerulonephritis: the lysosomal membrane glycoprotein h-lamp-2 in neutrophil granulocytes and a related membrane protein in glomerular endothelial cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 181(2), S.585–597.
- Kain, Renate u. a., 2012. High Prevalence of Autoantibodies to hLAMP-2 in Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody-Associated Vasculitis. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 23(3), S.556–566.
- Kain, Renate u. a., 2008. Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis. *Nature Medicine*, 14(10), S.1088–1096.
- Kettritz, R u. a., 2001. Role of mitogen-activated protein kinases in activation of human neutrophils by antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 12(1), S.37–46.

- Kettritz, R, Jennette, J C & Falk, R J, 1997. Crosslinking of ANCA-antigens stimulates superoxide release by human neutrophils. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 8(3), S.386–394.
- Kettritz, R u. a., 1998. Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis of human neutrophils. *Kidney International*, 53(1), S.84–91.
- Kissel, K. u. a., 2002. Molecular basis of NB1 (HNA-2a, CD177) deficiency. *Blood*, 99(11), S.4231–4233.
- Kocher, M. u. a., 1998. Antineutrophil cytoplasmic antibodies preferentially engage Fc gammaRIIIb on human neutrophils. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 161(12), S.6909–6914.
- Kogut, M.H., Rothwell, L. & Kaiser, P., 2003. Differential regulation of cytokine gene expression by avian heterophils during receptor-mediated phagocytosis of opsonized and nonopsonized *Salmonella enteritidis*. *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 23(6), S.319–327.
- Korkmaz, B. u. a., 2008. A hydrophobic patch on proteinase 3, the target of autoantibodies in Wegener granulomatosis, mediates membrane binding via NB1 receptors. *The Journal of biological chemistry*, 283(51), S.35976–35982.
- Kralovics, R. u. a., 2003. Comparison of molecular markers in a cohort of patients with chronic myeloproliferative disorders. *Blood*, 102(5), S.1869–1871.
- Kubes, P. & Kanwar, S., 1994. Histamine induces leukocyte rolling in post-capillary venules. A P-selectin-mediated event. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 152(7), S.3570–3577.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), S.680–685.
- Lalezari, P., Murphy, G.B. & Allen, F.H., Jr, 1971. NB1, a new neutrophil-specific antigen involved in the pathogenesis of neonatal neutropenia. *The Journal of Clinical Investigation*, 50(5), S.1108–1115.
- Lapidot, M. & Pilpel, Y., 2006. Genome-wide natural antisense transcription: coupling its regulation to its different regulatory mechanisms. *EMBO reports*, 7(12), S.1216–1222.

Lehmann, H.W., von Landenberg, P. & Modrow, S., 2003. Parvovirus B19 infection and autoimmune disease. *Autoimmunity Reviews*, 2(4), S.218–223.

Lehrer, R.I. & Ganz, T., 1990. Antimicrobial polypeptides of human neutrophils. *Blood*, 76(11), S.2169–2181.

Lesavre, P. u. a., 1991. Antigen specificities and clinical distribution of ANCA in kidney diseases. *Klinische Wochenschrift*, 69(13), S.552–557.

Liao, F. u. a., 1995. Migration of monocytes across endothelium and passage through extracellular matrix involve separate molecular domains of PECAM-1. *The Journal of Experimental Medicine*, 182(5), S.1337–1343.

Liao, F. u. a., 1997. Soluble domain 1 of platelet-endothelial cell adhesion molecule (PECAM) is sufficient to block transendothelial migration in vitro and in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 185(7), S.1349–1357.

de Lind van Wijngaarden, R.A.F. u. a., 2008. Hypotheses on the etiology of antineutrophil cytoplasmic autoantibody associated vasculitis: the cause is hidden, but the result is known. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 3(1), S.237–252.

Liu, E. u. a., 2003. Discrimination of polycythemias and thrombocytoses by novel, simple, accurate clonality assays and comparison with PRV-1 expression and BFU-E response to erythropoietin. *Blood*, 101(8), S.3294–3301.

Locke, D.P. u. a., 2006. Linkage disequilibrium and heritability of copy-number polymorphisms within duplicated regions of the human genome. *American journal of human genetics*, 79(2), S.275–290.

Loh, E.Y. u. a., 1989. Polymerase chain reaction with single-sided specificity: analysis of T cell receptor delta chain. *Science (New York, N.Y.)*, 243(4888), S.217–220.

Lomvardas, S. u. a., 2006. Interchromosomal interactions and olfactory receptor choice. *Cell*, 126(2), S.403–413.

Lou, O. u. a., 2007. CD99 is a key mediator of the transendothelial migration of neutrophils. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 178(2), S.1136–1143.

Lu, X. u. a., 2006. Mediation of endothelial cell damage by serine proteases, but not superoxide, released from antineutrophil cytoplasmic antibody-stimulated neutrophils. *Arthritis and Rheumatism*, 54(5), S.1619–1628.

- Martins, P.S. u. a., 2003. Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. *Shock* (Augusta, Ga.), 20(3), S.208–212.
- Moosig, F. u. a., 2000. Opsonization of apoptotic neutrophils by anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) leads to enhanced uptake by macrophages and increased release of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha). *Clinical and Experimental Immunology*, 122(3), S.499–503.
- Muller, W A u. a., 1989. A human endothelial cell-restricted, externally disposed plasmalemmal protein enriched in intercellular junctions. *The Journal of experimental medicine*, 170(2), S.399–414.
- Muller, W A, 1995. The role of PECAM-1 (CD31) in leukocyte emigration: studies in vitro and in vivo. *Journal of Leukocyte Biology*, 57(4), S.523–528.
- Muller, W. u. a., 1993. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 178(2), S.449–460.
- Muller, W., 1995. The use of anti-PECAM reagents in the control of inflammation. *Agents and Actions. Supplements*, 46, S.147–157.
- Muller, William A, 2002. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 82(5), S.521–533.
- Mullis, K.B., 1990a. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Annales de biologie clinique*, 48(8), S.579–582.
- Mullis, K.B., 1990b. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*, 262(4), S.56–61, 64–65.
- Newman, P J u. a., 1990. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* (New York, N.Y.), 247(4947), S.1219–1222.
- Nikkari, S. u. a., 1994. Wegener's granulomatosis and parvovirus B19 infection. *Arthritis and Rheumatism*, 37(11), S.1707–1708.
- Ohlsson, K. & Olsson, I., 1973. The neutral proteases of human granulocytes. Isolation and partial characterization of two granulocyte collagenases. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 36(2), S.473–481.

Pendergraft, W.F., 3rd u. a., 2004. Autoimmunity is triggered by cPR-3(105-201), a protein complementary to human autoantigen proteinase-3. *Nature Medicine*, 10(1), S.72–79.

Pfaffl, M.W., 2004. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum*, (10), S.92–95.

Pfister, H. u. a., 2004. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies against the murine homolog of proteinase 3 (Wegener autoantigen) are pathogenic in vivo. *Blood*, 104(5), S.1411–1418.

Porges, A.J. u. a., 1994. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies engage and activate human neutrophils via Fc gamma RIla. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 153(3), S.1271–1280.

Rada, C. & Ferguson-Smith, A.C., 2002. Epigenetics: monoallelic expression in the immune system. *Current biology: CB*, 12(3), S.R108–110.

Rao, N.V. u. a., 1991. Characterization of proteinase-3 (PR-3), a neutrophil serine proteinase. Structural and functional properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(15), S.9540–9548.

Rarok, A.A. u. a., 2002. Neutrophil membrane expression of proteinase 3 (PR3) is related to relapse in PR3-ANCA-associated vasculitis. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 13(9), S.2232–2238.

Rarok, A.A. u. a., 2003. Recombinant protein to analyze autoantibodies to proteinase 3 in systemic vasculitis. *American journal of clinical pathology*, 120(4), S.586–595.

Redon, R. u. a., 2006. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*, 444(7118), S.444–454.

Rosti, V., 2000. The molecular basis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica*, 85(1), S.82–87.

Roth, A.J. u. a., 2012. Anti-LAMP-2 antibodies are not prevalent in patients with antineutrophil cytoplasmic autoantibody glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 23(3), S.545–555.

Russell, K.A., Fass, D.N. & Specks, U, 2001. Antineutrophil cytoplasmic antibodies reacting with the pro form of proteinase 3 and disease activity in patients with Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis. *Arthritis and rheumatism*, 44(2), S.463–468.

Sachs, U.J.H. u. a., 2006. Antibody-induced neutrophil activation as a trigger for transfusion-related acute lung injury in an ex vivo rat lung model. *Blood*, 107(3), S.1217–1219.

Sachs, U.J.H. u. a., 2007. The neutrophil-specific antigen CD177 is a counter-receptor for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *The Journal of biological chemistry*, 282(32), S.23603–23612.

Sakamoto, E. u. a., 2005. Type I and type II interferons delay human neutrophil apoptosis via activation of STAT3 and up-regulation of cellular inhibitor of apoptosis 2. *Journal of Leukocyte Biology*, 78(1), S.301–309.

Saleh, A. u. a., 2004. Identification of probabilistic transcriptional switches in the Ly49 gene cluster: a eukaryotic mechanism for selective gene activation. *Immunity*, 21(1), S.55–66.

Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), S.5463–5467.

Savage, C.O., Harper, L. & Adu, D., 1997. Primary systemic vasculitis. *Lancet*, 349(9051), S.553–558.

Savige, J.A. u. a., 1998. A review of immunofluorescent patterns associated with antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) and their differentiation from other antibodies. *Journal of Clinical Pathology*, 51(8), S.568–575.

Savill, J.S. u. a., 1989. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *The Journal of Clinical Investigation*, 83(3), S.865–875.

Schenkel, A.R. u. a., 2002. CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nature Immunology*, 3(2), S.143–150.

Schlieben, D.J. u. a., 2005. Pulmonary-renal syndrome in a newborn with placental transmission of ANCA. *American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation*, 45(4), S.758–761.

Schreiber, Adrian u. a., 2003. Membrane expression of proteinase 3 is genetically determined. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 14(1), S.68–75.

- Schreiber, Adrian u. a., 2005. Membrane proteinase 3 expression in patients with Wegener's granulomatosis and in human hematopoietic stem cell-derived neutrophils. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 16(7), S.2216–2224.
- Schreiber, Adrian, Luft, Friedrich C & Kettritz, Ralph, 2004. Membrane proteinase 3 expression and ANCA-induced neutrophil activation. *Kidney International*, 65(6), S.2172–2183.
- Schreiber, Adrian u. a., 2006. Bone marrow-derived cells are sufficient and necessary targets to mediate glomerulonephritis and vasculitis induced by anti-myeloperoxidase antibodies. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 17(12), S.3355–3364.
- Schreiber, Adrian u. a., 2009. C5a receptor mediates neutrophil activation and ANCA-induced glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 20(2), S.289–298.
- Scocchi, M. u. a., 1992. Proteolytic cleavage by neutrophil elastase converts inactive storage proforms to antibacterial bacterenecins. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 209(2), S.589–595.
- Serra, S. & Morgante, L., 1980. [Method of determination of proteins with Coomassie brilliant blue G 250. I. General characteristics and comparative analysis with the biuret method and Lowry's method]. *Bollettino della Società italiana di biologia sperimentale*, 56(2), S.160–165.
- Specks, U u. a., 1996. Recombinant human proteinase 3, the Wegener's autoantigen, expressed in HMC-1 cells is enzymatically active and recognized by c-ANCA. *FEBS letters*, 390(3), S.265–270.
- Stankiewicz, P. & Lupski, J.R., 2002. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. *Trends in genetics: TIG*, 18(2), S.74–82.
- Stegmaier, M. u. a., 1997. The E-selectin-ligand ESL-1 is located in the Golgi as well as on microvilli on the cell surface. *Journal of Cell Science*, 110 (Pt 6), S.687–694.
- Stegeman, C A u. a., 1994. Association of chronic nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and higher relapse rates in Wegener granulomatosis. *Annals of Internal Medicine*, 120(1), S.12–17.
- Stegeman, C A u. a., 1996. Trimethoprim-sulfamethoxazole (co-trimoxazole) for the prevention of relapses of Wegener's granulomatosis. Dutch Co-Trimoxazole Wegener Study Group. *The New England Journal of Medicine*, 335(1), S.16–20.

- Stockinger, H. u. a., 1990. Molecular characterization and functional analysis of the leukocyte surface protein CD31. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 145(11), S.3889–3897.
- Strauch, U.G. u. a., 1994. Distinct binding specificities of integrins alpha 4 beta 7 (LPAM-1), alpha 4 beta 1 (VLA-4), and alpha IEL beta 7. *International Immunology*, 6(2), S.263–275.
- Stroncek, D.F. u. a., 1998. Expression of neutrophil antigens after 10 days of granulocyte-colony-stimulating factor. *Transfusion*, 38(7), S.663–668.
- Stroncek, D.F., Skubitz, K.M. & McCullough, J.J., 1990. Biochemical characterization of the neutrophil-specific antigen NB1. *Blood*, 75(3), S.744–755.
- Sun, J. u. a., 1998. A proportion of proteinase 3 (PR3)-specific anti-neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) only react with PR3 after cleavage of its N-terminal activation dipeptide. *Clinical and experimental immunology*, 114(2), S.320–326.
- Temerinac, S. u. a., 2000. Cloning of PRV-1, a novel member of the uPAR receptor superfamily, which is overexpressed in polycythemia rubra vera. *Blood*, 95(8), S.2569–2576.
- Teofili, L. u. a., 2002. Overexpression of the polycythemia rubra vera-1 gene in essential thrombocythemia. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 20(20), S.4249–4254.
- Thomas, B.J. u. a., 2011. Allele-specific transcriptional elongation regulates monoallelic expression of the IGF2BP1 gene. *Epigenetics & chromatin*, 4, S.14.
- Trimarchi, M. u. a., 2003. Sinonasal osteocartilaginous necrosis in cocaine abusers: experience in 25 patients. *American Journal of Rhinology*, 17(1), S.33–43.
- Vaporciyan, A.A. u. a., 1993. Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, 262(5139), S.1580–1582.
- Varki, A. u. a., 2009. *Essentials of glycobiology*, 2nd edition, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Vestweber, D. & Blanks, J.E., 1999. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiological Reviews*, 79(1), S.181–213.
- von Vietinghoff, S u. a., 2008. Neutrophil surface presentation of the anti-neutrophil cytoplasmic antibody-antigen proteinase 3 depends on N-terminal processing. *Clinical and Experimental Immunology*, 152(3), S.508–516.

- von Vietinghoff, Sibylle u. a., 2006. Major histocompatibility complex HLA region largely explains the genetic variance exercised on neutrophil membrane proteinase 3 expression. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 17(11), S.3185–3191.
- von Vietinghoff, Sibylle u. a., 2007. NB1 mediates surface expression of the ANCA antigen proteinase 3 on human neutrophils. *Blood*, 109(10), S.4487–4493.
- Wang, Q. & Doerschuk, C.M., 2001. The p38 mitogen-activated protein kinase mediates cytoskeletal remodeling in pulmonary microvascular endothelial cells upon intracellular adhesion molecule-1 ligation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 166(11), S.6877–6884.
- Wang, S. u. a., 2005. PECAM-1, alpha6 integrins and neutrophil elastase cooperate in mediating neutrophil transmigration. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 9), S.2067–2076.
- Wegener, F., 1936. Über generalisierte septische Gefäßerkrankungen. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie*, 29, S.202–210.
- Witko-Sarsat, V., Lesavre, P., u. a., 1999. A large subset of neutrophils expressing membrane proteinase 3 is a risk factor for vasculitis and rheumatoid arthritis. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 10(6), S.1224–1233.
- Witko-Sarsat, V. u. a., 1996. Characterization of a recombinant proteinase 3, the autoantigen in Wegener's granulomatosis and its reactivity with anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. *FEBS letters*, 382(1-2), S.130–136.
- Witko-Sarsat, V., Cramer, E.M., u. a., 1999. Presence of proteinase 3 in secretory vesicles: evidence of a novel, highly mobilizable intracellular pool distinct from azurophil granules. *Blood*, 94(7), S.2487–2496.
- Wolff, J. u. a., 2003. Lack of NB1 GP (CD177/HNA-2a) gene transcription in NB1 GP-neutrophils from NB1 GP-expressing individuals and association of low expression with NB1 gene polymorphisms. *Blood*, 102(2), S.731–733.
- van der Woude, F.J. u. a., 1985. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet*, 1(8426), S.425–429.
- Xiao, H. u. a., 2002. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(7), S.955–963.

Xiao, H. u. a., 2005. The role of neutrophils in the induction of glomerulonephritis by anti-myeloperoxidase antibodies. *The American Journal of Pathology*, 167(1), S.39–45.

Yamamoto, C. u. a., 1993. Lipopolysaccharide and granulocyte colony-stimulating factor delay neutrophil apoptosis and ingestion by guinea pig macrophages. *Infection and Immunity*, 61(5), S.1972–1979.

Yan, H.C. u. a., 1995. Localization of multiple functional domains on human PECAM-1 (CD31) by monoclonal antibody epitope mapping. *Cell Adhesion and Communication*, 3(1), S.45–66.

Yang, L. u. a., 2005. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood*, 106(2), S.584–592.

Yasui, K. u. a., 2002. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor delays neutrophil apoptosis and primes its function through Ia-type phosphoinositide 3-kinase. *Journal of Leukocyte Biology*, 72(5), S.1020–1026.

Yelin, R. u. a., 2003. Widespread occurrence of antisense transcription in the human genome. *Nature biotechnology*, 21(4), S.379–386.

Yu, F. u. a., 2007. Clinical and pathological features of renal involvement in propylthiouracil-associated ANCA-positive vasculitis. *American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation*, 49(5), S.607–614.

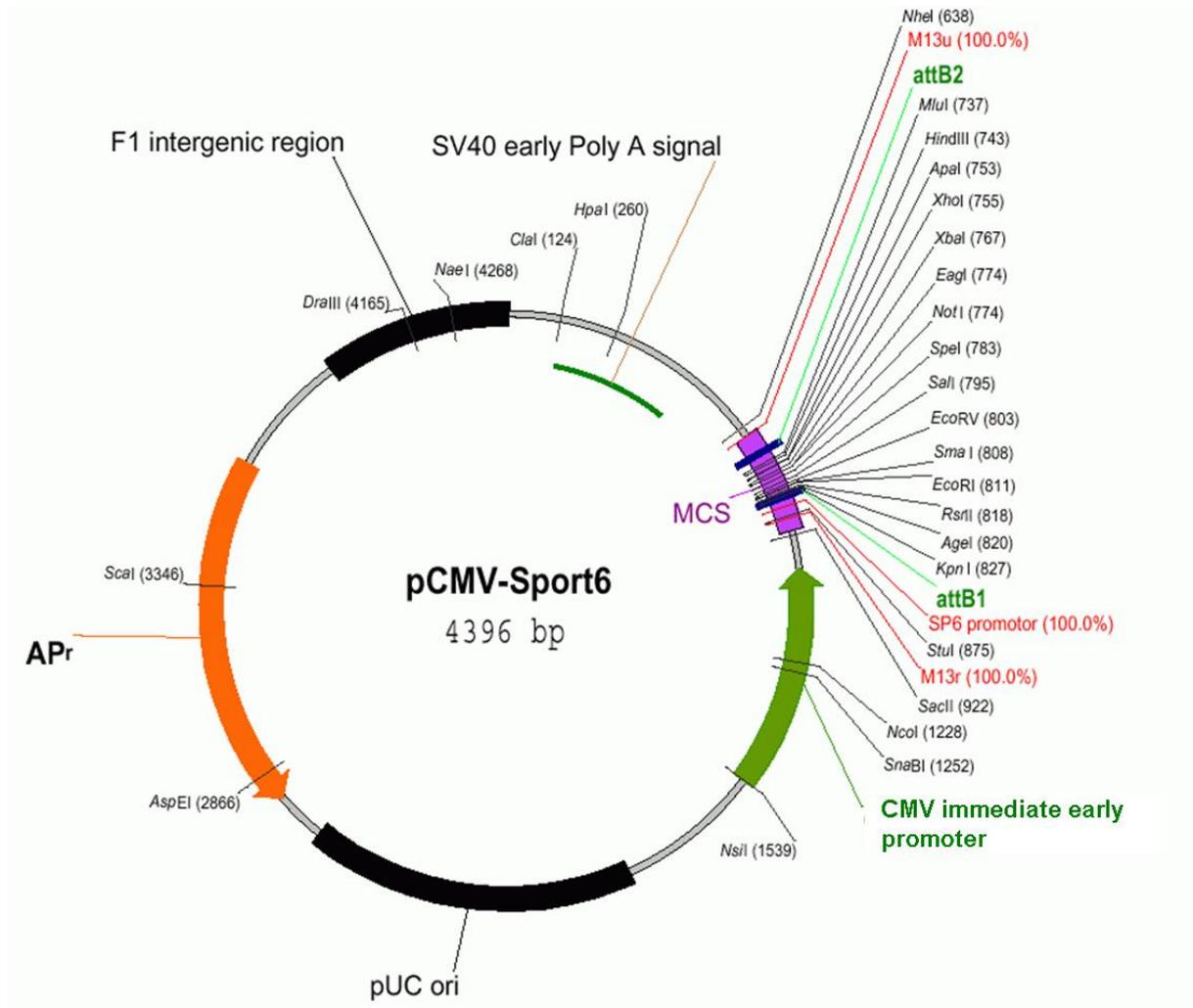
Zen, K. u. a., 2004. JAM-C is a component of desmosomes and a ligand for CD11b/CD18-mediated neutrophil transepithelial migration. *Molecular Biology of the Cell*, 15(8), S.3926–3937.

Zwemer, L.M. u. a., 2012. Autosomal monoallelic expression in the mouse. *Genome biology*, 13(2), S.R10.

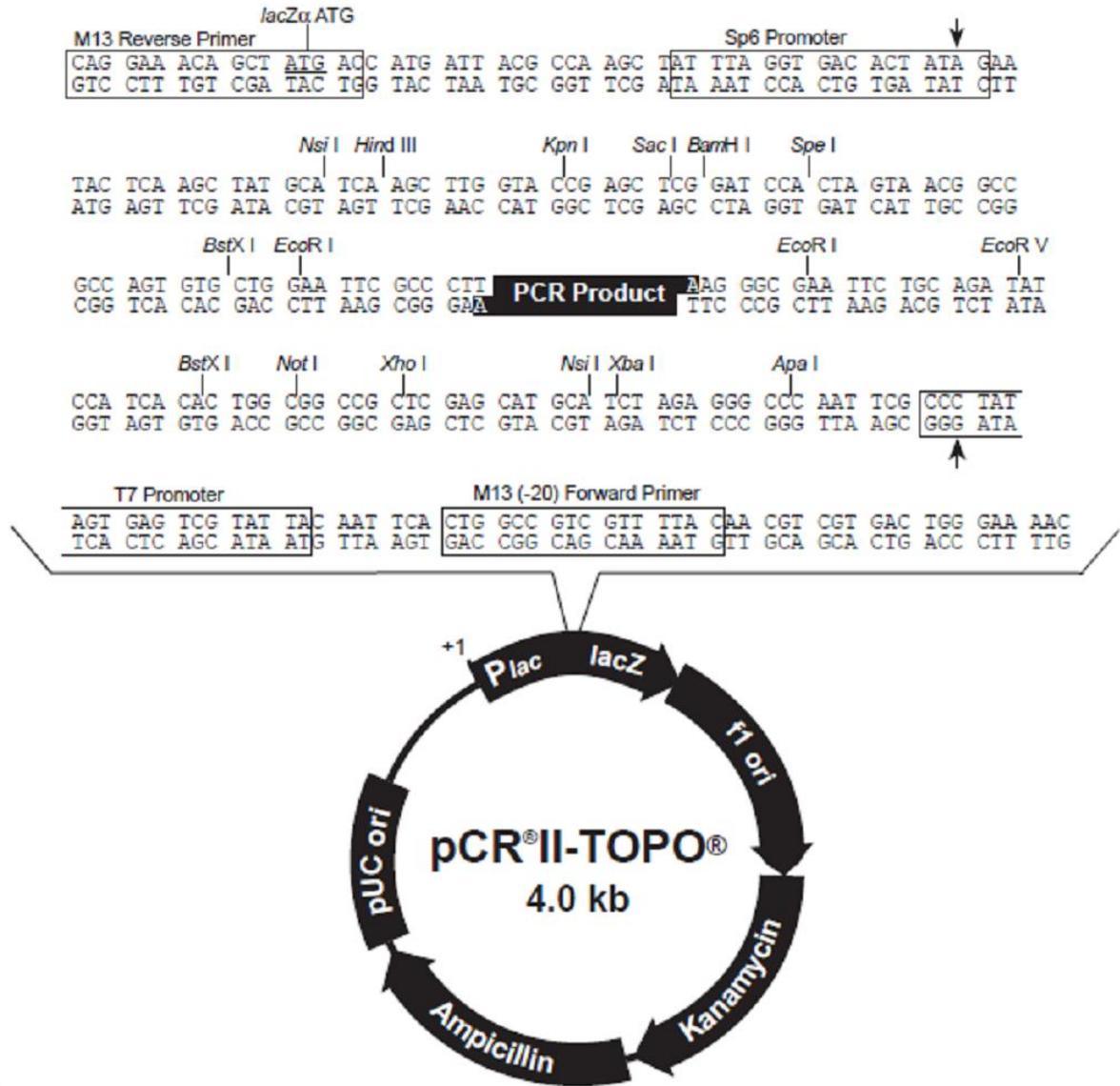
7. Anhang

7.1. Vektorkarten

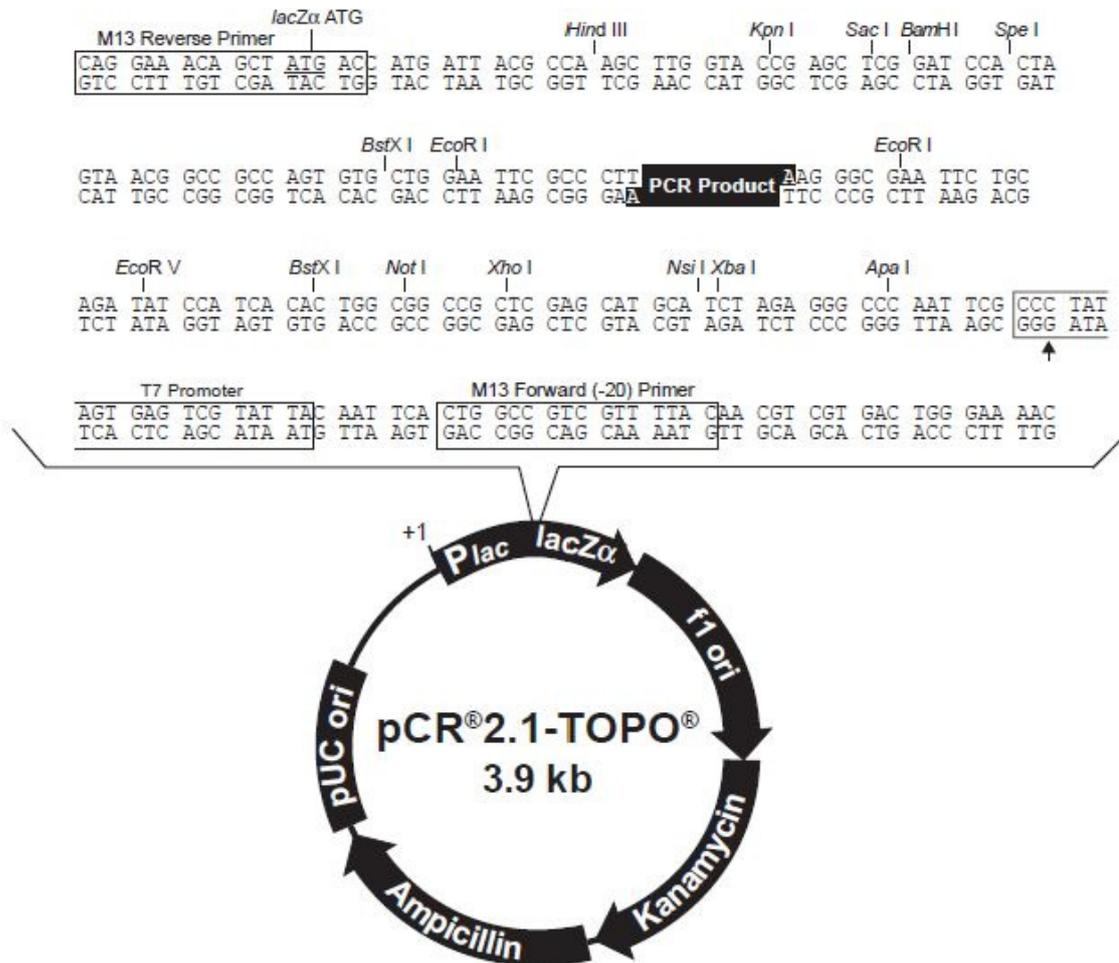
7.1.1. pCMV-Sport 6-Vektor (von Invitrogen, Karlsruhe, DE)



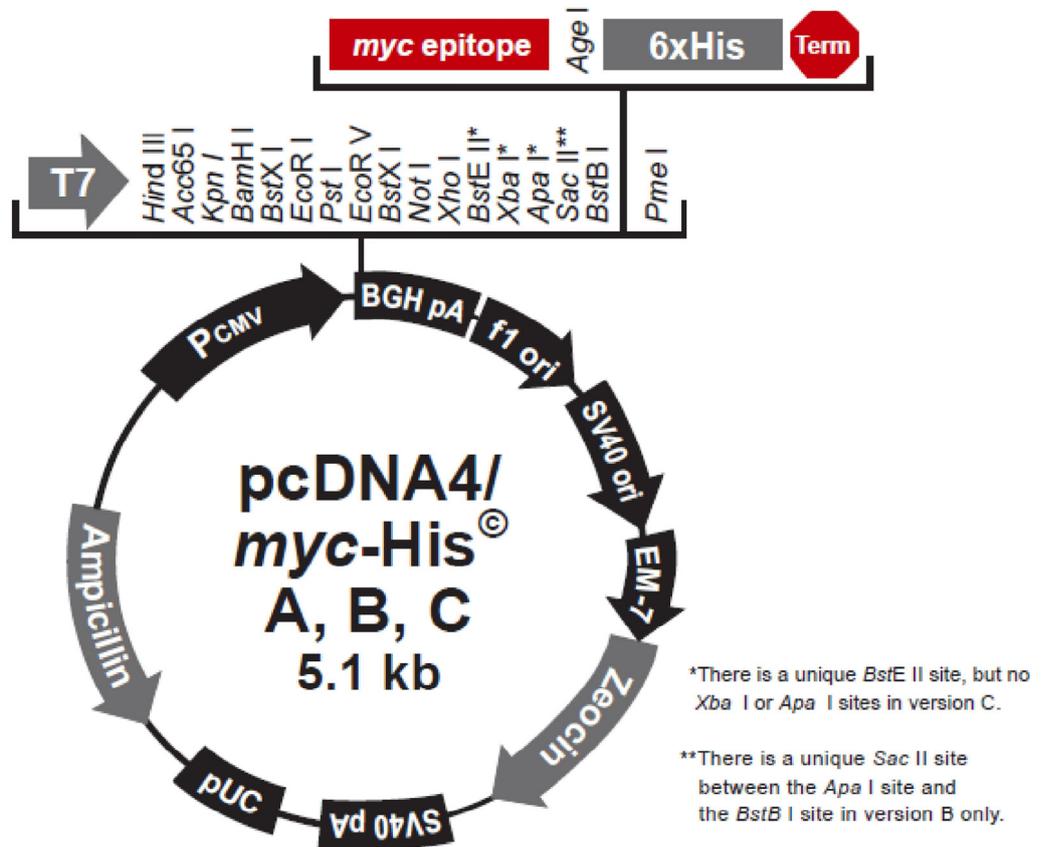
7.1.2. pCR II-TOPO-Vektor (Invitrogen, Karlsruhe, DE)



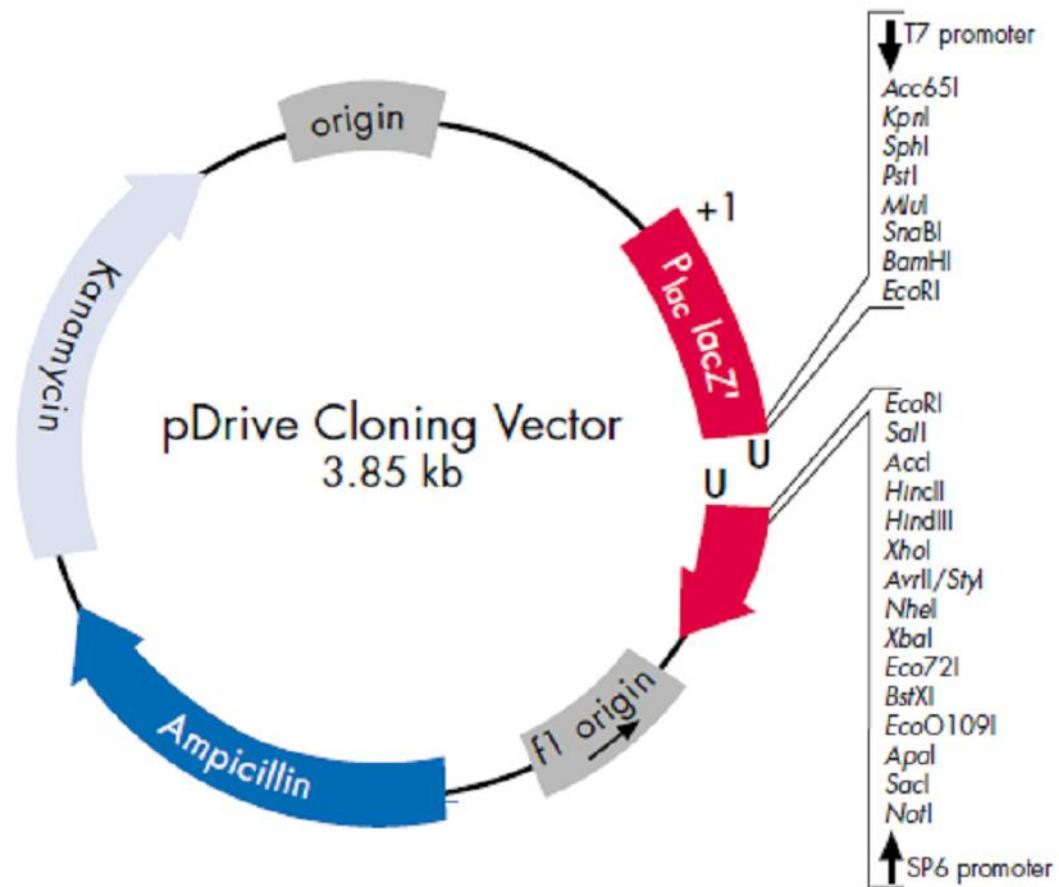
7.1.3. pCR 2.1-TOPO-Vektor



7.1.4. pcDNA4-Vektor Frame B und C



7.1.5. pDrive



7.2. Oligonukleotide

Tabelle 9: Primer für die 5' RACE an neutrophilen Granulozyten

Name:	5'-3' Sequenz:
5' RACE Abridged Anchor Primer	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGIIGGGIIG
Abridged Universal Amplification Primer (AUAP)	GGCCACGCGTCGACTAGTAC
Universal Amplification Primer (UAP)	CUACUACUACUAGGCCACGCGTCGACTAGTAC
5' RACE CD177-102R	CACTCCTGGCAGTGGGAGGATGAA
5' RACE CD177-265R	CCTTGGAGAGCACCAGGCTCACTT
5' RACE CD177-616R	GTGTCCCATTGAGCAGGTTGCAAAC

Tabelle 10: Primer für die Klonierung von *CD177* und *PR3* in Vektoren und anschließender Sequenzierung der Plasmide sowie der mRNA

Name:	5'-3' Sequenz:	T _m [°C]:
CD177-For	GGGTCATGAGCGCGGTATTAC	66
CD177-Rev	ATAGAGTTAGCAGGAAGGGCAAAC	70
PR3-For	CATGGCTCACCGGCCCCAGC	78
PR3-Rev	GGCGGTTCAGGGGCGGCCCTTG	78
M13-For	GTA AACGACGGCCAG	50
M13-Rev	CAGGAAACAGCTATGAC	50
T7-For	TAATACGACTGACTATAGGG	56
BGH-Rev	TAGAAGGCACAGTCGAGG	56
CD177-Ex2-Rev	GGCAGGTCGGACACCTT	60
CD177-Ex6-For	CACACGGAACTTGGCTCAAGAAC	72
CD177-Ex7-Rev	GGAGGGGCTGAGTGGATGGTGG	74
CD177-Ex8-For	GGGCGCCACTCATTGTTATG	62

Tabelle 11: Primer für die Quantifizierung von Genexpressionen mittels der quantitative Real-Time-PCR

Name:	5'-3' Sequenz:	T _m [°C]:
human CD177-For	TTGATGCTCATTGAGAGCGG	60
human CD177-Rev	GCCTCCGTGCAGCCCT	56
human CD177-Sonde	FAM-CCCCAAGTGAGCCTGGTGCTCTCC-TAMRA	80
human PR3-For	TGTCACCGTGGTCACCTTCTT	64

human PR3-Rev	CCCCAGATCACGAAGGAGTCTAT	70
human PR3-Sonde	FAM-TTGCACCTTCGTCCCTCGCCG-TAMRA	68
human 18S-For	ACATCCAAGGAAGGCAGCAG	62
human 18-Rev	TTTTCGTCACTACCTCCCCG	62
human18S-Sonde	FAM-CGCGCAAATTACCCACTCCCGAC	74

Tabelle 12: Primer für die Amplifizierung und Sequenzierung der *CD177*-Sonden für die Southern Blot-Analysen

Name:	5'-3' Sequenz:	T _m [°C]:
CD177-Exon 4/5-For	CCACATCCAGATCCCATGAT	60
CD177-Exon 4/5-Rev	GCAACCAGTCACTCTCAGCA	62
CD177-Exon 9-For	GGCTGGGCTGTACTCTGTGT	64
CD177-Exon 9-Rev	AGCCTCCTGTTTGTGCTAGG	62

Tabelle 13: Primer für die Amplifizierung und Sequenzierung der genomischen DNA von *CD177*

Name:	5'-3' Sequenz:	T _m [°C]:
CD177-48549628-F	GCTGGCTGCTTAAGGGCTGGTATAA	76
CD177-48562738-R	CATCCTGTACGGGGAAATCAGACTTG	78
CD177-48557016-F	GATCAGGGCATTACCCCTCT	62
CD177-48558044-R	GTACAGCCCAGCCAAGTTGTAA	66
CD177-48549665-F	CTGCTGAAAAGCAGAAAGAGA	62
CD177-48550277-R	ATCCGGTGCTCAGTGACG	58
CD177-48550156-F	AGGCCTGACCTCCATCCT	58
CD177-48550853-R	CTGTGTTTACAAGCTGTTCCA	62
CD177-48551327-F	AACTCCTGACCTCGTGATCC	62
CD177-48552018-R	GCATCCCTGGACTCTCAG	62
CD177-48551920-F	CTCTGAGGGTTGGGTGGTC	62
CD177-48552610-R	CCACCATGGCTTCCTGTT	56
CD177-48556090-F	TGGGATTTGACTCCCAAGT	60
CD177-48556783-R	TGTTTGTTCCTGTTTCTCAAGG	64
CD177-48556669-F	TCAGTGGCTTCATACATTCTGG	64
CD177-48557360-R	GTGTCTGGGCCTCATTCTC	62
CD177-48557258-F	CCTCGGACCTGTGCAATAGT	62
CD177-48557966-R	AGCTCCAGCTCCTCAGACC	62
CD177-48557801-F	ACTCCTGGTCTGAGGGAGGA	64
CD177-48558516-R	CCTCTCCCATAGGGCAAGTC	64

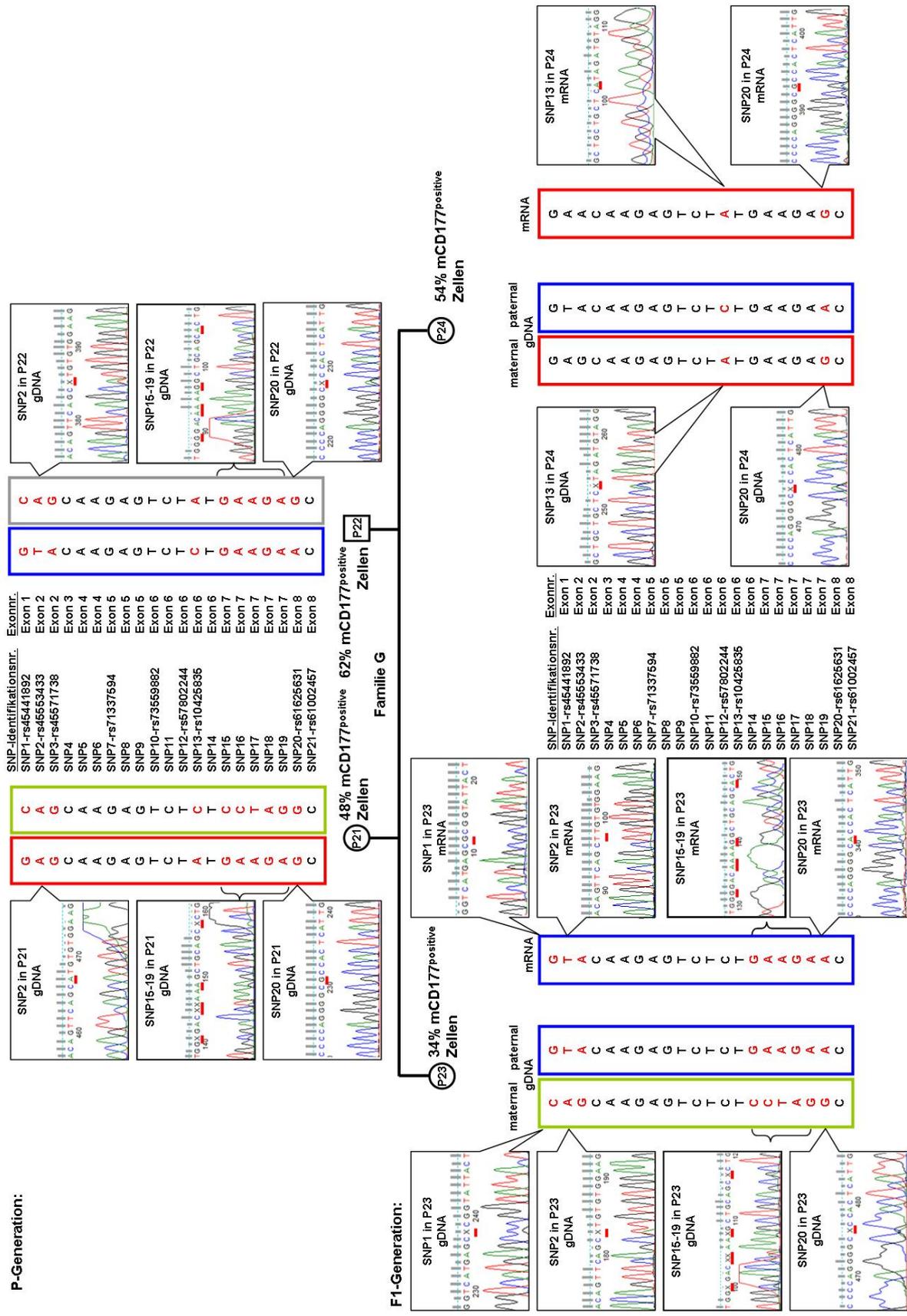
7.3. Übersicht der analysierten SNPs der SNP-Analyse

Tabelle 14:

SNP-Nr.:	SNP-Identifikationsnr. (dbSNP):	Exonlokalisierung im <i>CD177</i> -Gen:	genomische Position (hg19):
SNP1	rs45441892	Exon 1	Chr.19: 43857873-43857873
SNP2	rs45553433	Exon 2	Chr.19: 43858044-43858044
SNP3	rs45571738	Exon 2	Chr.19: 43858066-43858066
SNP4	nicht vorhanden	Exon 3	Chr.19: 43858510-43858510
SNP5	nicht vorhanden	Exon 4	Chr.19: 43859853-43859853
SNP6	nicht vorhanden	Exon 4	Chr.19: 43859879-43859879
SNP7	rs71337594	Exon 5	Chr.19: 43860192-43860192
SNP8	nicht vorhanden	Exon 5	Chr.19: 43860251-43860251
SNP9	nicht vorhanden	Exon 5	Chr.19: 43860255-43860255
SNP10	rs73559882	Exon 6	Chr.19: 43864419-43864419
SNP11	nicht vorhanden	Exon 6	Chr.19: 43864422-43864422
SNP12	rs57802244	Exon 6	Chr.19: 43864507-43864507
SNP13	rs10425835	Exon 6	Chr.19: 43864548-43864548
SNP14	nicht vorhanden	Exon 6	Chr.19: 43864553-43864553
SNP15	nicht vorhanden	Exon 7	Chr.19: 43865316-43865316
SNP16	nicht vorhanden	Exon 7	Chr.19: 43865320-43865320
SNP17	nicht vorhanden	Exon 7	Chr.19: 43865321-43865321
SNP18	nicht vorhanden	Exon 7	Chr.19: 43865324-43865324
SNP19	nicht vorhanden	Exon 7	Chr.19: 43865333-43865333
SNP20	rs61625631	Exon 8	Chr.19: 43865692-43865692
SNP21	rs61002457	Exon 8	Chr.19: 43865722-43865722

7.4. Haplotypenanalyse am CD177-Locus der Familie G (Abb. 46)

Der Aufbau der Grafik wurde wie in der Abbildung Nummer 41 übernommen.



8. Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Bakterienstämme (Derivate von <i>E.coli</i>)	37
Tabelle 2: Antikörper	37-38
Tabelle 3: Chemikalien, Reagenzien und Medien	38-40
Tabelle 4: Enzyme und Kits	40
Tabelle 5: Geräte und Laborhilfsmittel	41
Tabelle 6: Plasmidvektoren	41
Tabelle 7: Software / Internetseiten	42
Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien	42-43
Tabelle 9: Primer für die 5' <i>RACE</i> an neutrophilen Granulozyten	163
Tabelle 10: Primer für die Klonierung von <i>CD177</i> und <i>PR3</i> in Vektoren und anschließender Sequenzierung der Plasmide sowie der mRNA	163
Tabelle 11: Primer für die Quantifizierung von Genexpressionen mittels der quantitative Real-Time-PCR	163-164
Tabelle 12: Primer für die Amplifizierung und Sequenzierung der <i>CD177</i> -Sonden für die Southern Blot-Analysen	164
Tabelle 13: Primer für die Amplifizierung und Sequenzierung der genomischen DNA von <i>CD177</i>	164
Tabelle 14: allgemeiner PCR-Ansatz	47-48
Tabelle 15: allgemeine PCR-Bedingungen	48
Tabelle 16: Sequenzierungsansatz	52
Tabelle 17: Sequenzierungs-PCR	52
Tabelle 18: <i>dC-tailed</i> cDNA-PCR Ansatz	57
Tabelle 19: <i>dC-tailed</i> cDNA-PCR Bedingungen	57
Tabelle 20: Nested-Amplifizierung der „ <i>dC-tailed</i> cDNA-PCR“ Ansatz	57
Tabelle 21: Nested-Amplifizierung der „ <i>dC-tailed</i> cDNA-PCR“ Bedingungen	57
Tabelle 22: Quantitative Real-Time-PCR Ansatz	60
Tabelle 23: Quantitative Real-Time-PCR Bedingungen	61
Tabelle24: Übersicht der analysierten SNPs der SNP-Analyse	165

Tabelle 25:	SNP-Übersicht von maternal exprimierten <i>CD177</i> -Allelen	122-123
Tabelle 26:	SNP-Übersicht von paternal exprimierten <i>CD177</i> -Allelen	123-124
Tabelle 27:	SNP-Übersicht von parental unbekannt exprimierten <i>CD177</i> -Allelen	124-125

9. Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1: Immunfluoreszenzmuster von c- und p-ANCA	15
Abb. 2: Beispiele für klinische Manifestationen der ANCA-assoziierten Vaskulitiden	16
Abb. 3: Schematische Darstellung eines Nierenquerschnittes, einem Nephron und einem Glomerulus	18
Abb. 4: Darstellung der Extravasation von Leukozyten	20
Abb. 5: Bimodalen Expression von mPR3	26
Abb. 6: Prozentsätze der mPR3 exprimierenden neutrophilen Granulozyten in eineiigen und zweieiigen Zwillingen	28
Abb. 7: Vergleich der Prozentsätze an mPR3 von Geschwisterpärchen	29
Abb. 8: Vergleich der gemessenen mit den vorhergesagten mPR3-Prozentsätzen von Patienten und Kontrollpersonen	29
Abb. 9: Graphische Darstellung 5' RACE-Methode	55
Abb. 10: Sequenzen und Restriktionsschnittstellen der 5' RACE-Primer	55
Abb. 11: Phasentrennung nach der Dichtegradientenzentrifugation	71
Abb. 12: Durchflusszytometrische Messung von mCD177 und mPR3, CD16 oder CD66b auf neutrophilen Granulozyten	78
Abb. 13: Durchflusszytometrische Messung von mCD177 in mPR3 ^{positiv} und mPR3 ^{negativ} sortierten neutrophilen Granulozyten	79
Abb. 14: Western Blot-Analyse für PR3 und CD177 an sortierten Zellen	80
Abb. 15: Schematische Darstellung der drei PR3-Konstrukte	81
Abb. 16: Genexpressionsanalyse der CD177- und PR3-mRNA an transient transfizierten HEK293 Zellen	82
Abb. 17: Western Blot-Analyse für CD177 und PR3 in transient transfizierten HEK293 Zellen	83
Abb. 18: Durchflusszytometrische Analyse für mCD177 und mPR3 auf transient transfizierten HEK293 Zellen	84
Abb. 19: Zusammenfassung der durchflusszytometrische Analyse in transient transfizierten HEK293 Zellen	85
Abb. 20: Durchflusszytometrische Messung des Oberflächenmarkers mCD177	87

Abb. 21:	Giensa-Färbung der mCD177 ^{negativen} Zellen im Vergleich zu den mCD177 ^{positiven} Zellen	88
Abb. 22:	Western Blot-Analyse für CD177 und PR3 an den zwei sortierten Zellpopulationen	89
Abb. 23:	Genexpressionsanalyse der CD177- und PR3-mRNA an unsortierten und sortierten neutrophilen Granulozyten	90
Abb. 24:	Untersuchung der CD177-mRNA auf Trunkierung	91
Abb. 25:	Durchflusszytometrische Analyse von mCD177 und mPR3 sowie von CD11b, CD18 und CD66b im <i>in vitro</i> Differenzierungsmodell	93
Abb. 26:	Genexpressionsanalyse der CD177- und PR3-mRNA im <i>in vitro</i> Differenzierungsmodell	94
Abb. 27:	Durchflusszytometrische Dokumentation der Zellsortierung von differenzierten CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen	96
Abb. 28:	Giensa-Färbung von sortierten mPR3 ^{hoch} /mCD177 ^{positiven} und mPR3 ^{niedrig} /mCD177 ^{negativen} differenzierten Zellen	97
Abb. 29:	Western Blot-Analyse für das CD177-Protein und das PR3-Protein an sortierten Zellpopulationen	98
Abb. 30:	Genexpressionsanalyse der CD177- und PR3-mRNA an CD34-positiven hämatopoetischer Stammzellen	99
Abb. 31:	Schematische Darstellung des CD177-Gens und des Pseudogens auf Chromosom 19q13.31	101
Abb. 32:	Ergebnis der Southern Blots an DNA von mPR3 ^{hoch} /mCD177 ^{positiv} und mPR3 ^{niedrig} /CD177 ^{negativ} sortierten neutrophilen Granulozyten mit der Exon 4/5-Sonde	102
Abb. 33:	Ergebnis der Southern Blots an DNA von mPR3 ^{hoch} /mCD177 ^{positiv} und mPR3 ^{niedrig} /CD177 ^{negativ} sortierten neutrophilen Granulozyten mit der Exon 9-Sonde	103
Abb. 34:	Ausschnitt aus der Datenbank für den Bereich von Chromosom 19q13.31 mit den bekannten Deletionspolymorphismen	104
Abb. 35:	Schematische Darstellung der möglichen Fragmentkonstellationen beim Southern Blot-Experiment	105
Abb. 36:	Ergebnis des Southern Blots für die Untersuchung der <i>Copy number variation 2244</i>	105
Abb. 37:	Ausschnitt der Datenbank für den Bereich von Chromosom 19q13.31 mit der Lage des CD177-Gens und der Antisense-Transkripte	107
Abb. 38:	Genexpressionsanalyse der CD177- und EST AA496144-mRNA	108

Abb. 39:	Analyse der 5' <i>RACE</i> -PCR	109
Abb. 40:	Sequenzierungsergebnis der 5' <i>RACE</i> -PCR-Produkte	109
Abb. 41:	Haplotypenanalyse am <i>CD177-Locus</i> im Trio (Eltern und ein Kind) der Familie A.	113
Abb. 42:	Haplotypenanalyse am <i>CD177-Locus</i> im Trio (Eltern und ein Kind) der Familie B.	115
Abb. 43:	Haplotypenanalyse am <i>CD177-Locus</i> im Trio (Eltern und ein Kind) der Familie C.	116
Abb. 44:	Haplotypenanalyse am <i>CD177-Locus</i> der Familie D (Eltern und zwei Kinder).	117
Abb. 45:	Haplotypenanalyse am <i>CD177-Locus</i> der Familie F (Eltern und zwei Kinder).	119
Abb. 46:	Haplotypenanalyse am <i>CD177-Locus</i> der Familie G (Eltern und zwei Kinder).	166
Abb. 47:	Haplotypenanalyse am <i>CD177-Locus</i> im Trio (Eltern und ein Kind) der Familie H.	120
Abb. 48:	Haplotypenanalyse am <i>CD177-Locus</i> der Familie I (Eltern und zwei Kinder).	121

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Kettritz für die Themenstellung und die Möglichkeit diese Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe im ECRC Berlin-Buch anfertigen zu können, bedanken. Ich danke ihm vielmals für die konzeptionelle Unterstützung, die zahlreichen Diskussionen und die vielfältige Hilfe bei der Erstellung meiner Dissertation.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Börner für die Bereitschaft die Betreuung seitens der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin zu übernehmen.

Prof. Dr. Luft danke ich herzlichst für die Hilfestellungen, die Anregungen für meine Doktorarbeit und die freundliche Integration in seine Arbeitsgruppe.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Sylvia Bähring für die gute Betreuung auf dem Gebiet der Genetik, die stete Unterstützung und Hilfsbereitschaft, die anregenden Diskussionen und die Sorgfalt bei der Korrektur meiner Dissertation.

Dr. Maren Wellner sei vielmals für die Betreuung auf dem Gebiet der Molekularbiologie gedankt.

Mein Dank geht auch an Dr. Philipp Maass, der mir in vielen kniffligen Situationen mit wertvollen Anregungen und Tipps für meine Doktorarbeit sehr geholfen hat.

Ich bedanke mich vielmals bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kettritz und von Prof. Dr. Luft, die mir in der Zeit der Anfertigung meiner Arbeit, durch freundliche Aufnahme, methodische Ratschläge, Hilfsbereitschaft, Überlassung von wertvollen Arbeitsplatz in ihren Räumen und mit einer guten Arbeitsatmosphäre diese Zeit unvergesslich gemacht haben.

Vielen Dank auch an meine Familie, Freunde und insbesondere an meinen Freund Dirk für die liebevolle Unterstützung.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Claudia Eulenberg, geboren am XX.XX.XXXX in X, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig erarbeitet und verfasst sowie keine anderen als die angegebenen Hilfen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den 11.06.2012

Claudia Eulenberg

Publikationsliste

Choi M, **Eulenberg C**, Rolle S, von Kries JP, Luft FC, Kettritz R., 2010. The use of small molecule high-throughput screening to identify inhibitors of the proteinase 3-NB1 interaction. *Clin Exp Immunol*, 161(2), S. 389-96.

Bergmann A, **Eulenberg C**, Wellner M, Rolle S, Luft F, Kettritz R., 2010. Aldosterone abrogates nuclear factor kappaB-mediated tumor necrosis factor alpha production in human neutrophils via the mineralocorticoid receptor. *Hypertension*, 55(2), S.370-9.

von Vietinghoff S, **Eulenberg C**, Wellner M, Luft FC, Kettritz R., 2008. Neutrophil surface presentation of the anti-neutrophil cytoplasmic antibody-antigen proteinase 3 depends on N-terminal processing. *Clin Exp Immunol*, 152(3), S.508-16.

von Vietinghoff S, Tunnemann G, **Eulenberg C**, Wellner M, Cristina Cardoso M, Luft FC, Kettritz R., 2007. NB1 mediates surface expression of the ANCA antigen proteinase 3 on human neutrophils. *Blood*, 109(10), S.4487-93.

Berlin, 11.06.2012

Claudia Eulenberg