

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Entwicklung eines Partikel-Gel-Agglutinationstests zum Nachweis
von Einzelnukleotidpolymorphismen und
zur Phänotypisierung granulozytärer Antigene**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Khalil Abou-Chaker
aus Berlin

Gutachter: 1.: Prof. Dr. med. A. Salama
2.: Prof. Dr. med. U. Pison
3.: Prof. Dr. med. G. Bein

Datum der Promotion: 09.09. 2011

Abstract

Die Agglutinationstechnik stellt seit mehr als 100 Jahren die einfachste und schnellste Methode zum Nachweis zellulärer Antigene und Antikörper dar. Die Anwendung und Weiterentwicklung dieser Technik hat sich bisher nur in der Erythrozyten-Serologie bewährt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, klinisch relevante Polymorphismen mittels einfacher Agglutinationstests zu erfassen. Durch die Verwendung braun gefärbter, paramagnetischer Partikel wurde der primär für die Erythrozyten-Serologie konzipierte und etablierte Gelzentrifugationstest zur Bestimmung thrombozytärer und leukozytärer Polymorphismen weiterentwickelt. Es ist uns gelungen, die aus der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) resultierenden PCR-Produkte von humanen Plättchen- (HPA) und humanen Leukozyten-Antigenen (HLA) in neuen Partikel-Gel-Agglutinations-Assays (PaGIA) nachzuweisen. Es wurden 1 400 HPA- und 1 564 HLA-Proben untersucht. Die Ergebnisse des neuen PaGIA zeigten im Vergleich zur PCR-SSP (PCR-Sequence-specific-primer) bzw. konventionellen Gelelektrophorese eine hundertprozentige Übereinstimmung. Neben der Anwenderfreundlichkeit und der Zeitersparnis hat die Darstellung von PCR-Amplifikationen mithilfe gefärbter Partikel im PaGIA gegenüber der Gelelektrophorese den Vorteil, dass hier ohne kanzerogene Agenzien wie Ethidiumbromid gearbeitet werden kann. In einer weiteren Anwendung zur Phänotypisierung des granulozytären Antigens HNA-1a von Blutspendern (n=147) mit paramagnetischen Partikeln zeigten die Ergebnisse ebenfalls eine hundertprozentige Korrelation mit den molekularbiologischen Untersuchungen in der PCR. Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen das Potential der PaGIA für die Routinediagnostik, die sich durch die hohe Sensitivität und Spezifität sowie in Rentabilität und Schnelligkeit auszeichnet.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung.....	8
1.1 Agglutinationstests zum Nachweis von Antigenen und Antikörpern.....	8
1.2 Serologische Testmethoden zum Nachweis von thrombozytären und granulozytären Antikörpern und Antigenen.....	9
1.3 Molekularbiologische Testmethoden zum Nachweis von Punktmutationen (SNPs)	10
1.4 Zielsetzung.....	12
2 Material und Methoden.....	13
2.1 Verwendete Materialien	13
2.1.1 Puffer und Lösungen.....	13
2.1.2 Antikörper.....	14
2.1.3 Partikel.....	15
2.1.4 Gelkarten	15
2.1.5 Proben	15
2.1.6 Berechnung der DNA-Konzentration.....	16
2.2 Herstellung und Qualitätskontrolle von Partikeln für die PaGIA-Technik	16
2.2.1 Berechnung des molaren Überschusses an Biotin	16
2.2.2 Biotinylierung und Beladung von Anti-HNA-1a-Antikörper auf Streptavidin-Partikel	17
2.2.3 Carboxyl-Beladungsprozedur für Anti-HNA-1a- und Anti-FITC-Antikörper 17	
2.2.4 Qualitätskontrolle von Streptavidin- und Carboxyl-Partikeln	18
2.2.4.1 Durchflusszytometrie	18
2.2.4.2 Durchflusszytometrie der Partikel	18
2.2.4.3 Qualitätskontrolle der Beladung von Partikeln im PaGIA	19
2.2.5 PaGIA von HNA-1a.....	19
2.3 Checkgel-System.....	20
2.3.1 HLA PCR	20

2.3.2	Agarosegelelektrophorese von HLA-PCR-Produkten	21
2.3.3	PaGIA als Checkgel für HLA-PCR-Produkte.....	21
2.4	HPA-Genotypisierung	22
2.4.1	HPA-Primer.....	22
2.4.2	Durchführung der HPA PCR	22
2.4.3	PaGIA von PCR-Produkten.....	23
2.5	Statistik	23
3	Ergebnisse.....	25
3.1	Qualitätskontrolle der Partikel im Durchflusszytometer.....	25
3.2	Qualitätskontrolle der Partikel mit PaGIA.....	26
3.3	HNA-1a Phänotypisierung	26
3.4	Untersuchung von HLA-PCR-Produkten mittels Checkgel	27
3.5	HPA Typisierung mittels PaGIA und Gelelektrophorese	27
3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	28
4	Diskussion.....	30
4.1	Allgemeines	30
4.2	HNA-1a-Typisierung	30
4.3	Untersuchung von HLA-PCR-Produkten.....	31
4.4	HPA-Genotypisierung	32
4.5	Ausblick	33
5	Anteilerklärung.....	35
6	Liste ausgewählter Publikationen	36
7	Vollständige Publikationsliste	37
8	Lebenslauf.....	38
9	Selbstständigkeitserklärung.....	39
10	Danksagung	40
11	Literatur	41

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm (10^{-6} g)
µl	Mikroliter (10^{-6} l)
6-FAM	6-carboxy-fluorescein
AIN	Autoimmunneutropenien
AK	Antikörper
ANN	Alloimmune neonatale Neutropenie
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP)
dsDNA	doppelsträngige DNA (<i>double-stranded deoxyribonucleic acid</i>)
EDAC	1-Ethyl-3(3-Dimethyl)aminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
FAM	Fluorescein (fluorescein)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
G.a.H.	goat anti human
G.a.M.	goat anti mouse
g	Gramm
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HPA	Humanes Thrombozyten Antigen
HNA	Humanes Neutrophiles Antigen
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
kD	Kilodalton (1 000 Dalton)
l	Liter
m	Meter
M	Molar (Mol/l)
min	Minute
ml	Milliliter (10^{-3} l)
mM	Millimolar
NHS-LC	N-hydroxysuccinimid-long chain

ng	Nanogramm (10^{-9} g)
nm	Nanometer (10^{-9} m)
nM	Nanomolar (10^{-9} M)
NRBC	Nukleierte Rote Blutkörperchen (<i>nucleated red blood cell</i>)
OD	optische Dichte
PaGIA	Partikel-Gel-Agglutinationstest
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration [mol/l]
PBS	Phosphatpuffer Saline
SSP	sequence specific primer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAMRA	6-carboxy-tetramethyl-rhodamine
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

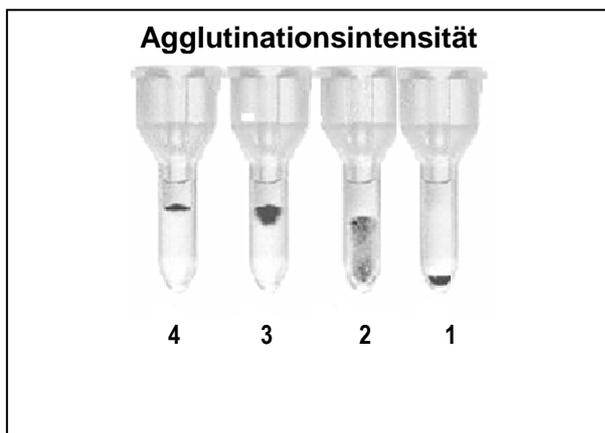
1 Einleitung

1.1 Agglutinationstests zum Nachweis von Antigenen und Antikörpern

Das Agglutinationsprinzip wurde vor mehr als 100 Jahren erfolgreich in der Blutgruppenserologie eingesetzt. Dieser Test ist jedoch durch seine geringe Sensitivität gekennzeichnet. Durch die Einführung der Gelzentrifugationstechnik konnte der Nachweis der erythrozytären Agglutination wesentlich verstärkt und verbessert werden [1]. Bei dieser Technik lassen sich agglutinierte Erythrozyten von nicht agglutinierten Erythrozyten mithilfe einer Sephacryl-Gelsäule visuell unterscheiden, da agglutinierte Zellen die Gelmatrix nicht passieren können (siehe Abbildung. 1). Die Agglutinationsreaktionen in der Gelkarte werden im Vergleich zu denen in konventionellen Tests [2, 3, 4, 5] einfacher und objektiver erfasst.

Abbildung 1

Dargestellt ist die Abstufung der Agglutination von Erythrozyten in der Gelzentrifugationstechnik der Firma DiaMed, wobei 4 eine vollständige Agglutination und 1 eine vollständige Sedimentation der Zellen oder Partikel in einer Gelmatrix definiert.



Erythrozyten sind für diese Technik geeignet, weil sie zum einen kontrastreich und stark rötlich gefärbt und zum anderen sehr deformierbar sind. Nicht agglutinierte Zellen können ohne Schwierigkeiten das Gel passieren. Andere Zellen wie Thrombozyten und Leukozyten sind farblos und agglutinieren spontan, lassen sich mit dieser Technik also nicht untersuchen. Um diese Schwierigkeiten zu überwinden und den Anwendungsbereich der Kartentechnik auf andere Zellen zu erweitern, kam

die Verwendung synthetischer Polystyrenpartikel infrage. Diese zeigen keine Spontanagglutination, sind aufgrund Ihrer braunen Farbe visuell gut zu erkennen und haben mit ca. 4 µm Durchmesser eine mit Erythrozyten vergleichbare Größe. Dadurch ist es gelungen, Einzelnukleotidpolymorphismen der humanen Plättchenalloantigene (HPA) [6] zu detektieren, den Nachweis von PCR-Produkten im Checkgelsystem [7] und somit eine Alternative zur aufwendigen Gelelektrophorese zu etablieren sowie den Nachweis des humanen neutrophilen Antigens-1a (HNA-1a) [8] zu entwickeln. Diese Publikationen sind Gegenstand dieser Doktorarbeit.

1.2 Serologische Testmethoden zum Nachweis von thrombozytären und granulozytären Antikörpern und Antigenen

Zum Nachweis von Allo- und Autoantikörpern gegen thrombozytäre Oberflächenstrukturen wird der MAIPA (monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens) eingesetzt [9, 10]. Dieses glykoproteinspezifische Verfahren kann zur Untersuchung von Antikörpergemischen verwendet werden. Die Nachteile dieser Methode sind der hohe Zeit- und Personalaufwand. Zusätzlich werden beim MAIPA mindestens $2 \cdot 10^7$ Thrombozyten benötigt. Patienten mit ausgeprägter Thrombozytopenie und Kleinkinder können somit nicht immer untersucht werden. Ein anderes Testsystem zum Nachweis antithrombozytärer Antikörper ist die simultane Analyse spezifischer Plättchen-Antikörper (SASPA) [11]. Dieses Verfahren beruht auf dem Prinzip der Durchflusszytometrie und benötigt im Vergleich zum MAIPA wesentlich weniger Thrombozyten ($\sim 10^5$). Bei der SASPA werden zur Testung unterschiedliche Beads verwendet, sodass eine simultane Differenzierung thrombozytärer Antikörper bei vergleichbarer Sensitivität und Spezifität zum MAIPA möglich ist. Der Nachteil des SASPA liegt in den hohen Kosten bei der Anschaffung eines Durchflusszytometers.

Zum Nachweis granulozytärer Antikörper werden mehrere Testverfahren verwendet. Beim Granulozytenagglutinationstest (GAT) werden Testgranulozyten mit Serum auf eine Mikrotiterplatte inkubiert und nach zwei Stunden in einem konfokalen Mikroskop auf Agglutination untersucht. Nachteil des GAT ist die geringe Spezifität, die durch spontane Agglutination von Granulozyten hervorgerufen wird. Antikörper, die gegen

das HNA-3a-Antigen gerichtet sind, lassen sich mit dieser Methode gut nachweisen [12]. Beim Granulozytenimmunfluoreszenztest (GIFT) werden hingegen fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper zum Nachweis von membrangebundenen Antikörpern eingesetzt. Die Auswertung kann mikroskopisch oder durchflusszytometrisch erfolgen. Vorteil der mikroskopischen Untersuchung ist die Vermeidung falsch positiver Reaktionen. Zur Differenzierung von granulozytären und leukozytären Antikörpern wird der Lymphozytenimmunfluoreszenztest (LIFT) durchgeführt. Die Auswertung erfolgt ebenfalls mithilfe des Durchflusszytometers [13, 14, 15, 16]. Wurden in den oben beschriebenen Testverfahren granulozyten Antikörper nachgewiesen, können diese nun in einem weiteren Testsystem, dem MAIGA (monoclonal-antibody-specific immobilization of granulocyte antigens), spezifiziert werden [17]. Es handelt sich hierbei um eine sehr aufwendige ELISA-Technik, die als Antikörpersuchtest nicht geeignet ist. Die simultane Analyse spezifischer Granulozytenantigene (SASGA), ein ansonsten zu SASPA analoges Verfahren, wurde kürzlich beschrieben [18]. Allerdings ist die Anwendung dieses Verfahrens ebenfalls wie beim SASPA durch den Durchflusszytometer mit hohen Anschaffungskosten verbunden und für die Untersuchung einzelner Blutproben ungeeignet.

Zusammengefasst sind alle beschriebenen Verfahren zur Erfassung thrombozytärer und granulozytärer Strukturen entweder sehr personal- und zeitaufwendig oder sie sind mit hohen apparativen Anschaffungskosten verbunden. Die PaGIA-Technik ist einfach, schnell und mit geringem apparativen und personellen Aufwand möglich.

1.3 Molekularbiologische Testmethoden zum Nachweis von Punktmutationen (SNPs)

Die größte Variation im menschlichen Genom stellen die SNPs dar, wobei man in älteren Studien von durchschnittlich einem SNP alle 1 000 bp [19] ausging. Neue Analysen gehen von über 4,5 Millionen Mutationen aus (NCBI: Datenbank des amerikanischen National Centre of Biotechnology Information) und somit von einer höheren Frequenz der SNPs im menschlichem Genom [20]. Viele Methoden zur Bestimmung von SNPs wurden in den letzten Jahrzehnten beschrieben [21, 22, 23,

24, 25, 26, 27]. Wichtige Untersuchungen kommen zur SNP-Typisierung aus dem Bereich der Real Time PCR und basieren immer auf dem gleichen Prinzip:

Die Spezifität der PCR-Amplifikation ist nicht nur durch spezifische Primer gewährleistet, sondern durch eine „Hybridisierungssonde“, die im Amplikon bindet. Die Hybridisierungssonde trägt am 5'Ende den sog. Reporter und am 3'Ende den Quencher. Die Aufgabe des Quenchers besteht darin, die Energie des Reporters nach dessen Anregung zu absorbieren, sodass kein Fluoreszenzsignal (mit der zu erwartenden Wellenlänge) gemessen werden kann. Sollte die sequenzspezifische Sonde im Amplikon binden, so wird der Reporter durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase abgetrennt. Dieser befindet sich dann nicht mehr in räumlicher Nähe zum Quencher, sodass der Reporter, wenn er angeregt wird, ein Fluoreszenzsignal abgibt. Nach Überschreiten eines bestimmten Schwellenwerts (Threshold) nimmt die Fluoreszenz proportional zur Amplifikation zu. Die Zyklenzahl, bei der der Threshold überschritten wird, wird c_T -Wert genannt und ermöglicht eine präzise Quantifizierung. Bei dem TaqMan Assay kann man auch mehrere Sonden gleichzeitig verwenden, die unterschiedliche Farben (FITC, PE) emittieren (MultiPlex). Je nachdem, welcher Polymorphismus vorliegt, kann nur eine Sonde binden. So können bereits bekannte SNPs schnell und einfach identifiziert werden.

Die modernsten Entwicklungen zur Bestimmung von SNPs sind jedoch zweifellos die Chiptechnologien, die es durch Klonraster sogenannten „Microarrays“ ermöglichen, zahlreiche Polymorphismen gleichzeitig auf einem Glasobjektträger zu identifizieren [28, 29, 30]. Die sogenannten „BLOODchip“ Arrays ermöglichen mittlerweile mit einer Untersuchung die Genotypisierung von über 100 blutgruppenspezifischen SNPs [31]. Eine andere Anwendung ist die Synthese von Oligonukleotiden in situ [32, 33, 34]. Die Luminex-Technologie verwendet beispielsweise fluoreszierende „Beads“, an denen Oligonukleotide gekoppelt sind [35]. Diese Technik eignet sich aufgrund der geringen Kosten für Verbrauchsmaterial und Reagenzien für das Massen-Screening von SNPs.

Auch wenn die hier beschriebenen Verfahren zur Identifizierung von SNPs großes Potenzial besitzen, sind diese Anwendungen in Notfallsituationen, in denen der SNP-Status von Patienten schnell bestimmt werden muss, durch den hohen Zeitaufwand unbrauchbar. Außerdem ist die Bestimmung einzelner SNPs mit den

Chiptechnologien wirtschaftlich nicht sinnvoll und man setzt eher auf PCR-Verfahren mit sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP), die derzeit noch die in der Routine am weitesten verbreiteten Methoden sind [36, 37, 38, 39]. Bei diesem System wird in zwei unterschiedlichen Reaktionsgefäßen jeweils ein anderer Forward-Primer verwendet, wobei sich beide Forward-Primer in nur einem Nukleotid am 3'Ende unterscheiden. Sollte ein bestimmter Polymorphismus vorliegen, kann nur der entsprechende komplementäre Primer binden und es kommt zur Amplifikation. Der Nachweis erfolgt mithilfe der Gelelektrophorese. Bei der Gelelektrophorese wird bekanntermaßen das kanzerogene Agent Ethidiumbromid (EtBr) eingesetzt, was ein Gesundheitsrisiko für das Personal darstellt. GelRed ist eine harmlose Alternative zu EtBr und zeichnet sich durch bessere Sensitivität aus. Aufgrund des hohen Probendurchsatzes in der Routine wäre GelRed jedoch gleichzeitig eine kostenintensive Alternative. Um die Visualisierung von PCR-Produkten ohne kanzerogene Agenzien und kostengünstig zu ermöglichen, haben wir die PaGIA-Technik entsprechend adaptiert.

1.4 Zielsetzung

Viele Verfahren, die in der Routinediagnostik zum Einsatz kommen, sind mit enormem personellen und apparativen Aufwand verbunden. Die Vereinfachung von Testverfahren stellt einen permanenten Anspruch in der medizinischen Diagnostik dar. Der Nachweis von z. B. thrombozytären und leukozytären Antigenen ist durch die Morphologie dieser Zellen schwierig, da sie farblos sind und zu spontaner Agglutination neigen. Das Ziel dieser Arbeit ist es daher, mit magnetischen Partikeln und der Gelzentrifugationstechnik verschiedene Anwendungen zu etablieren. Die Anwendungen sind ein Checkgelsystem für HLA PCR-Produkte, welches eine Alternative zur Gelelektrophores darstellt, eine Phänotypisierung des HNA-1a-Antigens und die Genotypisierung von HPA-1, -2, -3, -4, -5, -6 und -15 Merkmale.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Puffer und Lösungen

Phosphatpuffer (PBS) W/O $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$: Als isotonische Pufferlösung wurde Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) 1x ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (Seromed, Biochrom KG, Berlin) verwendet.

Kopplungspuffer: 1,59 g Dinatriumcarbonat Na_2CO_3 , 2,93 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3 , Merck, Darmstadt) und 0,1 g Natriumazid NaN_3 (Merck, Darmstadt) wurden in 1 000 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit 1 N Natriumhydroxid auf 9,6 eingestellt.

MES-Puffer (2-[N-Morpholino] ethanesulfonic acid) (50 mM): 0,53 g MES (Sigma-Aldrich, Steinheim) wurden in 100 ml aqua dest. gelöst. Der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH auf 6,1 eingestellt.

EDAC-Lösung 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide (10 mM): 1,9 mg EDAC (Sigma-Aldrich, München) wurden in 1 ml MES-Puffer gelöst.

NHS-Lösung (N-Hydroxysuccinimid, 50 mM): 5,7 mg NHS (Sigma-Aldrich, Steinheim) wurden in 1 ml MES-Puffer gelöst.

Natriumcarbonat Puffer: 0,159 g Na_2CO_3 (Merck, Darmstadt) und 0,293 g NaHCO_3 (Merck, Darmstadt) wurden in 100 ml aqua dest. gelöst. Der pH-Wert wurde auf 8,4 mit 1 N NaOH eingestellt. Der Natriumcarbonat Puffer wurde bei 2 bis 8 °C aufbewahrt.

[2(4'-Hydroxyazobenzen)] Benzen-Säure-(HABA)-Lösung: Zur Herstellung einer 10 mM HABA-Lösung in 10 mM NaOH wurden 24,2 mg ImmunoPure HABA (Pierce, Rockford, IL, USA) in 9,9 ml aqua dest. gelöst. Zu dieser Lösung wurden anschließend 0,1 ml einer 1 N NaOH gegeben. Die HABA-Lösung wurde lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt.

Avidin-HABA-Reagenz: 600 µl HABA-Lösung und 10 mg ImmunoPure Avidin (Pierce, Rockford, USA) wurden in 19,4 ml PBS gelöst. Das Avidin-HABA-Reagens ist zwei Wochen stabil bei 4 °C.

Sulfo-NHS-Biotin: 5 g lyophilisiert (Pierce, Rockford, USA). Zur Biotinylierung von Antikörpern wird eine 1-mg/ml-Lösung hergestellt.

Diluent 2-Lösung: 1 l (DiaMed, Cressier, Schweiz)

Partikelpuffer: Zum Arbeiten mit den Partikeln wurde ein Puffer (DiaMed) verwendet, der hinsichtlich seiner Zusammensetzung auf die Eigenschaften der Partikel optimiert ist. Der Puffer hält die Partikel in Suspension und verhindert deren Spontanagglutination.

10xTBE Puffer: 5 l (Carl Roth, Karlsruhe). Verwendung für die Gelelektrophorese als 1x TBE-Puffer.

Agarose: 100 g (Carl Roth, Karlsruhe). Verwendung für die Gelelektrophorese zur Herstellung von 1 bis 2 % Agarosegele, gelöst in 1x TBE-Puffer.

6x Gel-Ladepuffer: 1,8 ml (Carl Roth, Karlsruhe). Verwendung in der Gelelektrophorese. PCR-Produkte werden mit Gel-Ladepuffer versetzt und in der Gelelektrophorese getrennt.

10x PCR Puffer: 50 mM KCL, 10 mM Tris-HCL, 1,5 mM MgCl₂, pH 8,3 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland).

dNTP-Lösung: 0,125 mM je Nukleotid (Applied Biosystems). Einsatz für die PCR.

AmpliTaQGold-Polymerase: 250 Units (Applied Biosystems). Einsatz als Enzym in der PCR.

HLA-Typing RELI™ Kit: Zur Amplifikation des Locus für HLA-A, -B, -C, -DR, und -DQ (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland).

2.1.2 Antikörper

Für die Untersuchungen wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Antikörper entsprechend den Angaben des Herstellers eingesetzt.

Tabelle 1

Spezifität	Spezies/Klon	Konzentration/Form	Hersteller
HNA-1a	Maus / CLB-gran/11, 5D7, monoclonal	0,2 mg/ml ; Lyophilisiert	Hiss-Diagnostic, Freiburg, Germany
FITC	Maus /clone FL-D6, monoclonal	2 ml Acides	Sigma Aldrich, München Deutschland
Maus-IgG Fc γ -Fragment	Ziege, polyklonal	1,8 mg/ml; Lyophilisiert	Dianova, Hamburg Deutschland
Keine, Isotyp-Kontrolle	Maus IgG	FITC konjugiert, gelöst/100 Test, 20 μ l/Test	Immunotech, Marseille, Frankreich

2.1.3 Partikel

Streptavidin-Partikel: M280 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

Carboxyl-Partikel: M270 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

2.1.4 Gelkarten

Die in Tabelle 2 aufgeführten Gelkarten stammen von der Firma DiaMed. (DiaMed Diagnostika, Ottobrunn, Deutschland) und wurden für Untersuchungen in dieser Arbeit eingesetzt. Die Gelkarten bestehen aus Mikroröhrchen, die sich nach unten hin zu einem schmalen Konus (siehe Abbildung 1) verengen und mit einer Sephacryl-Gelsäule gefüllt sind. Bei einer Zentrifugation durchwandern Erythrozyten bzw. Partikel die Sephacryl-Gelsäule und agglutinieren im Falle einer spezifischen Reaktion mit z. B. Antikörpern. Findet keine Reaktion statt, sedimentieren Erythrozyten oder Partikel im unteren Bereich des Mikroröhrchens.

Tabelle 2

Gelkarte	Spezifität
1	Ziege Anti-Maus
2	NaCl-Sephacrylgel Ohen Antikörper
3	Neutral-Sephacrylgel ohen Antikörper

2.1.5 Proben

Für unsere HPA- und HNA-1a-Untersuchungen wurde von Blutspendern EDTA-Blut (BD Vacutainer, Plymouth, United Kingdom) entnommen, die zuvor eine schriftliche Einverständniserklärung abgegeben hatten, dass ihre Blutproben anonymisiert zu Forschungszwecken verwendet werden können. Für die HNA-1a- wurde von 147 Blutspendern, und die HPA-Typisierung von 100 Blutspendern Blut entnommen. Für die Untersuchung im Checkgel-System wurde von 608 Patienten EDTA-Blut untersucht. Es wurde jeweils 1 ml EDTA-Blut zur DNA-Isolierung verwendet. Die Isolierung der DNA erfolgte mit dem Roboter „Geno-M6“ (Qiagen, Hamburg, Deutschland).

2.1.6 Berechnung der DNA-Konzentration

Die DNA- und Proteinkonzentration wurde mithilfe eines Spektrofotometers (Pharmacia, GenQuant) bei 260 nm, dem Extinktionsmaximum von Desoxyribonukleinsäuren (DNA), und 280 nm, dem Extinktionsmaximum von Proteinen, gemessen. Zur DNA-Konzentrationsberechnung wurde folgende Formel angewandt:

$$C [\mu\text{g/ml}] = OD_{260\text{nm}} \cdot 50 [\mu\text{g/ml}] \cdot VF$$

C = Konzentration, OD = Optische Dichte, 50 μg/ml = Extinktionskoeffizient für dsDNA, VF=Verdünnungsfaktor. Die Konzentration der isolierten DNA-Proben lag zwischen 50 und 100 ng/μl. Zusätzlich wurde die Reinheit der DNA-Probe mithilfe des Verhältnisses aus $OD_{260\text{nm}}$ zu $OD_{280\text{nm}}$ berechnet. Dieser Wert sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurden die Messungen bei $OD_{260\text{nm}}$ und $OD_{280\text{nm}}$ in einem 1 bis 3 mM Na_2HPO_4 -Puffer pH 8,5 durchgeführt [40].

2.2 Herstellung und Qualitätskontrolle von Partikeln für die PaGIA-Technik

Die Herstellung und Qualitätskontrolle von anti-HNA-1a- und anti-FITC-Partikeln erfolgt in mehreren Schritten, und ist in 2.2.1-2.2.4.3 dargestellt.

2.2.1 Berechnung des molaren Überschusses an Biotin

Zur Herstellung von Anti-HNA-1a-Partikel wurde ein Anti-HNA-1a-Antikörper zunächst biotinyliert (siehe 2.2.2) und anschließend auf Streptavidin-Partikel ge-coated. Um eine optimale Biotinylierung des monoklonalen Antikörpers Anti-HNA-1a zu gewährleisten, wurde Biotin in einem 10- bis 30-fachen molaren Überschuss zugegeben. Zunächst wurde berechnet, wie viel mmol Antikörper (IgG) bei einer eingesetzten Menge von 0,2 mg Antikörper reagieren. Mit dem Molekulargewicht von 150 kDa für IgG lässt sich die mmol-Menge mit Gleichung 1 berechnen.

$$1: \text{IgG [mmol]} = \text{Protein [mg]} / \text{Protein [Molekulargewicht]}$$

$$\text{IgG [mmol]} = 0,2 \text{ mg} / 150 \text{ 000 mg/mmol} = 1,33 \times 10^{-6} \text{ mmol}$$

Das NHS-LC-Biotin hat ein Molekulargewicht von 556,58 mg/mmol. Somit entspricht ein zehnfacher Überschuss einer Menge von **7,4 μg Biotin**

$$(1,33 \times 10^{-6} \text{ mmol} \times 10 \times 556,58 \text{ mg/mmol} = 7,4 \text{ μg})$$

2.2.2 Biotinylierung und Beladung von Anti-HNA-1a-Antikörper auf Streptavidin-Partikel

0,2 mg des monoklonalen Anti-HNA-1a-Antikörpers wurden in 200 µl PBS gelöst. Zunächst wurde 1 mg des lyophilisierten Sulfo-NHS-LC-Biotins auf Raumtemperatur gebracht und in 1 ml PBS gelöst. Um genau dem zehnfachen Überschuss an Biotin zu entsprechen, müssen 7,4 µl dieser Biotinlösung verwendet werden. Um eine optimale Biotinylierung zu gewährleisten, haben wir 10 µl dieser Biotinlösung der Antikörperlösung beigemischt und unter mäßigem Schütteln für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um anschließend nicht gebundenes Biotin zu entfernen, wurden Nanosep-Filter (Millipore, USA) mit einer Porengröße von 50 kDa (Microcon YM-50) eingesetzt. Dazu wurde der Biotinylierungsansatz in einen Nanosep-Filter überführt und für fünf Minuten bei 3 500 U/min in einer Eppendorfszentrifuge zentrifugiert. Zum Waschen des Antikörpers wurden 500 µl PBS-Puffer in den Nanosep-Filter pipettiert und weitere fünf Minuten bei 3 500 U/min zentrifugiert. Nach dreimaliger Wiederholung dieses Waschvorgangs wurde die Lösung auf ein Volumen von ca. 100 µl eingeeengt und nach Zugabe von 400 µl PBS mit 0,1 % Natriumazid bei 4°C aufbewahrt. 0,5–1,0 µl dieser Antikörper-Lösung wurden auf 6 µl Streptavidin-Partikel gegeben und fünf Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Partikel zweimal mit Partikelpuffer und einem Magnet-Partikel-Konzentrator (MPC; Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gewaschen und in 50 µl Partikelpuffer resuspendiert.

2.2.3 Carboxyl-Beladungsprozedur für Anti-HNA-1a- und Anti-FITC-Antikörper

Vor der eigentlichen Kopplung des Antikörpers an Partikeln wurden zunächst Vorwasch- und Voraktivierungsschritte durchgeführt.

Vorwaschen: 100 µl der Carboxyl-Partikel M270 wurden mit 900 µl destilliertem Wasser verdünnt. Anschließend wurden die Partikel vier Minuten auf einen Magnet-Konzentrator gegeben und der Überstand abgesaugt. 1 000 µl einer 50 mM MES-Lösung wurden zu den Partikeln gegeben, resuspendiert, und wieder mit dem Magnet-Konzentrator (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gewaschen. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt.

Voraktivieren: Die zuvor gewaschenen Partikel wurden mit 112,5 µl 100 mM EDAC- und 450 µl 50 mM NHS-Lösung versetzt und 30 min bei Raumtemperatur auf dem Rotor (NeoLab, Heidelberg, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurden die Partikel zweimal mit 1 000 ml 50 mM MES pH 6,1 gewaschen.

Partikel beladen: 5 bis 20 µg des Anti-FITC bzw. Anti-HNA-1a-Antikörpers wurden in 500 µl 50 mM MES pH 6,1 gelöst, und für 30 min auf dem Rotor mit den voraktivierten Partikeln inkubiert. Danach wurden die Partikel mit 1 ml Aufbewahrungspuffer zweimal gewaschen und anschließend wieder in 1 ml Aufbewahrungspuffer resuspendiert. Diese mit Antikörpern beladenen Partikeln können jetzt zur Testung eingesetzt werden.

2.2.4 Qualitätskontrolle von Streptavidin- und Carboxyl-Partikeln

2.2.4.1 Durchflusszytometrie

Für diese Arbeit wurde der Durchflusszytometer Coulter Epics XL™ MCL Cytometer (Coulter, Beckman Coulter Company, Miami, Florida, USA) zur Untersuchung der Beladung der Partikeln mit Antikörpern verwendet. Zur Datenerfassung wurde die Software EXPO™32 (Coulter, Beckman Coulter Company, Miami, Florida, USA) eingesetzt. Für die Vorwärts- (FSC) und die Seitwärtsstreuung (SSC) wurden lineare, für die FL1- und FL2-Kanäle logarithmische Skaleneinteilungen gewählt. Während der Messung wurden „Acquisition gates“ definiert, Ereignisse außerhalb dieser Parameterbereiche wurden nicht erfasst.

2.2.4.2 Durchflusszytometrie der Partikel

Streptavidin-Partikel und Carboxyl-Partikel, beladen mit Anti-HNA-1a und Anti-FITC, wie unter 2.2.2 und 2.2.3 beschrieben, wurden für diese Qualitätskontrolle der Beladung der Partikel verwendet. Mithilfe der Isotyp-Kontrolle (negative Kontrolle), wurde zunächst ein „Cut-Off“ gelegt. Hierzu wurden 10 µl Partikel mit 1 µl der Maus-Isotyp-Lösung versetzt, 20 min bei 37°C inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Ein Ziege-Anti-Maus-Antikörper (IgG, lyophilisiert, 1,8 mg/ml, Dianova, Hamburg, Deutschland) wurde zur Untersuchung der Beladung der Partikel im Anschluss verwendet. Hierzu wurden 10 µl Streptavidin- oder

Carboxyl-Partikel mit 1 µl des Ziege-Anti-Maus-Antikörpers versetzt, 20 min bei 37°C inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer gemessen (siehe Abbildung 5).

2.2.4.3 Qualitätskontrolle der Beladung von Partikeln im PaGIA

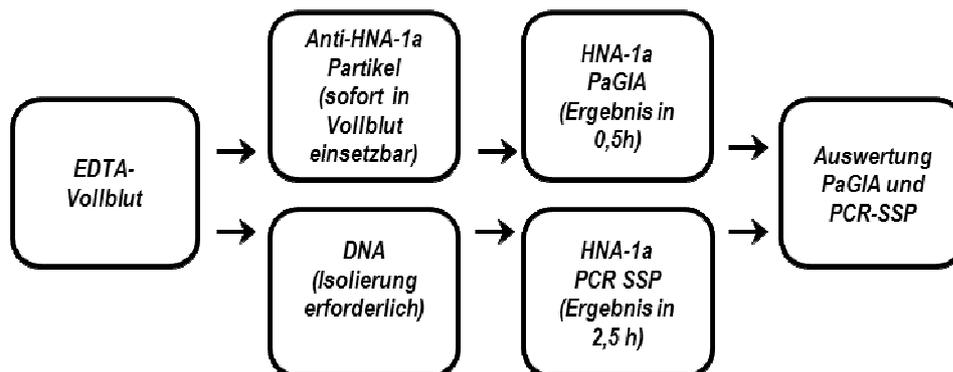
10 µl Partikel wurden in einem Eppendorftube auf einen Magnetkonzentrator (Magnetic Particle Concentrator, MPC, Invitrogen GmbH Karlsruhe) gestellt und der Überstand verworfen. Danach wurden die Partikel in 50 µl Partikelpuffer resuspendiert, auf eine Gelkarte (Ziege-Anti-Maus, DiaMed AG, Schweiz) aufgetragen und in einer ID-Zentrifuge mit den Standardbedingungen (10 min, 1 000 U/min, 89 g) zentrifugiert. Die Beladung der Partikel kann anhand der Agglutination semiquantitativ ausgewertet werden (siehe Abbildung 1).

2.2.5 PaGIA von HNA-1a

Zur Phänotypisierung des HNA-1a-Antigens wurden Anti-HNA-1a-Partikel wie unter 2.2.2 beschrieben verwendet. Mit Antikörper beladene Streptavidin-Partikel wurde mit 100 µl EDTA-Vollblut und 400 µl Diluent 2 versetzt und 15 min bei Raumtemperatur auf dem Rotor inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben für eine Minute auf den MPC gestellt und das EDTA-Vollblut verworfen. Die Partikel wurden wieder in 50 µl Partikelpuffer resuspendiert und in der Reaktionskammer einer NaCl-Gelkarte pipettiert und zentrifugiert (10 min 85 g). Bei HNA-1a-positiven Proben sollten sich Agglutinationen auf der Oberfläche der Gelmatrix bilden, wohingegen die Partikel bei HNA-1a-negativen Proben das Gel ohne Agglutination durchqueren und im unteren Bereich sedimentieren sollten. Zum Vergleich wurde der Versuch mit Carboxylpartikeln durchgeführt. Die Herstellung dieser Partikel ist unter 2.2.3 beschrieben.

Abbildung 2

Dargestellt ist ein Fließschema zur Untersuchung von Granulozyten in EDTA-antikoaguliertem Vollblut auf das HNA-1a Merkmal. Im Oberen Verlauf sind die Schritte zur Typisierung des HNA-1a Merkmals mittels PaGIA aufgeführt. Der untere Bereich beinhaltet den klassischen Verlauf einer SSP-PCR.



2.3 Checkgel-System

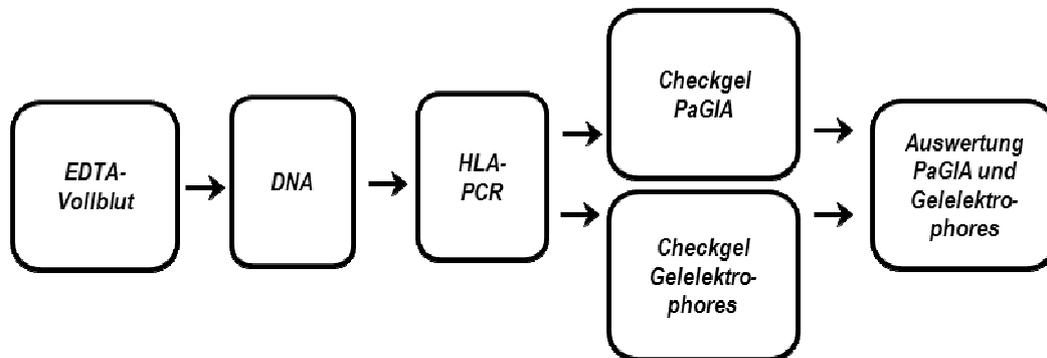
Ein Checkgel (Gelelektrophorese von PCR-Produkten) wird in Routinelabors zur Kontrolle der Amplifikation der PCR-Produkte vor z. B. einer SSO-Typisierung (sequence-specific oligonucleotid) [41, 42] durchgeführt. Unser neues Checkgel-System basiert auf dem PaGIA und soll eine Alternative zum Checkgel mittels Gelelektrophorese sein. In Abbildung 3 sind die wesentlichen Schritte des neuen Checkgel-Systems in einem Fließschema aufgeführt.

2.3.1 HLA PCR

Biotinylierte Primer, die im HLA-Typing RELI™ Kit enthalten sind, flankieren den spezifischen Locus für HLA-A, -B, -C, -DR, und -DQ. Die PCR für das „RELI™“ Kit wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Der Ansatz bestand aus 7,5 µl 6,0 mM MgCl₂, 15 µl Mastermix, der die biotinylierten Primer enthielt, zwei Units Taq Platin Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und 100 ng DNA in einem Endvolumen von 30 µl. Die PCR wurde in einem PCR Thermal Cycler System 9700 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Denaturierung (15 s, 95°C), Anlagerung (45 s, 60°C), Verlängerung (15 s, 72°C) für 35 Zyklen und Endverlängerung (5 min, 72°C).

Abbildung 3

Dargestellt ist der Nachweis von PCR-Produkten im PaGIA und in der Gelelektrophorese.



2.3.2 Agarosegelelektrophorese von HLA-PCR-Produkten

Mithilfe der Agarosegelelektrophorese ist es möglich, im elektrischen Feld DNA-Fragmente aufgrund ihrer negativen Ladung voneinander zu trennen und zu identifizieren. Eine einprozentige Agaroselösung in TBE-Puffer (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und Ethidiumbromid (0,5µg/ml), das dem Gel beigemischt wird, wurden hergestellt und als Elektrophoresegel verwendet. 10 µl PCR-Produkt wurden mit 5 µl Ladepuffer (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) versetzt und 15 min bei 15 V/cm getrennt. DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht (Uvsolo, Biometra, Deutschland) sichtbar gemacht. 3 µl PCR-Produkte wurden in der Agarosegelelektrophorese getrennt und anschließend unter UV-Licht visualisiert. Um diese aufwendige Gelelektrophorese zu ersetzen, wurde ein Checkgel im PaGIA (siehe 2.3.3) entwickelt.

2.3.3 PaGIA als Checkgel für HLA-PCR-Produkte

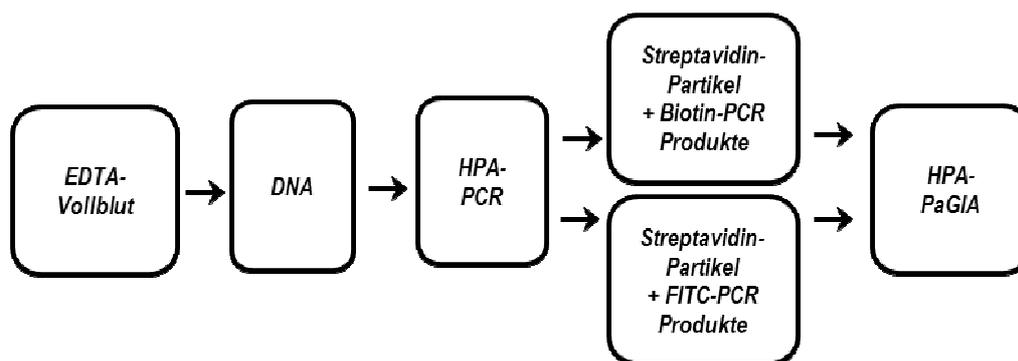
Für die Gelzentrifugation wurden 1 bis 5 µl des HLA-PCR-Produkts mit 5 µl Streptavidin-Partikel (M-280, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in einer Gelkarte (neutrales Sephacrylgel, DiaMed Diagnostika, Ottobrunn, Deutschland) für 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend zehn Minuten bei 980 U/min (80 g) in einer Gelkartenzentrifuge (DiaMed) zentrifugiert. Liegen biotinylierte PCR-Produkte vor, so agglutinieren die Partikel in oder auf der Gelmatrix. Liegen keine biotinylierten PCR-Produkte vor, sedimentieren die Partikel in den unteren Bereich der Gelmatrix.

2.4 HPA-Genotypisierung

Im Folgenden wird die Vorgehensweise der Genotypisierung humaner Plättchen Antigene (HPA) mit dem PaGIA-Verfahren beschrieben. Eine interne Kontrolle wird bei der Untersuchung mitgeführt. In Abbildung 4 sind die wesentlichen Schritte der HPA-Genotypisierung in einem Fließschema dargestellt.

Abbildung 4

Das Fließschema zeigt die HPA-Genotypisierung im PaGIA. Die HPA-PCR-Produkte sind mit Biotin modifiziert und werden auf Streptavidin-Partikel gecoated. Eine interne-Kontrolle (HGH: humanes Wachstumshormon) wird für jeden Ansatz mitgeführt. Die PCR-Produkte der Internen-Kontrolle sind mit FITC modifiziert und werden auf Anti-FITC-Partikel gecoated.



2.4.1 HPA-Primer

Die verwendeten 5'-Primer (TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland) für das HPA und HGH-System (siehe Seite 36) lagen in lyophilisierter Form vor. HPA-Primer trageb am 5'-Ende ein Biotin und wurden auf eine Konzentration von 10 pmol/µl eingestellt. HGH-Primer die in der PCR ein DNA Abschnitt des humanen Wachstumshormon flankieren, tragen am 5'-Ende Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und wurden auf 2 pmol/µl eingestellt.

2.4.2 Durchführung der HPA PCR

Genotypisiert wurden die thrombozytären Alloantigene HPA-1, -2, -3, -4, -5, -6 und -15. Die PCR wurde in einem Endvolumen von 50 µl durchgeführt. 250 ng DNA wurden mit 5 µl PCR 10xPuffer (50 mM KCL, 10 mM Tris-HCL pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂) und je 0,125 mM dNTP (Applied Biosystems GmbH, Deutschland, Darmstadt) versetzt.

Um ein optimales HPA und HGH Primerverhältnis zu erlangen, mussten zunächst Titrationsversuche erfolgen. Dabei wurden 5-, 10-, 15-, 20-, 25- und 30-pmol-Primer für HPA mit jeweils 5-, 10-, 15-, 20-, 25- und 30-pmol-HGH-Primern in der PCR eingesetzt. Die PCR wurde in einem „GeneAmp PCR System 9700 thermal cycler“ (Applied Biosystems GmbH, Deutschland, Darmstadt) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Denaturierung bei 95°C für 10 min, gefolgt von 30 Zyklen, Denaturierung bei 95°C für 30 sec, Anlagerung bei 61°C für 50 sec und Verlängerung bei 72°C für 30 sec. Als interne Kontrolle wurden Primer, die ein Teil des Gens des humanen Wachstumshormons (HGH) amplifizieren, mit jeweils 8 pmol beigemischt. Es wurden 1,25 U AmpliTagGold-Polymerase (Applied Biosystems GmbH, Darmstadt, Deutschland) für die PCR eingesetzt. Die Gelelektrophorese erfolgte wie unter 2.3.2 beschrieben.

2.4.3 PaGIA von PCR-Produkten

Amplifikate der HPA PCR wurden parallel mittels Agarosegelelektrophorese und in der Gelzentrifugation untersucht. Für die Gelzentrifugation wurden 1, 2, 5, 10, 15 und 20 µl des HPA-PCR-Produkts mit 5 µl Streptavidin-Partikel versetzt. In weiteren Ansätzen wurden 1, 2, 5, 10, 15 und 20 µl des PCR-Produkts mit 5 µl anti-FITC Carboxyl-Partikel versetzt und in einer Gelkarte (neutrales Sephacrylgel, DiaMed Diagnostika, Ottobrunn, Deutschland) für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Karte zehn Minuten bei 980 U/min (80 g) in einer Gelkartenzentrifuge (DiaMed) zentrifugiert. Nur im Fall des Vorhandenseins von biotinylierten bzw. FITC-markierten PCR-Produkten agglutinieren Partikel in oder auf der Geloberfläche. Findet keine Amplifikation statt, sedimentieren die Partikel in den unteren Bereich der Gelmatrix.

2.5 Statistik

Die diagnostische Sensitivität und Spezifität sind zwei charakteristische Größen, durch die die Qualität eines Tests bestimmt werden kann. Die diagnostische Sensitivität gibt dabei die Fähigkeit eines Tests an, tatsächlich Kranke zu erfassen. Die diagnostische Spezifität bezeichnet die Fähigkeit, Gesunde als tatsächlich gesund zu identifizieren. Auf unsere Testsysteme bezogen unterscheiden wir

zwischen Träger und Nicht-Träger eines Polymorphismus. Für das HPA- und HNA-System wurden Proben mittels PCR-SSP vortypisiert. Für das Checkgel-System im PaGIA diente die Gelelektrophorese als Standardmethode.

$$\text{Diagnostische Sensitivität} = \frac{\text{richtig positiv}}{\text{richtig positiv} + \text{falsch positiv}}$$

$$\text{Diagnostische Spezifität} = \frac{\text{richtig negativ}}{\text{richtig negativ} + \text{falsch negativ}}$$

Beispielrechnung:

$$\text{Diagnostische Sensitivität} = \frac{74}{74+3} = 0,961 = \underline{\underline{96,1\%}}$$

Bei dieser Rechnung konnten 96,1 % der Träger des HNA-1a Merkmals mit dem verwendeten Testsystem erfasst werden.

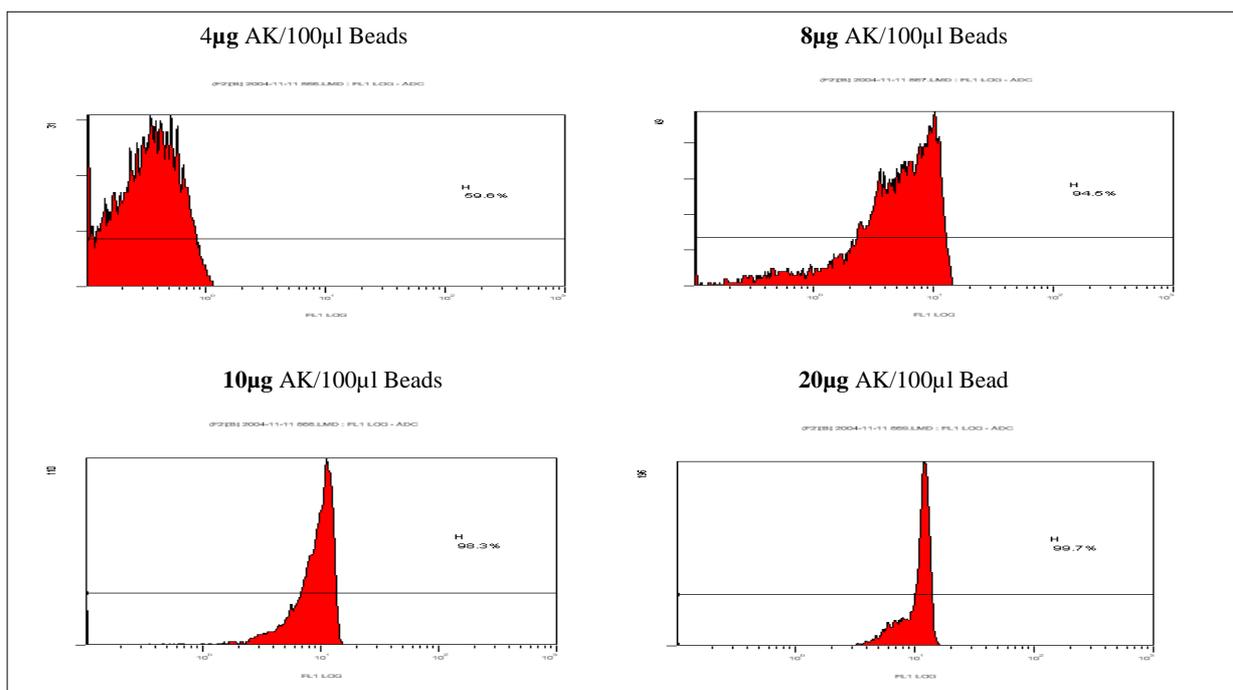
3 Ergebnisse

3.1 Qualitätskontrolle der Partikel im Durchflusszytometer

Streptavidin- und Carboxyl-Partikel wurden mit unterschiedlichen Mengen an Antikörper beladen und anschließend im Durchflusszytometer nach Zugabe von Ziege-Anti-Maus-Antikörper auf die Beladungsintensität hin untersucht. Die Verwendung von 20 µg monoklonalem Antikörper für die Beladung von 100 µl Carboxyl-Partikel war am effektivsten, da bei diesem Verhältnis 99 % der Partikel mit Antikörpern beladen sind (siehe Abbildung 5). Alle weiteren Carboxyl-Partikel wurden auf Grundlage dieser Ergebnisse mit 20 µg Antikörper/100 µl Partikel gekoppelt.

Abbildung 5

Dargestellt sind Histogramme der durchflusszytometrischen Analyse von Carboxyl-Partikel, die mit unterschiedlichen Mengen an Anti-FITC-Antikörper (4 bis 20 µg/100 µl M270-Partikel) beladen wurden. Je höher die Beladung der Partikel mit Anti-FITC-Antikörper, desto intensiver wird das Signal im FACS, bis das Maximum der Beladung erreicht wird. Bei einer Kopplung von 20 µg Antikörper/100 µg Partikel zeigten die Partikel eine Beladung mit Antikörper von über 99 %.



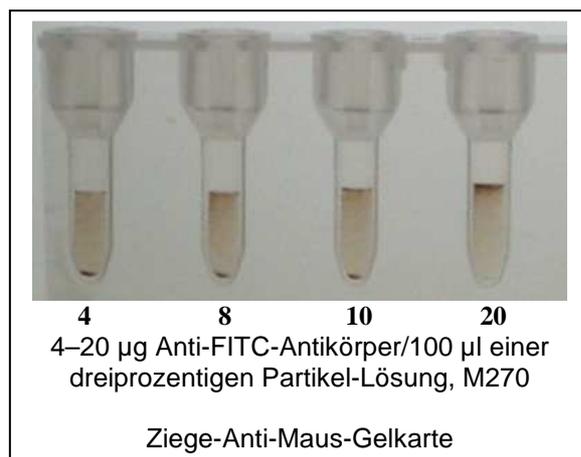
Für die Streptavidin-Kopplung haben wir 5 bis 10 μl Streptavidin-M280-Partikel (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany) mit 0,2 bis 1,4 μg biotinyliertem Antikörper (2 mg/ml, siehe 2.2.2) versetzt. Der Einsatz von 6 μl Streptavidin-Partikel versetzt mit 0,6 μg des biotinylierten Antikörpers für anti-FITC und anti-HNA-1a zeigten im Durchflusszytometer eine Beladung von 98 bis 99 % der Partikel. Diese Mengen von Partikeln und biotinylierten Antikörpern (anti-FITC und anti-HNA-1a) wurden für die Testungen im HPA- und HNA-1a-System verwendet.

3.2 Qualitätskontrolle der Partikel mit PaGIA

Nach jeder Beladung von Partikeln mit Antikörpern wurde zur Kontrolle die Gelkarte verwendet. In der Gelkarte konnte bei einer Beladung von 20 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ Partikel die stärkste Agglutination festgestellt werden (siehe Abbildung 6). 6 μl Streptavidin-Partikel versetzt mit 1 μl des biotinylierten Antikörpers für anti-FITC und anti-HNA-1a zeigten im PaGIA die stärkste Agglutination der Partikel. Dieses Ergebnis diente als Grundlage für die HPA-Typisierung.

Abbildung 6

Dargestellt ist die Beladungsstärke von Anti-FITC-Partikel im PaGIA



3.3 HNA-1a Phänotypisierung

Insgesamt wurden 147 Proben gesunder Blutspender auf HNA-1a mit dem PaGIA-System und der PCR-SSP typisiert. Zum Vergleich haben wir den monoklonalen Antikörper auf Streptavidin-Partikel und auf Carboxyl-Partikel gekoppelt. 77 der 147 untersuchten Proben wurden als HNA-1a-positiv unter Verwendung von Carboxyl-

Partikel im PaGIA typisiert. Der Vergleich von Carboxyl-Partikel-PaGIA mit der SSP-PCR-Typisierung ergab, dass die PaGIA in drei Fällen falsch positive Ergebnisse zeigte. Bei diesen unspezifischen Ergebnissen handelte es sich um leichte Agglutinationen bzw. Schleier in der Gelmatrix, die als positiv gewertet wurden. Mit dem Streptavidin-System konnten HNA-1a-positive Reaktionen klar von -negativen Reaktionen unterschieden werden. 74 der 147 untersuchten Proben wurden als HNA-1a-positiv ausgewertet. Der Vergleich mit der PCR-SSP ergab eine hundertprozentige Übereinstimmung. HNA-1a-negative Proben zeigten alle die Reaktionsstufe 1 und wurden als negativ ausgewertet (siehe Seite 43).

3.4 Untersuchung von HLA-PCR-Produkten mittels Checkgel

Die zu erwartenden Größen der PCR-Produkte für die HLA-Allele lagen zwischen 200 und 500 bp. Dies konnte in der Gelelektrophorese bestätigt werden. Insgesamt wurden 1 564 Proben für HLA-A, -B, -C, -DR, und -DQ von Patienten mit der Standard-Gelelektrophorese und der neuen PaGIA untersucht. Die Amplifikation von PCR-Produkten im PaGIA zeigte sich durch Agglutination von Streptavidin-Partikel auf oder in der Gelmatrix der Gelkarte (siehe Seite 40). Zur Erfassung der optimalen Amplifikationsmenge für den Partikeltest haben wir 1 bis 5 µl PCR-Produkt mit jeweils 5 µl Streptavidin-Partikel versetzt. Der Einsatz von 1 µl Amplifikat zeigte dabei ein sehr schwaches Signal, 3 µl hingegen führten zu spontaner Agglutination der Partikel im PaGIA. Die Verwendung von 2 µl Amplifikat auf 5 µl Streptavidin-Partikel erwies sich als optimales Verhältnis und wurde für alle Untersuchungen eingesetzt. Bei der Optimierung der PaGIA stellten wir fest, dass eine Inkubationszeit von Streptavidin-Partikeln und Amplifikationsprodukten unter 5 min bei 37 °C zu falsch negativen Ergebnissen führt. Alle Untersuchungen wurden mit einer Inkubationszeit von 15 min bei 37 °C durchgeführt. Der Vergleich der Ergebnisse der Gelelektrophorese und PaGIA für das HLA-System ergab eine hundertprozentige Übereinstimmung der 1 564 untersuchten Ansätze.

3.5 HPA Typisierung mittels PaGIA und Gelelektrophorese

Alle verwendeten Primer wurden aufgrund bekannter Polymorphismen zur allelspezifischen Amplifikation konstruiert. Durch Modifikation von Primern mit 5'-Biotin und den Einsatz in der PCR für das HPA-System wurden PCR-Produkte

amplifiziert, die Streptavidin-Partikel agglutinierten. Durch 5'-FITC-Primer für HGH wurden PCR-Produkte amplifiziert, die anti-FITC-beladene Carboxyl-Partikel agglutinierten. Um das optimale Primerverhältnis von HPA und HGH zu erfassen, haben wir 5 bis 30 pmol Primer in der PCR eingesetzt und die daraus resultierenden Amplifikate anschließend mit Streptavidin und anti-FITC-beladenem Carboxyl-Partikel versetzt und im PaGIA untersucht. Dabei stellten wir fest, dass 20 pmol für HPA-1, -2, -3, -4, -6 und 30 pmol für HPA-5 und -15 mit 8 pmol für HGH in der PCR das optimale Primerverhältnis sind. Der Einsatz der PaGIA zeigt, dass nur im Falle einer spezifischen Amplifikation von PCR-Produkten auch eine Agglutination stattgefunden hat (siehe Seite 37). Insgesamt haben wir 100 DNA-Proben auf HPA mit der neuen ID-PaGIA und der Standard-Gelelektrophorese typisiert und verglichen. Die Ergebnisse der beiden Methoden stimmten in allen untersuchten Proben überein. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse von 100 auf HPA typisierten Blutspendern aufgeführt.

Tabelle 3

HPA-Typisierung mittels PCR-PaGIA und Standard PCR-SSP (n = 100)

HPA-Type	Proben	HPA-Type	Proben	HPA-Type	Proben
HPA 1 a/a	75	HPA 3 a/b	45	HPA 5 b/b	1
HPA 1 a/b	24	HPA 3 b/b	18	HPA 6 a/a	100
HPA 1 b/b	1	HPA 4 a/a	100	HPA 6 a/b	0
HPA 2 a/a	84	HPA 4 a/b	0	HPA 6 b/b	0
HPA 2 a/b	16	HPA 4 b/b	0	HPA 15 a/a	25
HPA 2 b/b	0	HPA 5 a/a	80	HPA 15 a/b	48
HPA 3 a/a	37	HPA 5 a/b	19	HPA 15 b/b	27

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

In Tabelle 4 sind alle Ergebnisse der PaGIA-Testsysteme aufgeführt. Ausgenommen das „HNA-Carboxyl-Partikel“-Testsystem, das „nur“ eine Sensitivität von 96,1 % aufweist, erreichten alle anderen Verfahren eine Sensitivität von 100 %. Die Spezifität beträgt bei allen Anwendungen 100 %.

Tabelle 4

Testergebnisse und statistische Auswertung der Untersuchungen im Überblick

Testsystem	Proben/Loci	Falsch positiv	Falsch negativ	Sensitivität in %	Spezifität in %
HNA-Carboxyl-Partikel	147	3	0	96,1	100
HNA Streptavidin-	147	0	0	100	100
Checkgelsystem	608/1 564	0	0	100	100
HPA-Typisierung	100/1 400	0	0	100	100

4 Diskussion

4.1 Allgemeines

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, einfache und schnelle Testsysteme mit der Gelzentrifugationstechnik unter Verwendung synthetischer Partikel zu entwickeln. Hierbei sollten amplifizierte PCR-Produkte sowie das granulozytäre Alloantigen HNA-1a durch Visualisierung nachgewiesen werden. Basis für diese Testsysteme sollte jeweils die Gelzentrifugationstechnik sein, eine Technik, die bereits in vielen immunhämatologischen Einrichtungen etabliert ist. Somit ist die Durchführung dieser Methoden in einer großen Anzahl von Laboratorien weltweit erlaubt und schnell umsetzbar.

4.2 HNA-1a-Typisierung

Das HNA-1a Antigen liegt auf dem Fc γ -Rezeptor IIIb und wurde erstmalig im Zusammenhang mit einem Fall von Neonataler Immuneutropenie (NIN) beschrieben [43]. Es handelt sich bei der NIN um eine fetomaternale Inkompatibilität [44]. Die Mutter, die das HNA-1a Antigen nicht exprimiert, bildet während der Schwangerschaft Alloantikörper gegen das HNA-1a Antigen. Diese Antikörper werden diaplazentar auf den Fetus übertragen und führen zu einer Neutropenie des Kindes. Die NIN ist in ca. 20% der Fälle durch eine schwere Infektion gekennzeichnet. In der Regel bildet sie sich nach einigen Monaten spontan zurück. Schwerwiegender als die NIN ist die Transfusions-assoziierte akute Lungeninsuffizienz (TRALI). Beim TRALI werden mit Blutprodukten (v.a. Plasma) immunisierter Blutspender Alloantikörper, die vor allem gegen das HNA-3a Antigen gerichtet sind übertragen. Diese Antikörper führen zu einer Granulozytenaktivierung in den Kapillaren der Lunge, die eine lebensbedrohliche Lungeninsuffizienz zur Folge haben kann [45, 46].

Die einfache und schnelle Bestimmung der HNA Antikörper bei Blutspendern ist daher notwendig um das TRALI-Risiko zu senken. Die PaGIA ist eine Methode die eine schnelle Bestimmung von Antigenen ohne technischen Aufwand gewährleistet und kann zur Abklärung einer TRALI notwendig sein. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Agglutinationstests erfolgreich zur Phänotypisierung von thrombozytären und leukozytären Alloantigenen eingesetzt werden können [47, 48,

49]. In dieser Dissertation konnte herausgearbeitet werden, dass diese Methode auch erfolgreich zur Phänotypisierung des granulozytären Alloantigens HNA-1a eingesetzt werden kann. Inzwischen ist das HNA-3 Antigen entdeckt worden, so dass in absehbarer Zeit weitere monoklonale Antikörper zur Verfügung stehen um den beschriebenen PaGIA auf andere HNA-Antigene auszuweiten. Die Untersuchung kann aus Vollblut erfolgen und bedarf keiner zusätzlichen technischen Laborausstattung. In dringenden Fällen liegt das Ergebnis innerhalb weniger Minuten vor, während die Genotypisierung deutlich mehr Zeit in Anspruch nimmt (DNA-Isolierung, PCR, Gelelektrophorese). Die Phänotypisierung des HNA-1a-Antigens wurde mit streptavidinisierten und carboxylierten Partikeln im PaGIA durchgeführt, wobei die streptavidinisierten Partikel eindeutig als die besser geeigneten Partikel für das HNA-1a-System gewertet werden müssen, da mit diesen Partikeln eine diagnostische Sensitivität und Spezifität von 100 % erzielt wurde. Hingegen zeigten die carboxylierten Beads nur eine Sensitivität von 96,1 %.

Insgesamt wurden 147 Proben gesunder Blutspender auf das HNA-1a-Merkmal hin untersucht, von denen 74, das entspricht 50,3 %, das HNA-1a-Merkmal vorweisen. Unspezifische bzw. leichte Schleier bei der Anwendung von carboxylierten Partikeln im PaGIA könnten vielleicht durch Verbesserung der Kopplungs- bzw. Aufbewahrungspuffer vermieden werden.

4.3 Untersuchung von HLA-PCR-Produkten

HLA-PCR-Produkte, die mit dem RELI™ Kit amplifiziert wurden, brachten Fragmente zwischen 200 und 500 bp hervor und wurden im neuen Checkgel-System untersucht. Die Optimierung des Checkgels basierend auf der PaGIA-Technik ergab, dass eine Inkubationszeit der Streptavidin-Partikel mit den Amplifikationsprodukten unter fünf Minuten zu falsch negativen Ergebnissen führen kann. Falsch positive Ergebnisse hingegen können vermieden werden, wenn maximal 2 µl des PCR-Produkts mit Partikel zur Testung eingesetzt werden. Im PaGIA kann keine Aussage über die Fragmentgröße der PCR-Produkte gemacht werden, wodurch es theoretisch auch zu einer Agglutination der Partikel durch unspezifische PCR-Produkte kommen könnte. In unseren Versuchen wurde jedoch in keinem Fall die Amplifikation von unerwünschten Reaktionen beobachtet.

Die PaGIA ist zwar bei der Testung von 48 Loci um ca. 0,50 € teurer als die Standard-PCR-SSP, hat jedoch die Vorteile der geringeren Arbeitsschritte, des weniger apparativen Aufwandes sowie der Vermeidung krebserregender Substanzen (Ethidiumbromid). Die Zeitersparnis der Zentrifugation im PaGIA gegenüber der Gelelektrophorese macht sich bereits bei der Testung weniger Proben bemerkbar. Insgesamt haben wir 1 564 Loci von 608 Patienten im neuen Checkgel-System und der Gelelektrophorese untersucht, mit dem Ergebnis einer Übereinstimmung von 100%.

4.4 HPA-Genotypisierung

Die elektrophoretische Visualisierung von PCR-Produkten konnte durch den Einsatz biotinylierter bzw. FITC-markierter Primer und streptavidinierter bzw. anti-FITC-gekoppelter Partikel ersetzt werden. Das Vorliegen von PCR-Produkten führte zu einer Agglutinationsreaktion der Partikel, die durch den Einsatz der Gelzentrifugationsmethode einfach und objektivierbar darstellbar war. Insgesamt haben wir 100 Proben auf HPA-1, -2, -3, -4, -5, -6 und -15 untersucht. Die HPA-Inzidenz beträgt 0,99 und 0,25 für HPA-1a und 1b, 1 und 0,16 für HPA-2a und 2b, 0,82 und 0,63 für HPA-3a und 3b, 1 und 0 für HPA-4a und 4b, 0,99 und 0,2 für HPA-5a und 5b, 1 und 0 für HPA-6a und 6b, und 0,73 und 0,75 für HPA-15a und 15b. Vergleiche mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen für das HPA-System zeigten nahezu identische HPA-Muster für die europäische Bevölkerung [50, 51, 52]. Die parallele Untersuchung der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese mit anschließender UV-Visualisierung ergab in keinem Fall ein diskrepantes Ergebnis.

Die Methode ist einfach und schnell durchführbar und bedarf außer eines Thermocyclers keiner weiteren methodenspezifischen technischen Ausrüstung. Ein weiterer Vorteil ist der Verzicht auf toxische Substanzen wie Ethidiumbromid, deren Einsatz zusätzlicher arbeitssicherheitstechnischer Maßnahmen im Labor bedarf.

Um die Visualisierung der PCR-Produkte im Agglutinationstest jedoch gewährleisten zu können, war es erforderlich, höhere Primerkonzentrationen einzusetzen. Die Kosten für die beschriebene Agglutinationsmethode sind für die Typisierung der Antigene HPA-1, -2, -3, -4, -5, -6 und -15 für einen Blutspender um 3 € höher als für

die Standardmethode mit Gelelektrophorese, sodass der Einsatz der Methode für Labors geeignet erscheint, die nur gelegentlich PCR-Diagnostik durchführen.

Der entscheidende Vorteil der PaGIA gegenüber der PCR-SSP ist, dass Arbeitsschritte der Gelelektrophorese wegfallen und dadurch eine Zeitersparnis vorliegt. Vergleicht man hingegen die PaGIA mit der Real Time PCR, so zeigt sich, dass letztere einen geringeren Arbeitsaufwand bedingt, denn die PCR-Amplifikation wird zeitnah anhand von Schmelzkurven dargestellt und analysiert. Spezielle Real Time PCR-Verfahren wie die TaqMan-PCR ermöglichen außerdem die Analyse zahlreicher DNA-Proben in einem Lauf und den Einsatz unterschiedlicher Sonden für verschiedene SNPs in einem Ansatz. Ein anderes Verfahren wie beispielsweise die „Rapid-cycle-PCR“-Technik ermöglicht es, eine PCR innerhalb von zehn Minuten durchzuführen [53, 54, 55], wodurch sich der Vorteil der Zeitersparnis im PaGIA-System weiter relativiert.

Moderne Chiptechnologien haben noch weitere Vorteile, wie die wirtschaftlichen Aspekte, gegenüber der PaGIA. Bei den Mikroarray-Untersuchungen werden nur geringe Mengen an Enzymen, Primern und ddNTPs benötigt, wodurch sich ein enormer Kostenvorteil gegenüber der PaGIA ergibt. Ein weiterer Vorteil der Chiptechnologie ist der geringe Materialverbrauch. In Notfallsituationen, in denen der SNP-Status von Patienten schnell bestimmt werden muss, sind die Chiptechnologien allerdings durch den hohen Zeitaufwand unbrauchbar. Auch die Bestimmung einzelner SNPs wird sich mit den Chiptechnologien aufgrund des wirtschaftlichen Aspekts momentan nicht durchsetzen. Das PaGIA-System hingegen bietet kleinen Laboren, die schnell z. B. die Typisierung einzelner Patienten-SNPs mit einem herkömmlichen PCR-Cycler durchführen und dabei den Umgang mit krebserregendem Ethidiumbromid vermeiden möchten, eine ideale Plattform.

4.5 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie verdeutlichen das Potential der PaGIA für die Routinediagnostik, das sich in der hohen Sensitivität und Spezifität sowie in Rentabilität, Reliabilität, Schnelligkeit und Anwenderfreundlichkeit niederschlägt.

Um das PaGIA-System gegenüber der Real Time PCR oder Chiptechnologie konkurrenzfähiger zu machen, wurden inzwischen Entwicklungen unternommen, (Symbion Medical Systems, Avenches, Schweiz) die PaGIA-Technik für höhere Probendurchsätze umzustrukturieren. Dies wird durch eine Umgestaltung der Gelkarte möglich, sodass pro Karte mehr als sechs Proben analysiert werden können. Die ersten umstrukturierten Gelkarten für Blutgruppenautomaten werden voraussichtlich in diesem Jahr zur Verfügung stehen und können auch für die HPA-Genotypisierung eingesetzt werden. Voraussetzung dafür ist, den Reaktionsraum der PaGIA so zu verkleinern, dass geringere Mengen an Partikel und dadurch kleinere PCR-Volumina eingesetzt werden können. Zu bedenken ist jedoch, dass für eine kleinere Gelkarte die gesamten Bedingungen (Zentrifugationszeit und Zentrifugationsgeschwindigkeit) neu eingestellt und optimiert werden müssten, um die gleiche Sensitivität und Spezifität dieser Technik zu gewährleisten. Die Gelsäule zu verkleinern wird die Gesamtkosten durch die damit verbundene Materialersparnis, verringern.

Einen weiteren Vorteil könnte die PaGIA in „Dritte-Welt-Ländern“ gegenüber Standard-Geno- und Phänotypisierungsmethoden bieten, denn theoretisch benötigt man für die Typisierungen keinen elektrischen Strom. Mithilfe der ChargeSwitch Beads (Invitrogen) kann die Isolierung von DNA und RNA ohne Strom mit magnetischen Beads erfolgen. Hohe Zentrifugationsgeschwindigkeiten, die beispielsweise bei säulenbasierten DNA- und RNA-Techniken (z. B. QIAGEN) benötigt werden, wären nicht mehr nötig. Durch den Einsatz von Wasserbädern für die verschiedenen Inkubationsschritte wäre sogar eine PCR möglich. Der Nachweis mit PaGIA könnte zum einen durch eine Kartenzentrifugation mit einer Kurbelwelle erfolgen oder über einen kartenoptimierten Magneten, der nicht aggregierte Beads nach unten zieht, wobei aggregierte Beads durch den Magneten das Gel nicht passieren könnten. Wichtige Untersuchungen könnten also unabhängig von der Infrastruktur durchgeführt werden und würden sich, wenn weitere monoklonale Antikörper entwickelt würden, höchstwahrscheinlich schnell durchsetzen.

5 Anteilserklärung

Der Promovend hatte folgenden Anteil an den eingereichten Publikationen:

Publikation 1:

Meyer O, Abou-Chaker K, Heymann G, Bombard S, Kiesewetter H, Salama A: Human platelet antigen genotyping by using sequence-specific primers and the particle gel agglutination assay, Vox Sanguinis 2005; 88: 271-274.

70 %

Beitrag im Einzelnen:

Herr Khalil Abou-Chaker war an der Idee, am Design der Primer an der Durchführung der Versuche und an der Erstellung der Publikation maßgeblich beteiligt und mit Herrn Oliver Meyer wie in der Arbeit erwähnt als Erstautor geführt.

Publikation 2:

Schönemann C, Abou-Chaker K, Meyer O, Salama A: Application of the particle gel agglutination system as a new check gel assay for pcr, International Journal of Immunogenetics 2007; 34: (5), 337–339.

70 %

Beitrag im Einzelnen :

Herr Khalil Abou-Chaker war an der Idee, an der Durchführung der Versuche und an der Erstellung der Publikation maßgeblich beteiligt und mit Frau Constanze Schönemann wie in der Arbeit erwähnt als Erstautor geführt.

Publikation 3:

Abou-Chaker K, Meyer O, Salama A: Rapid typing of the Human Neutrophil Antigen 1a (HNA-1a) by the Particle Gel Agglutination Assay, Tissue Antigens 2009; 73: 242–244.

80 %

Beitrag im Einzelnen:

Herr Khalil Abou-Chaker war an der Idee, an der Versuchsdurchführung und der Etablierung der Methode für HNA-1a maßgeblich beteiligt.

Unterschrift, Datum und Stempel
des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

6 Liste ausgewählter Publikationen

Publikationen	Impact-Faktor
<p>Meyer O, Abou-Chaker K, Heymann G, Bombard S, Kiesewetter H, Salama A: Human platelet antigen genotyping by using sequence-specific primers and the particle gel agglutination assay, <u>Vox Sanguinis</u> 2005; 88: 271-274.</p>	<p>1,888</p>
<p>Schönemann C, Abou-Chaker K, Meyer O, Salama A: Application of the particle gel agglutination system as a new check gel assay for pcr, <u>International Journal of Immunogenetics</u> 2007; 34: (5), 337–339.</p>	<p>1,279</p>
<p>Abou-Chaker K, Meyer O, Salama A: Rapid typing of the Human Neutrophil Antigen 1a (HNA-1a) by the Particle Gel Agglutination Assay, <u>Tissue Antigens</u> 2009; 73: 242-244.</p>	<p>2,245</p>

7 Vollständige Publikationsliste

- Meyer O, Abou-Chaker K, Heymann G, Bombard S, Kiesewetter H, Salama A: Human platelet antigen genotyping by using sequence-specific primers and the particle gel agglutination assay, Volume 88 Issue 4 Page 271 - May 2005 Vox Sanguinis
- Schönemann C, Abou-Chaker K, Meyer O, Salama A: Application of the particle gel agglutination system as a new check gel assay for pcr, International Journal of Immunogenetics 34 (5), 337–339 doi:10. 2007
- Abou-Chaker K, Meyer O, Salama A: Rapid typing of the Human Neutrophil Antigen 1a (HNA-1a) by the Particle Gel Agglutination Assay, Tissue Antigens 73, 242-244, 2009

8 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9 Selbstständigkeitserklärung

Ich, Khalil Abou-Chaker, erkläre, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Entwicklung eines Partikel-Gel-Agglutinationstests zum Nachweis von Einzelnukleotidpolymorphismen und zur Phänotypisierung granulözytärer Antigene“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, die Arbeit ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Abdulgabar Salama, Leiter der Transfusionsmedizin – Charité Campus Virchow-Klinikum möchte ich für die Bereitstellung des Themas dieser Dissertation, für das Vertrauen in meine Person und für seine Kompetenz und Freundlichkeit ganz herzlich danken.

Herrn Dr. Oliver Meyer möchte ich für die Betreuung meiner Promotion recht herzlich danken, insbesondere für die Einarbeitung in serologische Methoden und in Methoden der Durchflusszytometrie.

Ganz besonders möchte ich Herrn Dipl. Ing. Julian Milz und Frau Dr. Sandra Kamhi für die Zusammenarbeit, die vielen fachlichen Diskussionen und die Einarbeitung in die Molekularbiologie danken.

Bei Frau Dr. Constanze Schönemann und dem gesamten DNA-Labor möchte ich mich für die freundliche Zusammenarbeit und die Bereitstellung von Verbrauchsmaterial und Apparaturen bedanken.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Dr. Salih Jüreck für sein medizinisches Fachwissen, das für diese Arbeit benötigt wurde,

Dem gesamten Thrombozytenlabor möchte ich für die gute Zusammenarbeit und das sehr freundliche und kollegiale Arbeitsklima danken.

Mein ganz herzlicher Dank gilt ebenso Herrn Dr. Ziyad Abdallah für die langjährige Zusammenarbeit und unsere Freundschaft.

Der höchste Dank gilt meiner Familie, meiner Frau Lynda, meiner Tochter Fatme und meinen Söhnen Assad und Jamal.

Meinen Eltern ist diese Arbeit gewidmet.

11 Literatur

1. Lapiere Y, Regal D: The gel Test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions. *Transfusion* 1990; 30: 109–113
2. Stewart MK: Rapid detection of anticardiolipin antibodies *Am J. Hematol.* 1998 Apr; 57(4):315–9
3. Meyer O, Salama A: rapid detection of heparin-induced platelet antibodies with particle gel immunoassay (ID-HPF4). *The Lancet* 1999; 354: 1525
4. Salama A, Schwindt P: Rapid detection of antibodies to immunoglobulin A molecules using the particle gel immunoassay. *Vox Sang* 2001; 81: 45–48.
5. Schwindt P, Seltsam A: Rapid detection of autoantibodies to dsDNA with the particle gel immunoassay (ID-PaGIA). *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 367–369.
6. Meyer O, Abou-Chaker K, Salama A: Human platelet antigen genotyping by using sequence-specific primers and the particle gel agglutination assay. *Vox Sang* 2005; 88: 271–274.
7. Schönemann C, Abou-Chaker K, Meyer O, Salama A: Application of the particle gel agglutination system as a new check gel assay for pcr, *International Journal of Immunogenetics* 2007; 34 (5), 337–339 doi:10.
8. Abou-Chaker K, Meyer O, Salama A: Rapid typing of the Human Neutrophil Antigen 1a (HNA-1a) by the Particle Gel Agglutination Assay, *Tissue Antigens* 2009;73, 242–244.
9. Kiefel V: The MAIPA assay and its applications in immunohematology. *Transfus Med* 1992; 2:181–188.
10. Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, Mueller-Eckhardt C: Monoclonal antibody specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood* 1987; 70: 1722–6.
11. Nguyen XD, Dugrillon A, Beck C, Kerowgan M, Klüter H: A novel method for simultaneous analysis of specific platelet antibodies: SASPA. *Br J Haematol.* 2004; 127: 552–60.
12. Yomtovian R, Kline W, Press C: Severe pulmonary hypersensitivity associated with passive transfusion of a neutrophil-specific antibody. *Lancet* 1984; 1: 244–6.
13. Bux J, Chapman J: Report on the second international granulocyte serology workshop. *Transfusion* 1997; 37: 977–83.
14. Huisman JG: Immunoblotting: an emerging technique in immunohematology. *Vox Sang.*1986;50:129–36.
15. Mulder A, Van Leeuwen EF, Veenboer GJ, Tetteroo PA, Von dem Borne AE: Immunochemical characterization of platelet-specific alloantigens. *Scand J Haematol.* 1984; 33: 267–74.
16. Santoso S, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C: Immunochemical characterization of the new platelet alloantigen system Bra/Brb. *Br J Haematol.* 1989; 72: 191–8.
17. Bux J, Kober B, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C: Analysis of granulocyte-reactive antibodies using an immunoassay based upon monoclonal-antibody-specific immobilization of granulocyte antigens. *Transfus Med* 1993 Jun ; 3(2):157–62.
18. Nguyen DX, Stötzer F, Sachs U, Flesch B, Klüter H: A novel method for simultaneous analysis of specific granulocyte, Institute of Transfusion Medicine and Immunology, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany.
19. Lai E: Application of SNP technologies in medicine: lessons learned and future challenges. *Genome Res*2001; 11, 927–929.
20. Drmanac R, Sparks AB, Callow MJ, Halpern AL, Burns NL, Kermani BG, Carnevali P, Nazarenko I, Nilsen GB, Yeung G, Dahl F, Fernandez A, Staker B, Pant KP, Baccash J, Borchering AP, Brownley A, Cedeno R, Chen L, Chernikoff D, Cheung A, Chirita R, Curson B, Ebert JC, Hacker CR, Hartlage R, Hauser B, Huang S, Jiang Y, Karpinchyk V,

- Koenig M, Kong C, Landers T, Le C, Liu J, McBride CE, Morenzoni M, Morey RE, Mutch K, Perazich H, Perry K, Peters BA, Peterson J, Pethiyagoda CL, Pothuraju K, Richter C, Rosenbaum AM, Roy S, Shafto J, Sharanhovich U, Shannon KW, Sheppy CG, Sun M, Thakuria JV, Tran A, Vu D, Zaranek AW, Wu X, Drmanac S, Oliphant AR, Banyai WC, Martin B, Ballinger DG, Church GM, Reid CA: Human genome sequencing using unchained base reads on self-assembling DNA nanoarrays. *Science* 2010; 1;327,5961:78–81.
21. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 1989b; 874–879.
 22. Ronaghi M, Uhlén M, and Nyrén P: A Sequencing Method Based on Real-Time Pyrophosphate, *Science* 17 July 1998; Vol. 281. no. 5375, pp. 363 – 365.
 23. Ahmadian A, Gharizadeh B, Gustafsson A, Sterky CF, Nyren P, Uhlen M, and Lundeborg J: Single-nucleotide polymorphism analysis by Pyrosequencing. *Anal. Biochem* 2000; 280, 103–110.
 24. Tyagi S, and Kramer FR: Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization, *Nature Biotechnology* 1996; 14:303–308.
 25. Tyagi S, Diana P, Kramer FR: Multicolor molecular beacons for allele discrimination, *Nature Biotechnology* 1998; 16:49–53.
 26. Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE. Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85:8790–8794.
 27. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ: The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 1997; 22:176–181.
 28. Joseph G, Lawrence H, Brody C, Chee MS, Stephen PA, Collins F: Detection of heterozygous mutations BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis, *Nature Genetics* 1996;14:441–447.
 29. Elizabeth A. Winzeler DR, Conway AR, Goldstein AL, Kalman S, McCullough MJ, McCusker JH, Stevens DA, Wodicka L, Lockhart DJ, Davis RW: Direct Allelic Variation Scanning of the Yeast Genome, *Science* 1998; 281:1194–1197.
 30. Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R, Ghandour G, Perkins N, Winchester E, Spencer J, Kruglyak L, Stein L, Hsie L, Topaloglou T, Hubbell E, Robinson E, Mittmann M, Morris MS, Shen N, Kilburn D, Rioux J, Nusbaum C, Hudson S, Lipshutz R, Chee M, Lander ES: Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome, *Science*, May 1998; 280: 1070–1082.
 31. Avent ND, Martinez A., Flegel WA., Olson ML, Scott ML, Nogues N, Pisacka M, Daniels GL, Muniz-Diaz E, Madgett TE, Storry JR, Beilboer S, Maaskant-van Wijk PM, von Zabern I, Jimenez E, Tejedor D, Lopez M, Camacho E, Cheroutre G, Hacker A, Jinoch P, Svobodova I, van der Schoot E, de Haas M. The Bloodgen Project of the European Union, 2003–2009. *Transfus Med Hemother* 2009; 36:162–167.
 32. Southern EM, Maskos U, Elder JK: Analyzing and Comparing Nucleic Acid Sequences by Hybridization to Arrays of Oligonucleotides: Evaluation Using Experimental Models, *Genomics* 1992; 13:1008–1017.
 33. Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP, Fodor SP: Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis, *Natl. Acad. Sci* 1994; 91: 5022–5026.
 34. Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR, Lockhart DJ: High density synthetic oligonucleotide arrays, *nature genetics supplement* 1999; 21:20–24.
 35. Grago F, Karpasitou K, Poli F. microarray beads for identifying blood group single nucleotide polymorphisms. *Transfus Med Hemother* 2009; 36;157–160.

36. Guttridge MG, Burr C, Klouda PT: Identification of HLA-B35, B53, B18, B5, B78, and B17 alleles by the polymerase chain reaction using sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens* 1994; 44(1):43–46.
37. Smillie DA: PCR-SSP method for detecting the Cys282Tyr mutation in the HFE gene associated with hereditary haemochromatosis. *Mol Pathol.* 1997; 50(5):275–276.
38. Witter K, Wölpl A, Zahn R, Klein HG, Albert ED: Sequence-based typing confirmed a novel B*40 allele, B*4046, which was identified through sequence-specific oligonucleotide hybridization routine typing. *Tissue Antigens* 2004; 63(4):378–81.
39. Meyer O, Hildebrandt M, Schulz B, Blasczyk R, Salama A: Simultaneous genotyping of human platelet antigens (HPA) 1 through 6 using new sequence-specific primers for HPA-5. *Transfusion* 1999; 39: 1256–8.
40. Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P: Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Bio Techniques* 1997; 22, 474–481.
41. Jordan F, McWhinnie AJ, Turner S et al. Comparison of HLA-DRB1 typing by DNA-RFLP, PCR SSO and PCR-SSP methods and their application in providing matched unrelated donors for bone marrow transplantation. *Tissue Antigens* 1995; 45: 103.
42. Saiki R K, Walsh P S, Levenson C H, & Ehrlich H A: Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences: USA* 1989; 86, 6230.
43. Lalezari P, Nussbaum M, Gelman S, Spaet TH: Neonatal neutropenia to maternal isoimmunisation. *Blood* 1966; 15: 236–243.
44. Payne R, Rolfs MR: Fetomaternal leukocyte incompatibility. *J Clin Invest* 1958; 37: 1756–1763.
45. Bernhand RD: Indiscriminate transfusion a critique of case reports illustrating hypersensitivity reactions. *NY State J Med* 1975; 51: 2399-2402.
46. Popovsky MA, Moore SB: Diagnostic and pathogenetic considerations in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion* 1985; 25: 573-577,
47. Meyer O, Agaylan A, Schonemann C, Kiesewetter H, Salama A: Application of the particle gel agglutination assay in the typing of single human leucocyte antigens. *Tissue Antigens* 2008; 71: 157–9.
48. Meyer O, Agaylan A, Bombard S, Kiesewetter H, Salama A: A novel antigen-specific capture assay for the detection of platelet antibodies and HPA-1a phenotyping. *Vox Sang* 2006; 91: 324–30.
49. Meyer O, Abdallah Z, Schonemann C: A simple and practical agglutination assay for human leucocyte antigen-B27 typing. *Vox Sang* 2006; 91: 77–80
50. Mollison PL, Engelfriet CP, Contreras M: *Blood transfusion in clinical medicine* 1997; 10th ed. Oxford:Blackwell Science.
51. Kim HO, Jin Y, Kickler TS, Blakemore K, Kwon OH & Bray PF Gene frequencies of the five major human platelet antigens in African American, white, and Korean populations. *Transfusion* 1995; 35, 863–867.
52. Meyer O, Hildebrandt M, Schulz B, Blasczyk R, Salama A: Simultaneous genotyping of human platelet antigens (HPA) 1 through 6 using new sequence-specific primers for HPA-5. *Immunohematology* 1999; 39:1256–1258.
53. Wittwer CT, Fillmore GC, Garling DJ: Minimizing the time required for DNA amplification by efficient heat transfer to small samples. *Analytical Biochemistry*, Volume 186, Issue 2, 1 May 1990, Pages 328–331.
54. Marla JL, Wittwer CT: Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR *Clinical Chemistry* 43:12; 2262–2267; 1997.
55. Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, Wittwer C. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clin Chem.* 2004 Jul; 50(7):1156–64.