

IMMUNOLOGIE

ABO-BLUTGRUPPENSYSTEM

A. BIOCHEMISCHE GRUNDLAGEN

Blutgruppen beschreiben genetisch bedingte, antigene Eigenschaften des Blutes, die eine serologische Unterscheidung verschiedener Antigene innerhalb eines jeweiligen Blutgruppensystems ermöglichen. Die Blutgruppeneigenschaften sind konstante Merkmale, die sich während des Lebens eines Individuums nicht ändern und nach den Mendelschen Gesetzen vererbt werden.

Eine Kenntnis der Blutgruppe ist wichtig zur *Feststellung der Gewebeverträglichkeit* (Histokompatibilität) vor Bluttransfusionen und Transplantationen von Geweben und Organen oder zur *Identifizierung von Individuen*, z.B. zum Vaterschaftsnachweis (Abstammungsnachweis) oder in der *Kriminalistik* (forensische Biochemie) und auch in *anthropologischen* Studien.

Die Blutgruppen werden durch Blutgruppenantigene festgelegt. Blutgruppenantigene auf der Oberfläche von Erythrozyten, aber auch von Leukozyten und Thrombozyten, können entweder Kohlenhydrate oder Proteine sein, die als Oberflächenstrukturen die Strukturdeterminanten für eine Reaktion mit einem entsprechenden Antikörper darstellen.

Beim Menschen sind 14 solcher Blutgruppen bekannt. Die wichtigsten Blutgruppen-Systeme sind das ABO-System und das Rh-System, weitere sind z.B. die MNSs-, P-Lutheran-, Kell-, Lewis, Duffy- und Kidd-Blutgruppensysteme. Das ABO- und Rhesus-System besitzen die höchste Antigenität und daher die größte Bedeutung.

Das ABO („A-B-Null“-)System wurde 1901 von dem österreichischen Bakteriologen Karl Landsteiner entdeckt. Dabei werden die vier Hauptgruppen A, B, 0 und AB unterschieden. Die Gene des ABO-Systems kodieren die *dominant vererbbaeren Merkmale* A und B sowie das *rezessiv vererbbaere* Merkmal 0. Da im Chromosomensatz eines Menschen immer zwei Allele dieses Gens vorliegen, ergeben sich folgende mögliche Genotypen:

| | | | |
|--------------|--------------|-----|----------------|
| A/A oder A/0 | Blutgruppe A | A/B | Blutgruppe A/B |
| B/B oder B/0 | Blutgruppe B | 0/0 | Blutgruppe 0 |

Personen mit der Blutgruppe AB haben von einem Elternteil das Merkmal A und vom anderen das Merkmal B geerbt. Ein Mensch mit der Blutgruppe 0 muss also das Merkmal 0 von beiden

Elternteilen geerbt haben wobei die Eltern selbst nicht der Gruppe 0 angehören müssen, jedoch Träger des rezessiven Merkmals 0 sind.

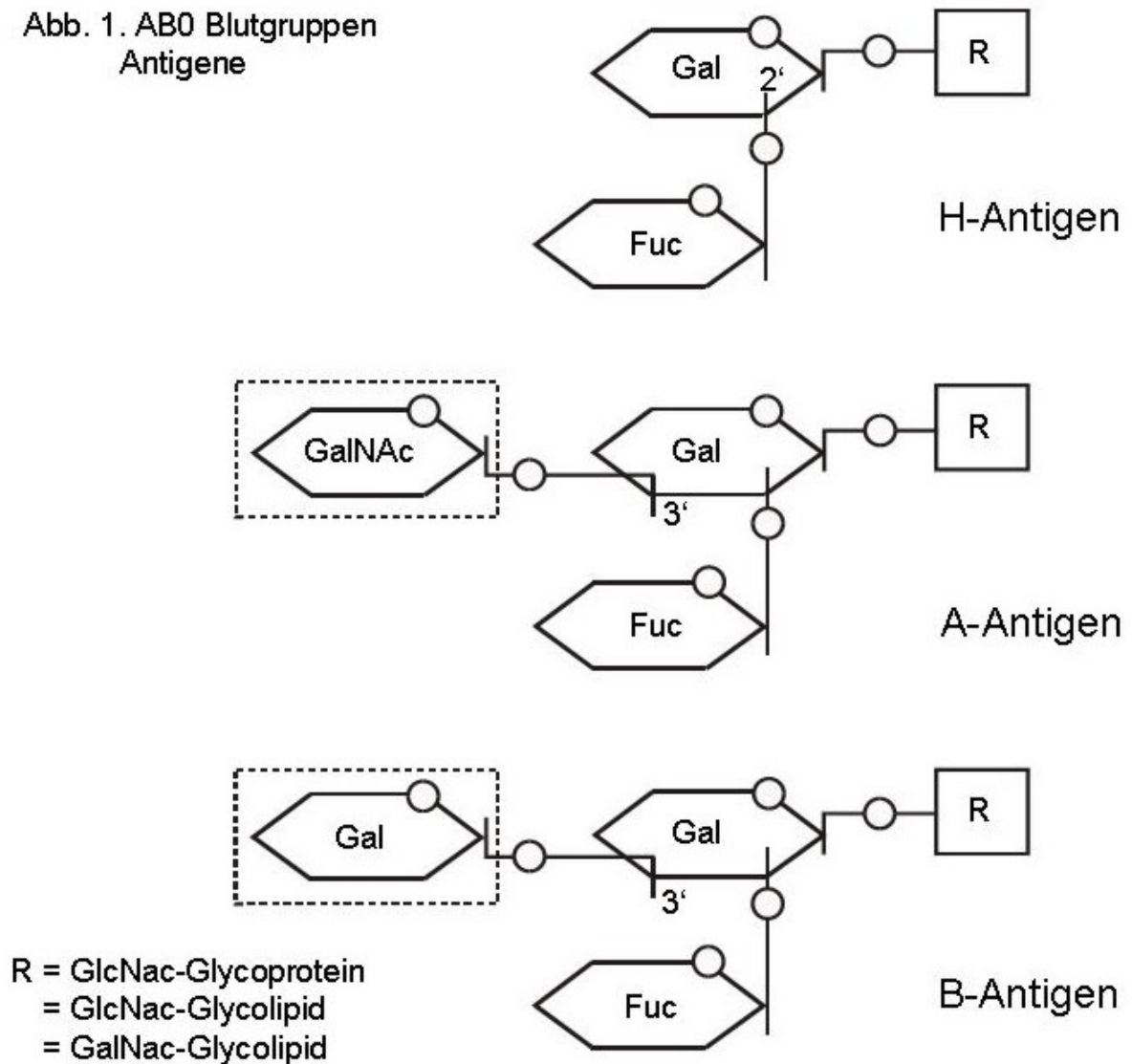
Des Weiteren können entsprechend den Mendelschen Vererbungsregeln bei Personen der Gruppe A oder B nicht beide Eltern der Gruppe 0 angehören. Mindestens bei einem Elternteil muss das Merkmal A oder B vorliegen. Entsprechend der Landsteinerschen Regel kommen im Serum eines Menschen immer die Antikörper vor, die mit dem Leben vereinbar sind, d.h. nicht zu einer Agglutination (Verklumpung) der eigenen oder gruppengleichen Blutkörperchen führen. Andererseits bedingt ein Kontakt zwischen Blut verschiedener Gruppen eine Verklumpung der Erythrozyten infolge der Antigen-Antikörper-Reaktion zwischen Blutgruppenantigenen auf der Zelloberfläche und Antikörpern im Serum. Dies wird als AB0-Inkompatibilität (AB0-Unverträglichkeit) bezeichnet. Sie ist bei Bluttransfusionen und gelegentlich in der Geburtshilfe zu beachten.

Blutgruppen-Antigene des AB0-Systems und ihre Struktur

Bei den Blutgruppenantigenen unterscheidet man das Trägermolekül und die antigene Determinante. Auf der Oberfläche der Erythrozytenmembran ist dieses Trägermolekül ein Sphingolipid, Ceramid, und seine primäre alkoholische OH Gruppe stellt die Bindungsstelle für Monosaccharide als die antigene Determinate dar. Vier verschiedene Monosaccharide sind beteiligt, Fucose, Galactose, N-Acetyl-D-Galactosamin und N-Acetyl-D-Glucosamin.

Die Biosynthese der Blutgruppenantigene erfolgt durch die Glykosyltransferasen, durch die schrittweise Monosaccharide an eine aus D-Galactose und N-Acetyl-D-Glucosamin bestehende Disaccharidgrundstruktur gehängt werden. Wird an das Galactosemolekül der Grundstruktur ein Fucosylrest 1,2-glycosidisch gebunden, so entsteht eine Struktur mit **H-Spezifität**. Dieses Oligosaccharid wird als **H-Antigen** bezeichnet und charakterisiert die **Blutgruppe 0**. Gegen diese Struktur werden im menschlichen Organismus **keine reaktiven Antikörper** gebildet.

Abb. 1. ABO Blutgruppen
Antigene



Bei der **Blutgruppe A** wird durch die Glykosyltransferase an die Position 3' der Galactose des H-Antigens ein weiterer Zuckerrest, ein N-Acetylgalactosamin (GalNAc), angehängt. Dieses Oligosaccharid bezeichnet man als **A-Antigen**.

Bei der **Blutgruppe B** wird an Stelle von GalNAc eine Galactose (Gal) angehängt (**B-Antigen**).

Diese endständigen GalNAc- bzw. Gal-Reste werden in einer enzymatischen Reaktion, katalysiert durch eine Glykosyltransferase, angehängt, deren unterschiedliche Substratspezifität das Ergebnis der Evolutionsbiologie des Menschen ist.

Beim **Genotyp A** besitzt die Transferase eine *N-Acetylgalaktosaminyltransferase-Aktivität* ("A-Transferase").

Beim **Genotyp B** ist das Gen im Exon 7 der Transferase mutiert, wodurch eine Aminosäure ausgetauscht wird. Dadurch verändert sich das aktive Zentrum des Enzyms; die Transferase

besitzt dann eine andere Substratspezifität, sie wird zur *Galaktosyltransferase* ("B-Transferase"). Diese Punktmutation verändert im Glykosyltransferase-Gen auch die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *MspI*, so dass die DNA dann nicht mehr geschnitten werden und dadurch zur Diagnose des Genotyps verwendet werden kann (Abb. 3, unten).

Beim **Genotyp 0** ist im Exon 6 des Transferase-Gens ein Nukleotid deletiert. Dies führt zu einer Leseraster-Verschiebung ("frameshift") und damit zur Produktion eines verkürzten, inaktiven Proteins. Außerdem entsteht durch diese Mutation die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *KpnI*, das zur Diagnose des Genotyps 0 verwendet werden kann (Abb. 3, oben).

Die unterschiedlichen Blutgruppen des AB0-Systems können sehr schnell und einfach durch einen Hämagglutinationstest abgeschätzt werden. Dieser gibt aber nur eine grobe Auskunft über den Phänotyp der jeweiligen Person. Anhand zahlreicher Mutationen im Gen der Glykosyltransferase, die aber phänotypisch oft nicht feststellbar sind, lässt sich heute darüber hinaus sehr detailliert der Blutgruppengenotyp einer Person feststellen (man unterscheidet nicht nur die Genotypen A, B und 0, sondern zusätzlich u. a. A1, A2, A3, Ax, B, B3, B(A), 01, 02, 03 und cis-AB). Mit Hilfe der PCR können zahlreiche dieser Merkmale zur genaueren genotypischen Charakterisierung einer Person herangezogen werden.

Theoretische Grundlagen

Chemische Natur von Antigenen, Antigenpräsentation, Zelluläre Komponenten des adaptiven Immunsystems, Prinzip der zellulären und humoralen Immunantwort, Antikörper-Struktur, Immunglobulinklassen, Entstehung der Antikörpervielfalt

B. ZIELSETZUNG DER EXPERIMENTE

In diesem Versuch wird die Bestimmung des AB0-Genotyps aus genomischer DNA einiger Praktikumssteilnehmer durchgeführt. Mutationen im Gen derselben Glykosyltransferase ändern die Spezifität des Enzyms, und der Nachweis dieser Mutationen im Gen der AB0-Glykosyltransferase mit Hilfe der PCR ermöglicht die Unterscheidung zwischen den Genotypen A, B und 0.

Abb. 2

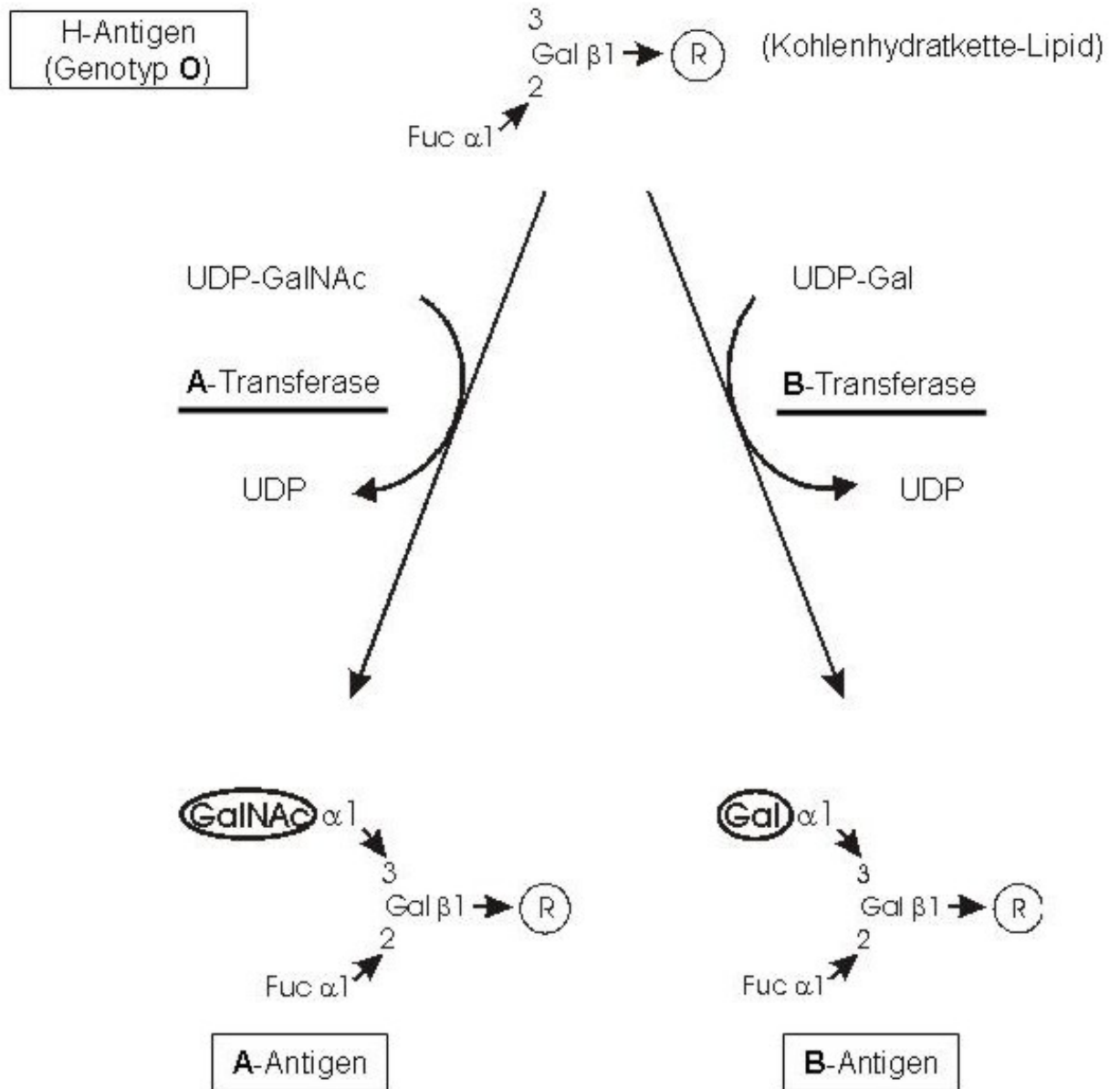
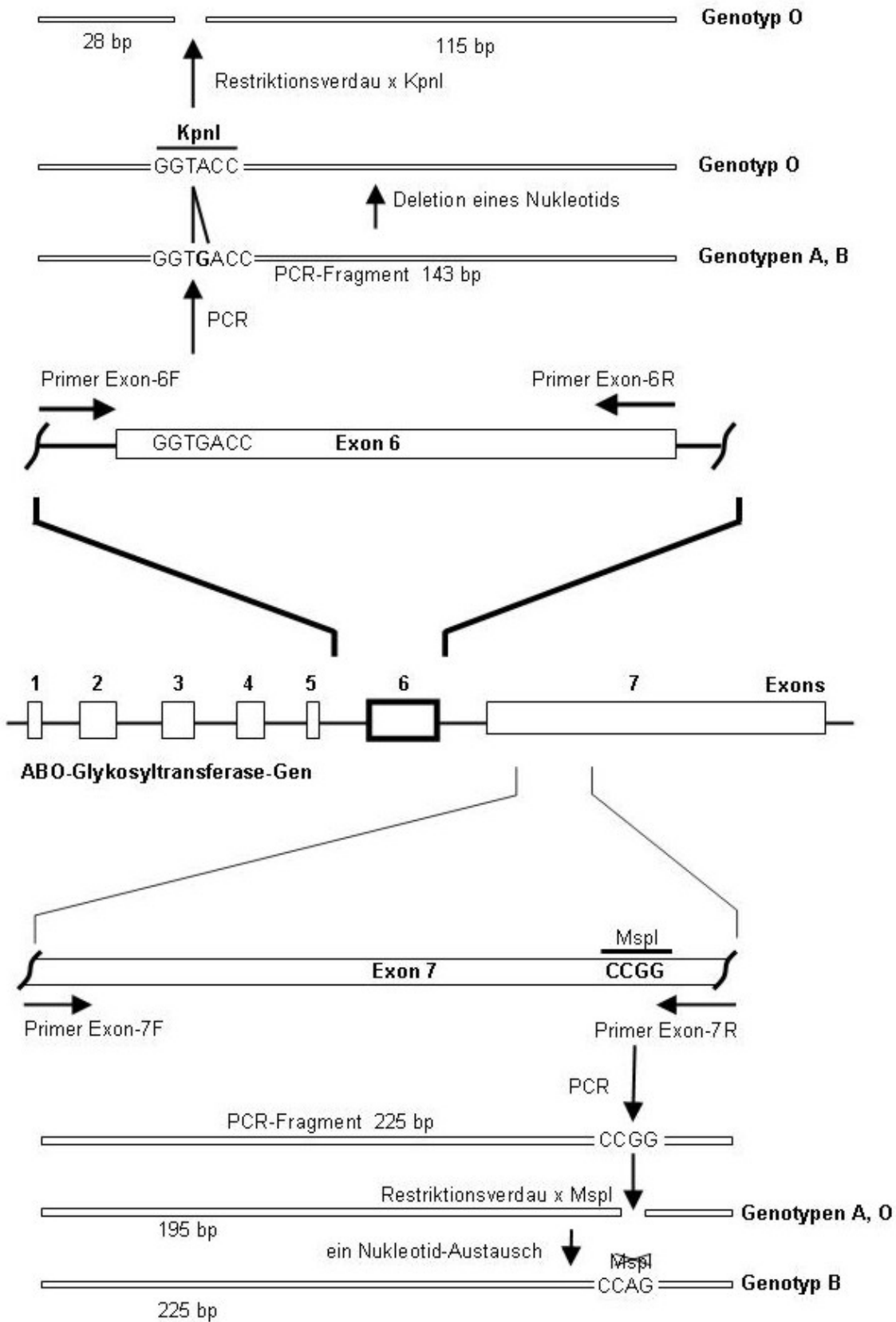


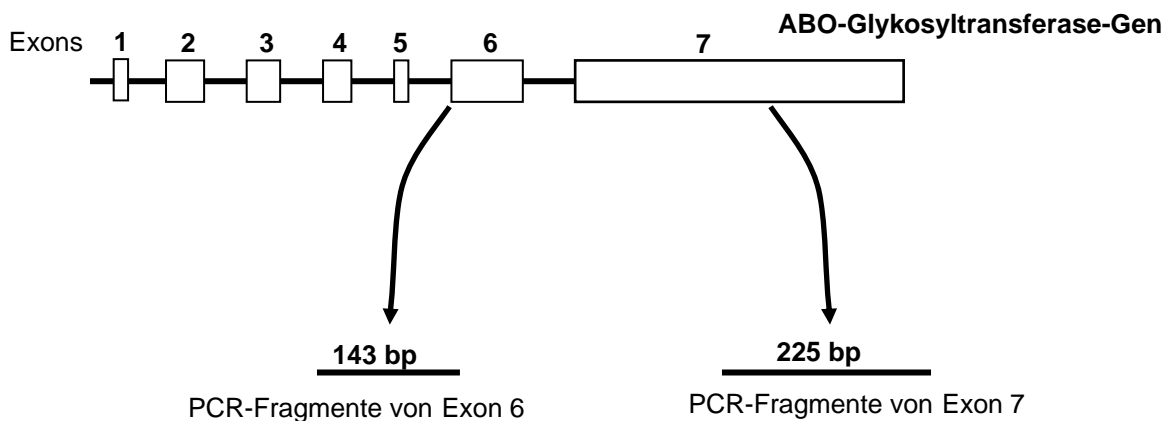
Abb. 3 Mutationen im Gen für die ABO-Glykosyltransferase und das Konzept der Bestimmung des ABO-Genotyps im Versuch.



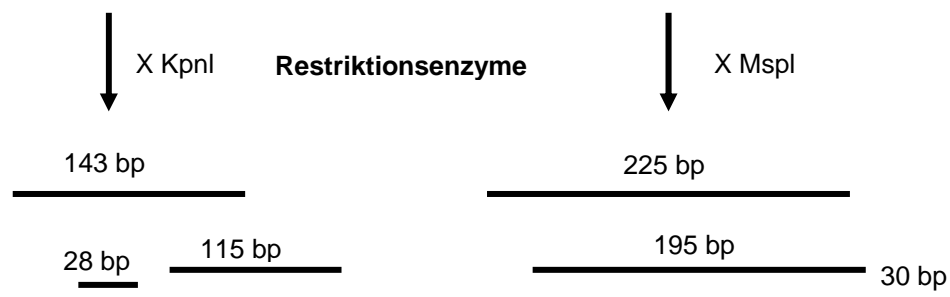
Im Versuch wird eine PCR mit isolierter genomischer DNA durchgeführt. Dabei werden zwei Primer-Paare eingesetzt. Durch das eine Primer-Paar (Exon-6 Primer) wird ein 143 Basenpaare (bp) langes PCR-Fragment vom Exon 6 des Glykosyltransferase-Gens amplifiziert, das nur im Falle des Genotyps 0 mit KpnI geschnitten werden kann (siehe Abb. 3). Durch das zweite Primer-Paar (Exon-7 Primer) wird vom Exon 7 ein PCR-Fragment amplifiziert, das sich bei den Genotypen A und 0 mit MspI schneiden lässt, nicht aber bei Genotyp B. Durch das Vorhandensein bzw. Fehlen dieser beiden Schnittstellen lässt sich der ABO-Genotyp genau bestimmen.

C. VERSUCHSDURCHFÜHRUNG UND VERSUCHSPROTOKOLL

- I. Isolierung genomischer DNA aus Blutzellen
- II. Mit dieser DNA werden zwei PCR-Reaktionen mit zwei Primer-Paaren durchgeführt, die Sequenzen im ABO-Gen erkennen, und zwar in den Exons 6 und 7.



- III. Die entstandenen PCR-Fragmente werden dann mit Restriktionsenzymen verdaut.



- IV. Die Fragmente werden in der Gel-Elektrophorese nach Größe aufgetrennt und sichtbar gemacht.

I. Isolierung genomischer DNA aus Blut

- a) In ein klares, steriles Reaktionsgefäß (2,2 ml) werden 30 µl 50 mM EDTA (als Antikoagulans) vorgelegt. Danach wird einem Studenten aus jeder Gruppe 300 µl Blut abgenommen (Handschuhe tragen!) und zu der vorbereiteten EDTA Lösung gegeben und gründlich gemischt. Zur hypotonen Hämolyse werden 200 µl 25 mM NaCl zugegeben und ca. 2 min bei Raumtemperatur inkubiert (Gemisch wird klar). Die Präparation muss dann unverzüglich fortgesetzt werden.
- b) Nach Ausgleich der Osmolarität im Ansatz durch Zugabe von 600 µl PBS500 (100 mM Na-Phosphat-Puffer pH 7,4 / 500 mM NaCl) wird die Leukozytenfraktion 1 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Den Überstand mit einer 200 µl Pipette vorsichtig abnehmen und verwerfen; am Gefäßboden verbleibt ein sehr kleines, rosa-weißliches Sediment.
- c) Dem Sediment werden nach Aufnehmen in 300 µl Lysepuffer (50 mM TrisHCl pH 7,5; 5 mM EDTA; je 0,1 % (v/v) TritonX-100, Nonidet P40 und Tween 20) zur Proteindenaturierung 300 µl Phenol (**giftig** und **ätzend**, Handschuhe und Schutzbrille tragen!) zugegeben. Nach gründlichem Mischen auf dem Wirbelmixer werden 1200 µl Chloroform addiert und erneut kräftig gemischt.
- d) Die Suspension wird 2 min zentrifugiert (dieser und alle weiteren Zentrifugationsschritte erfolgen bei max. Geschwindigkeit = 14.000 rpm = 20.000 g). Die entstandene klare Oberphase wird vorsichtig mit einer Pipette abgenommen (nichts von der trüben, schmierigen Interphase mitnehmen!) und zu einer (vorher in einem klaren 0.5 ml Reaktionsgefäß vorbereiten!) Mischung von 30 µl 3 M NaAcetat, (d.h. ca. 2 Tropfen) und 300 µl Isopropanol (fördert die Unlöslichkeit der mit Dextranblau versetzten DNA) gegeben, gründlich gemischt und zur Sedimentation der DNA 3 min zentrifugiert.
- e) Der Überstand wird mit einer 200µl Pipette vorsichtig abgenommen und verworfen. Zum Waschen der am Gefäßboden haftenden DNA werden 400 µl 70 % Ethanol zugegeben, kurz gemischt und 1 min zentrifugiert.
- f) Der Überstand wird komplett mit Hilfe einer Pipette abgenommen und verworfen, dabei darauf achten, dass die DNA nicht vom Gefäßboden gelöst wird! Die DNA soll ca. 5 min bei 60°C im offenen Reaktionsgefäß getrocknet werden. Abschließend wird die DNA in 60 µl TE-Puffer (10 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA) aufgenommen und 5 min bei 60 °C gelöst.

II. Ansetzen der PCR-Reaktionen

Pipettieren Sie in zwei **0,5 ml**-Reaktionsgefäße (jeweils ein Grünes und ein Blaues wählen, beschriftet mit Ihrer Platznummer und mit einem großen **P**) folgende PCR-Ansätze in der angegebenen Reihenfolge zusammen:

Reaktions-Ansatz für Exon 6:

1. 5,0 µl dNTPs
 2. 5,0 µl PCR-Puffer
 3. 5,0 µl der genomischen DNA
 4. 5,0 µl Exon **6**-Primer-Mix
 5. 5,0 µl Taq-Polymerase
- 25 µl Volumen

Reaktions-Ansatz für Exon 7:

- 5,0 µl dNTPs
 - 5,0 µl PCR-Puffer
 - 5,0 µl der genomischen DNA
 - 5,0 µl Exon **7**-Primer-Mix
 - 5,0 µl Taq-Polymerase
- 25 µl Volumen

Reaktionsansätze ab jetzt immer auf Eis halten!

Für die Amplifikation im Thermocycler wird das folgende PCR-Programm verwendet:

PCR-Programm:

1. Temp 96 °C (vollständige Denaturierung der DNA)
Time 02:00 (min)
2. Temp 94 °C (Denaturierungs-Schritt)
Time 00:30
3. Temp 61 °C (Hybridisierungs-Schritt)
Time 00:40
4. Temp 72 °C (Polymerase-Schritt)
Time 00:30
5. Schritte 2-4 werden 39 mal zyklisch wiederholt

III. Restriktionsverdau der PCR-Fragmente

1. Pipettieren Sie in zwei 0,5 ml-Reaktionsgefäße (jeweils ein Grünes und ein Blaues wählen, beschriftet mit Ihrer Platznummer und mit einem großen **R**) folgende Ansätze in der angegebenen Reihenfolge zusammen. Den verbleibenden Rest der PCR-Ansätze für die elektrophoretische Analyse aufheben.

Verdau-Ansatz für Exon 6:

- 5 µl Schneidepuffer (SP)
10 µl **des Exon 6** PCR-Ansatzes
5 µl Enzym-Mix 6 (KpnI)

Verdau-Ansatz für Exon 7:

- 5 µl Schneidepuffer (SP)
10 µl **des Exon 7** PCR-Ansatzes
5 µl Enzym-Mix 7 (MspI)

2. Die Ansätze werden durch Auf- und Abpipettieren gemischt (nicht schütteln!), kurz zentrifugiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

IV. Gel-Elektrophorese zur Analyse der DNA-Fragmente

1. Nach der Inkubation werden je 15 µl der unverdauten PCR-Ansätze und der Restriktionsansätze der einzelnen Gruppen mit 5 µl DNA-Probenpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen (2% Agarose in TBE/Ethidiumbromid-Puffer, **Handschuhe tragen!**)
2. Links auf dem Gel wird als Längenstandard ein DNA-Größenmarker aufgetragen (8 µl). Die Elektrophorese erfolgt 2 Stunden bei 150 V.

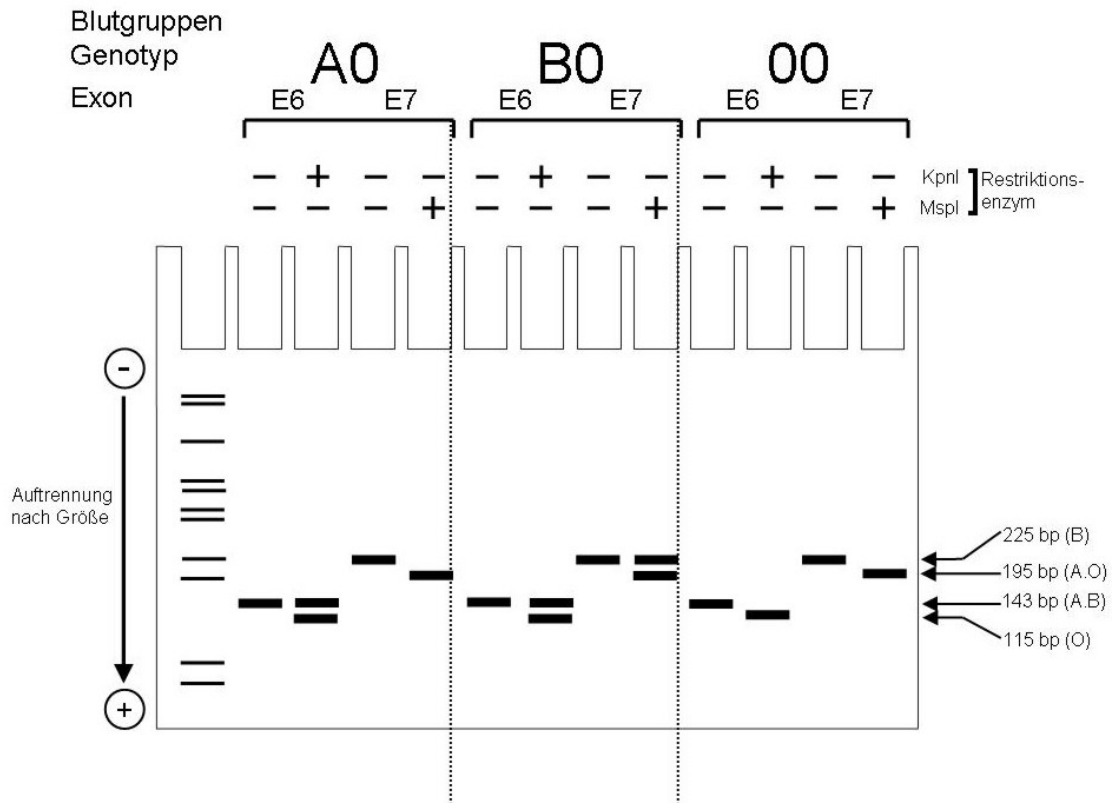
Reihenfolge des Gelauftragens

| | | | |
|---------------|--------------------|---------------|--------------------|
| Exon 6 | Exon 6 | Exon 7 | Exon 7 |
| PCR unverdaut | KpnI-Verdau | PCR unverdaut | MspI-Verdau |

D. AUSWERTUNG UND FEHLERDISKUSSION

Nach der Elektrophorese wird das Gel in einer Videodokumentationsanlage unter UV betrachtet und fotografiert (Handschuhe tragen)

Abb. 4 PCR-Fragmentmuster zur Auswertung der eigenen Blutgruppenanalyse



Oben ist schematisch das Ergebnis der Gelelektrophorese für die Genotypen A0, B0 und 00 gezeigt, die bei der Bewertung der eigenen Ergebnisse berücksichtigt werden soll. Die kürzesten DNA-Fragmente laufen aus dem Gel heraus, sind also nicht sichtbar.

E. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Zeichnen Sie Ihren Befund und stellen Sie Ihre Ergebnisse auch in einer Tabelle zusammen.