

Identifizierung von inhibitorischen Alloantikörpern gegen Faktor IX bei einem Patienten mit schwerer Hämophilie B

1. Zusammenfassung

Hämophilie B (HB) ist eine seltene, X-chromosomal vererbte Blutgerinnungsstörung, die durch Mutationen im *F9*-Gen und den daraus resultierenden Mangel an Faktor IX (FIX) verursacht wird. Die Standardtherapie erfolgt mittels intravenöser Substitution von FIX. Im Rahmen dieser Therapie entwickeln manche Patienten inhibitorische Antikörper vom Typ Immunglobulin G (IgG), die den infundierten Faktor neutralisieren können und so die bedeutendste Komplikation der HB-Therapie darstellen. Die dominierende Immunglobulin Gensequenz der IgG₁ Antikörper eines Patienten mit schwerer HB und rezidivierenden Inhibitoren wurde mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und familienspezifischen Primern amplifiziert. Die Amplifikation der variablen IgG₁-Gensegmente der leichten Kette sowie der Phagenvektor pComb3XSS wurden mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *XbaI* verdaut, ligiert und anschliessend mittels Elektroporation in *Escherichia coli* transformiert. Der pComb3XSS-Vektor mit ligierter Lambda-Leichtkette wurde erfolgreich transformiert, zeigte jedoch eine geringe Transformationseffizienz, wodurch das vollständige Fab-Repertoire mit der schweren Kette nicht rekonstruiert werden konnte.

2. Einleitung

Bei der Hämophilie unterscheidet man zwei Hauptformen: Hämophilie A (HA) und Hämophilie B (HB). HA ist deutlich häufiger als HB, da sie ungefähr 80 – 85% aller Hämophilie-Fälle ausmacht und HB lediglich 15 – 20% [1]. Von allen HB-Patienten entwickeln 1,5 – 3% Inhibitoren gegen FIX, wovon 9 – 23% sich bei schwerer HB entwickeln [2]. Schwere HB führt zu spontanen Blutungen, starken Schmerzen, erhöhter Morbidität, chronischen Behinderungen oder Tod [3]. Inhibitoren sind die bedeutendste Komplikation, da sie zum Versagen der konventionellen FIX-Ersatztherapie und somit zu vermehrt spontanen, schwierig zu kontrollierenden Blutungen führen. Der Goldstandard zur Behandlung von HB-Patienten mit Inhibitoren ist die Immuntoleranztherapie (ITI), die auf einer Kombination hochdosierter FIX-Substitution und begleitender Immunsuppression basiert [2]. IgG umfasst vier Subklassen (IgG₁₋₄) wobei die dominierende Klasse hier IgG₁ ist. Die variable Region der leichten Kette (VL) und der schweren Kette (VH) bilden die Antigenbindungsstelle (in diesem Fall FIX). VL bildet gemeinsam mit VH und der CH1-Domäne eine «Fragment Antigen-Binding» (Fab) Region, die die Spezifität des Antikörpers bestimmt. Gerüstregionen (engl. «Framework Region», FR) sind für die strukturelle Grundlage der VL- und VH-Domänen, sowie für die räumliche Anordnung der hypervariablen Regionen CDR1, CDR2,CDR3 (engl. «Complementarity-Determining Region») verantwortlich. CDR1-3 ermöglichen die spezifische Antigenerkennung und –bindung und weisen die höchste Sequenzvariabilität auf. Eine gesteigerte Antigenspezifität ist mit einer gesteigerten Affinitätsreifung assoziiert und ergibt eine höhere Mutationsrate in den CDR, insbesondere CDR3 der schweren Kette [4]. 50% der Mutationen in den FR unterliegen negativer Selektion [5].

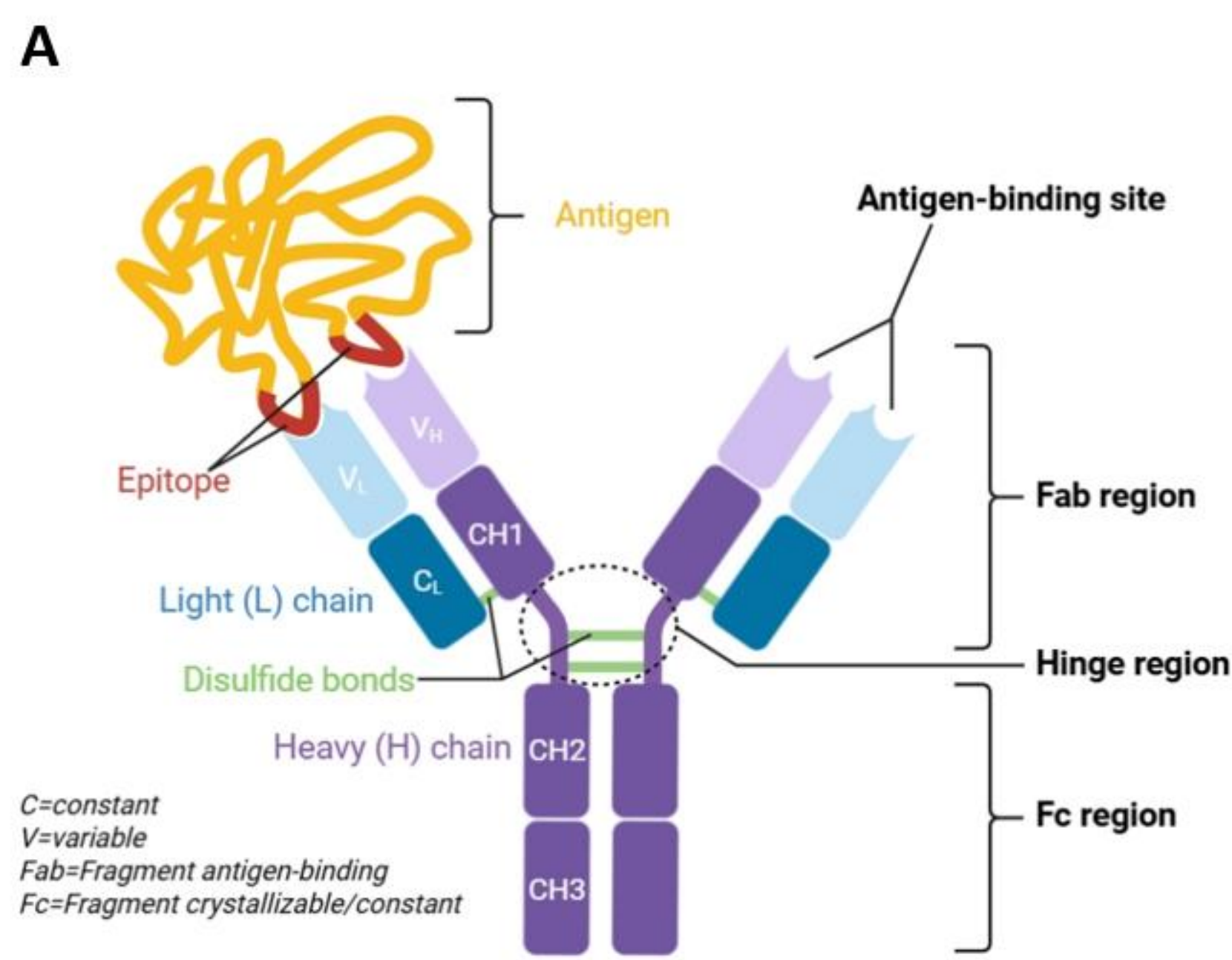


Abb. 1: Struktur von IgG (Colaku, 2026, eigene Darstellung erstellt mit BioRender.com)

3. Ziele und Fragestellungen

Ziel 1: Mittels Phagen-Display-Technologie die Fabs vom IgG₁ des Patienten identifizieren
Fragestellung 1: Kann man die IgG₁ Fabs des Patienten mittels Phagen-Display-Technologie identifizieren?

4. Material, Methodik, Vorgehen

Es handelt sich um eine Fallstudie, wobei der Fokus auf dem, bei der damaligen Blutentnahme, 25-jährigen Patienten mit schwerer HB und rezidivierenden Inhibitoren liegt (n=1). Mittels PCR und familien-spezifischen Primern (VH135, VH2, VH4, VH4b, VH4g, VH6, CG1d) wurde das gesamte IgG₁-Repertoire der *schweren Kette amplifiziert. Diese Primer gewährleisteten eine maximale Abdeckung aller bekannten Genfamilien der schweren Kette und generieren somit ein vielfältiges Antikörperrepertoire. Die amplifizierten leichten Ketten Kappa und Lambda sowie der Phagen-Vektor pComb3XSS wurden mittels der Restriktionsenzyme *SacI* und *XbaI* verdaut und ligiert. Danach erfolgte eine Transformation in *Escherichia coli* (spezifischer Stamm XL1-Blue Zellen) mittels Elektroporation [6]. Die transformierten Kolonien wurden für eine Sequenzierung an eine externe Firma eingeschendet. Die erhaltenen Daten wurden mit dem internationalen ImMunoGeneTics-Informationssystem (IMGT)/-V-Quest und den Keimbahn-V-Gensequenzen von *Homo sapiens* zur Identifizierung der entsprechenden Genabschnitte abgeglichen und Auskunft über mögliche abweichende Mutationen dargestellt.

*Leichte Ketten Kappa und Lambda wurden in einer vorherigen Arbeit bereits amplifiziert

5. Ergebnisse/ Resultate

Ein Klon der Lambda-Leichtkette wurde erfolgreich transformiert und in Abb. 2 sind die fünf Gene der IGLV3-Familie dargestellt, welche die höchste Sequenzhomologie mit diesem Klon aufweisen (IG = Immunglobulin, L = Light Chain/leichte Kette, V = Variable Region, 3 = Genfamilie, 21 = spezifisches Gen innerhalb der IGLV-Loci, *XY = Allel XY dieses Gens). Die vorhandenen Mutationen (nicht abgebildet) wurden auf die Aminosäuresequenz untersucht, wobei nur die Genfamilie mit der höchsten Identität (Identity Score) berücksichtigt wurde, in diesem Fall IGLV3-21*02. Es waren sowohl silent Mutationen als auch non-silent Mutationen vorhanden, wobei fast alle non-silent Mutationen in den FR lokalisiert waren.

		Score	Identity
Homsap	IGLV3-21*02 F	1124	93.19% (260/279 nt)
Homsap	IGLV3-21*03 F	1215	92.83% (259/279 nt)
Homsap	IGLV3-21*04 F	1188	91.76% (256/279 nt)
Homsap	IGLV3-21*01 F	1179	91.40% (255/279 nt)
Homsap	IGLV3-9*01 F	1053	86.38% (241/279 nt)

Abb. 2: Fünf Gene der IGLV3-Familie (Colaku, 2026, eigene Darstellung)

6. Diskussion

Die hohe Homologie der ersten fünf Sequenzen bestätigt die erfolgreiche Transformation der Lambda-Leichtkette sowie die Identifikation einer funktionellen Lambda-Leichtkette zur humanen IGLV3-21*02-Keimbahnsequenz. Dadurch konnte gezeigt werden, dass der gewählte experimentelle Ansatz grundsätzlich realisierbar ist. Die Ergebnisse sollten nicht überinterpretiert werden, weil bislang lediglich ein Klon der leichten Kette Lambda charakterisiert wurde und die schwere Kette nicht vorliegt. Dadurch konnten keine vollständigen Fab-Fragmente identifiziert werden. Da der Patient Anti-FIX-Antikörper aufweist, sind Mutationen zu erwarten, was mit den beobachteten Abweichungen von der Referenzsequenz übereinstimmt. Die Kombination aus schwerer und leichter Kette hätte möglicherweise eine höhere Mutationsrate ergeben, spezifisch in der CDR3 der schweren Kette. Die Mutationen, welche vorwiegend in den FR lokalisiert sind, unterliegen zu 50% negativer Selektion [5].

Referenzen

- [1] Srivastava et al., 2020, S. 19
- [2] Rodríguez-Merchán, 2022, S. 45-48
- [3] Booth et al., 2018, S. e322-e326
- [4] Murphy & Weaver, 2018, S. 222-225
- [5] Cohen et al., 2011, S. 1-2
- [6] Barbas & Burton, 1994, o. S.

Abbildungen

Abb. 1 Struktur von IgG, Colaku (eigene Darstellung, erstellt mit BioRender.com), 2026
Abb. 2 Fünf Gene der IGLV3-Familie, Colaku (eigene Darstellung), 2026