

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Transfusionsmedizin
-Direktor: Univ.-Prof. Dr.med. Dr.rer.nat. W.Sibrowski-

**Modifikation von Erythrozyten-Zell-Interaktionen durch
therapeutisch applizierbare Immunglobuline
der Isotypen IgG und IgM**

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des doctor medicinae dentium
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Rautmann, Rietje
aus Hannover
2007

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. V.Arolt

1.Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. W. Sibrowski

2.Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. J. Kienast

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2007

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Transfusionsmedizin
-Direktor: Univ.-Prof. Dr.med. Dr.rer.nat. W.Sibrowski-
Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. W. Sibrowski
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. J. Kienast

Zusammenfassung

Modifikation von Erythrozyten-Zell-Interaktionen durch therapeutisch applizierbare Immunglobuline der Isotypen IgG und IgM

Rautmann, Rietje

Einleitung: Das Verständnis der Pathophysiologie der Immunantwort gegen Erythrozytenantigene ist von wesentlicher Bedeutung für die Minimierung der immunologischen Risiken der Hämotherapie. Erythrozyten stehen bereits in ihrem physiologischen Milieu in Interaktion mit Zellen, die grundsätzlich zur Antigenpräsentation befähigt sind. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage,

(1) ob die Interaktion von Erythrozyten mit potentiell antigenpräsentierenden Zellen bei Patienten mit der IgM-vermittelten Kälteautoimmunhämolyse (CAD) oder IgG-vermittelten Wärmeautoimmunhämolyse (WAIHA) durch therapeutisch applizierbares IgM (IVIgM) oder IgG (IVIgG) beeinflussbar ist, und

(2) ob die Erythrozyten-Zell-Interaktion in Gegenwart von IVIgM und IVIgG im Vergleich zur Interaktion in Gegenwart von Normalplasma zu charakteristischen Veränderungen des Genexpressionsprofils der mit den Erythrozyten interagierenden Zellen führt.

Material und Methoden: Der für diese Arbeit gewählte methodische Ansatz kombiniert die biomolekulare Interaktionsanalyse und die Genexpressionsanalyse mit cDNA-Chips. Zur Untersuchung von Zell-Zell-Interaktionen wurde das offene Küvettensystem eines IASys®-single-well-Instrumentes eingesetzt. Die Genexpressionsanalyse wurde mit cDNA-chips der Firma Memorec durchgeführt.

Ergebnisse: (1) Die Interaktion von Erythrozyten mit für die Antigenpräsentation potentiell relevanten Zellen des peripheren Blutes ist bei Patienten mit Kälteautoimmunhämolyse und bei Patienten mit Wärmeautoimmunhämolyse durch IVIgM und IVIgG beeinflussbar. **IVIgG** supprimiert die Interaktion von Erythrozyten mit dendritischen Zellen des peripheren Blutes bei gesunden Probanden und bei Patienten mit WAIHA. **IVIgM** supprimiert die Interaktion von Erythrozyten mit mikrovaskulären Endothelzellen bei Patienten mit WAIHA und mit CAD. (2) Der hier etablierte experimentelle Ansatz erlaubt prinzipiell die Identifizierung von Markergenen, die für Erythrozyten-Zell-Interaktionen unter den verschiedenen Bedingungen charakteristisch ist.

Schlussfolgerung

- Für die Erythrozytenantigenpräsentation relevante Erythrozyten-Zell-Interaktionen werden durch die in die anti-erythrozytäre Immunantwort involvierten Antikörper-Isotypen IgM und IgG beeinflusst
- Die Applikation hochgereinigter IgG- und IgM-Poolpräparationen ist im Hinblick auf immunologisch und hämorheologisch relevante Erythrozyten-Zell-Interaktionen nicht inert.
- Das experimentelle Design dieser Studie erlaubt prinzipiell die Identifizierung verschiedener Marker-Gene für immunologisch und auch hämorheologisch relevante Erythrozyten-Zell-Interaktionen.
- Der im Rahmen der vorgelegten Arbeit etablierte experimentelle Ansatz ist damit prinzipiell geeignet,
 - die Rolle anti-erythrozytärer Autoantikörper für immunologisch und hämorheologisch relevante Erythrozyten-Zell-Interaktionen zu beschreiben,
 - die Rolle mikrovaskulärer Endothelzellen bei der Entstehung anti-erythrozytärer Immunantworten zu untersuchen und
 - Parameter für eine funktionelle Qualitätskontrolle zellulärer Blutkomponenten zu definieren.

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2007

Inhaltsübersicht

1	Einleitung	S. 01
1.1	Therapeutisch applizierbare Immunglobuline	S. 01
1.1.1	Übersicht	S. 01
1.1.2	Einsatz von IVIgG	S. 02
1.1.3	Einsatz von IVIgM	S. 04
1.2	Erythrozyten-Zell-Interaktionen	S. 05
1.2.1	Endothelzellen	S. 05
1.2.1.1	Anatomische und physiologische Charakteristika des vaskulären Endothels	S. 05
1.2.1.2	Immunologische Bedeutung des vaskulären Endothels	S. 06
1.2.1.3	Hämorrheologische Bedeutung des Endothels	S. 07
1.2.2	Monozyten	S. 07
1.2.3	Dendritische Zellen	S. 08
1.2.4	Antigenpräsentation im Kontext der Erythrozyten-Zell-Interaktionen	S. 09
1.3	Anti-erythrozytäre Autoimmunisierung	S. 11
1.3.1	Anti-erythrozytäre Wärmeautoantikörper	S. 12
1.3.2	Anti-erythrozytäre Kälteautoantikörper	S. 12
1.3.3	Einsatz therapeutisch applizierbaren Immunglobulins bei anti-erythrozytär autoimmunisierten Patienten	S. 12
1.4	Fragestellung der Arbeit	S. 13
2	Material und Methoden	S. 13
2.1	Untersuchung von Erythrozyten-Zell-Interaktionen unter Real-Time-Bedingungen	S. 13
2.1.1	Herkunft und Isolierung der untersuchten Zielzellen	S. 14
2.1.1.1	Isolierung mononukleärer Zellen aus Vollblut	S. 14
2.1.1.2	Isolierung von Monozyten	S. 14
2.1.1.3	Isolierung dendritischer Zellen des peripheren Blutes	S. 15
2.1.1.4	Endothelzellen	S. 16

2.1.1.5	Erythrozyten	S. 17
2.1.1.5.1	Gewaschene Erythrozyten aus EDTA-Blut	S. 17
2.1.1.5.2	Gewaschene Erythrozyten aus Erythrozytenkonzentraten	S. 17
2.1.1.5.3	Gewaschene Erythrozyten aus Erythrozytenkonzentraten, gepoolt	S. 18
2.1.1.6	Plasmapräparationen und therapeutische Immunglobuline	S. 18
2.1.2	Biomolekulare Interaktionsanalyse	S. 20
2.1.2.1	Prinzip der Messung	S. 20
2.1.2.2	Immobilisierung der Liganden	S. 22
2.1.2.3	Messzyklus	S. 27
2.2	Untersuchung der funktionellen Bedeutung der Erythrozyten- Zell-Interaktionen mit der Genchip-Analytik	S. 29
2.2.1	Untersuchung des Einflusses von Erythrozyten und unterschiedlichen Blutplasmen auf die Genexpression von Monozyten und Endothelzellen mittels PIQOR™ Immunology Microarray	S. 29
2.2.2	Präparation der RNA	S. 31
2.2.3	Hybridisierungen der PIQOR™ Microarrays	S. 32
2.2.4	Erstellung der Expressionsprofile	S. 33
2.2.5	Datenanalyse	S. 36
3	Ergebnisse	S. 37
3.1	Untersuchung von Erythrozyten-Zell-Interaktionen unter Real- Time-Bedingungen	S. 37
3.1.1	Validierung der Methodik	S. 37
3.1.1.1	Reproduzierbarkeit der Messungen	S. 37
3.1.1.2	Bindungsintensitäten bei 20°C und bei 37°C	S. 41
3.1.1.3	IVIgM / IVIgG Dosis-Wirkungs-Kurven	S. 41
3.1.2	Einfluss therapeutisch applizierbaren Immunglobulins bei gesunden Probanden auf Erythrozyten-Zell-Interaktionen	S. 44
3.1.2.1	Erythrozyten-HDMEC-Interaktionen	S. 44
3.1.2.2	Erythrozyten-DC-Interaktionen	S. 45

3.1.3	Einfluss therapeutisch applizierbaren Immunglobulins bei Patienten mit anti-erythrozytären Wärmeautoantikörpern auf Erythrozyten-Zell-Interaktionen	S. 47
3.1.3.1	Erythrozyten-HDMEC-Interaktionen	S. 47
3.1.3.2	Erythrozyten-DC-Interaktionen	S. 48
3.1.4	Einfluss therapeutisch applizierbaren Immunglobulins bei Patienten mit anti-erythrozytären Kälteautoantikörpern auf Erythrozyten-Zell-Interaktionen	S. 50
3.1.4.1	Erythrozyten-HDMEC-Interaktionen	S. 50
3.1.4.2	Erythrozyten-DC-Interaktionen	S. 51
3.2	Untersuchung der funktionellen Bedeutung der Erythrozyten-Zell-Interaktionen mit der Genchip-Analytik	S. 53
3.2.1	Einfluss therapeutisch applizierbaren Immunglobulins auf das Genexpressionsprofil von Endothelzellen im Kontext der Erythrozyten-Zell-Interaktionen	S. 53
3.2.2	Einfluss therapeutisch applizierbaren Immunglobulins auf das Genexpressionsprofil von Monozyten im Kontext der Erythrozyten-Zell-Interaktionen	S. 60
3.2.3	Vergleichende Analyse des Einflusses von IVIgG und IVIgM auf die während der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktionen regulierten Endothelzell-Gene	S. 66
3.2.4	Vergleichende Analyse des Einflusses von IVIgG und IVIgM auf die während der Erythrozyten-Monozyten-Interaktionen regulierten Monozyten-Gene	S. 67
3.2.5	Analyse des Einflusses von IVIgG und IVIgM auf die regulierten Gene in mikrovaskulären Endothelzellen und Monozyten im Hinblick auf die verschiedenen immunologischen Funktionsgruppen	S. 69
4	Diskussion	S. 71
4.1	Klinisch-immunologischer Hintergrund und Entwicklung der Fragestellung	S. 71

4.2	Ist die Interaktion von Erythrozyten mit für die Antigenpräsentation potentiell relevanten Zellen des peripheren Blutes bei Patienten mit der IgM-vermittelten Kälteautoimmunhämolyse und bei Patienten mit der IgG-vermittelten Wärmeautoimmunhämolyse durch therapeutisch applizierbares hochgereinigtes gepooltes IgM (IVIgM) oder IgG (IVIgG) beeinflussbar?	S. 75
4.3	Führt die Erythrozyten-Zell-Interaktion in Gegenwart von therapeutisch applizierbaren Immunglobulinen der Isotypen IgG und IgM im Vergleich zur Erythrozyten-Zell-Interaktion in Gegenwart von Normalplasma zu charakteristischen Veränderungen des Genexpressionsprofils der mit den Erythrozyten interagierenden, prinzipiell zur Antigenpräsentation befähigten Zellen?	S. 77
4.4	Zusammenfassung und Ausblick	S. 78
5	Abkürzungsverzeichnis	S. 79
6	Abbildungsverzeichnis	S. 81
7	Tabellenverzeichnis	S. 82
8	Literaturverzeichnis	S. 83
9	Danksagung	S. 88
10	Lebenslauf	S. 89
11	Anhang	S. 90

1 Einleitung

1.1 Therapeutisch applizierbare Immunglobuline

1.1.1 Übersicht

Der Einsatz hochreinen humanen, gepoolten Normal-Immunglobulins ist - im wesentlichen initiiert durch die bahnbrechenden Arbeit von Imbach 1981 [27] - für eine Vielzahl von Erkrankungen in der modernen Medizin Stand von Wissenschaft und Technik geworden [33]. Die therapeutisch eingesetzten Immunglobuline (Ig) werden aus dem Plasma gesunder Blutspender gewonnen und enthalten als wirksame Bestandteile Antikörper unterschiedlicher Isotypen-Verteilung, je nach Präparat [2].

Therapeutisch applizierbare Immunglobuline können grundsätzlich als subkutane oder intramuskuläre (sc/imlg) und als intravenöse (iv/Ig) Präparation eingesetzt werden. Zur Herstellung wird ein Pool von mindestens 1000 gesunden Spendern verwendet. Bei den sc/imlg-Präparaten liegt die Proteinkonzentration zwischen 30 und 180 g/L und enthält gegenüber dem Ausgangsmaterial eine mindestens 10fach erhöhte Konzentration von definierten antiviralen und antibakteriellen Antikörpern (= 90% des Proteins). Im Unterschied dazu beträgt die Proteinkonzentration der ivlg-Präparate 50-100g/L und die Antikörper sind im Vergleich zum Ausgangsmaterial um mehr als dem Faktor drei erhöht. Zudem muss bei den ivlg-Präparaten eine definierte Verteilung der IgG-Subklassen und der Fc-Formationen nativer Immunglobuline beachtet werden (mindestens 90% monomere und dimere IgG-Moleküle und maximal 3% Polymere und Aggregate) [2]. Zusätzlich sind bei den therapeutisch applizierbaren Immunglobulinen neben den Normal-Immunglobulinpräparaten noch die Spezifischen Immunglobuline oder Hyperimmunglobuline zu nennen, die von ausgewählten oder immunisierten Spendern gewonnen werden, die einen höheren Titer eines definierten Antikörpers haben. Die daraus gewonnenen Präparate weisen eine bis zu 10fach höhere Konzentration dieser Antikörper-Spezifität auf.

Um die Immunglobulinpräparate haltbar zu machen zu können, werden sie in lyophilisierter Form oder in stabilisierter Lösung (Stabilisatoren z.B.: Albumin, Aminoessigsäure und vielfach diverse Zucker) hergestellt und in der Regel bei +2°C bis +8°C, in Abhängigkeit von der Produktspezifikation zum Teil aber auch bei +2°C bis +25°C gelagert.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Modifikation von Erythrozyten-Zell-Interaktionen durch therapeutisch applizierbare Normal-Immunglobuline der Isotypen IgG (IVIgG) und IgM (IVIgM).

1.1.2 Einsatz von IVIgG

Die Substitution von Immunglobulinen erfolgt zur Immunmodulation bei Erkrankungen mit gesicherter oder vermuteter autoimmuner, inflammatorischer und/oder allergischer Genese sowie bei Immundefektsyndromen primärer oder sekundärer Genese. Klinische Indikationen für den Einsatz von IVIgG sind im Wesentlichen [56]

- die passive Immunprophylaxe gegen Virusinfektionen
- die Prävention und adjuvante Therapie bei der Sepsis des Neugeborenen
- sonstige Infektionen, z.B. Exazerbationen der zystischen Fibrose, Infektionen mit RSV, Infektionen mit Rotaviren, die bakterielle Meningitis, rezidivierende Clostridium-difficile-Infektionen
- primäre Immundefekte mit Antikörpermangelsyndrom
- sekundäre Immundefekte mit Antikörpermangelsyndrom; z.B. in der Folge hämatologisch-onkologischer Erkrankungen oder deren Therapie (Zytostase, Knochenmarktransplantationen)
- Auto- und Allo-Hämozytopenien im Kindesalter
- rheumatische und systemische Autoimmunerkrankungen
- Vaskulitiden, z.B. Kawasaki-Syndrom
- neurologische Erkrankungen im Kindes- und Erwachsenenalter, z.B. die Multiple Sklerose, inflammatorische Polyneuropathien oder die Myasthenia gravis

- allergische Erkrankungen, z.B. die atopische Dermatitis oder die chronische Urtikaria

Bei der Therapie mit intravenös verabreichbaren Immunglobulinen können Nebenwirkungen auftreten. Diese sind öfter bei Patienten mit primärem Immunglobulinmangel zu beobachten, die noch nie zuvor Immunglobulinpräparate erhalten haben, als bei Patienten, die regelmäßig mit intravenös verabreichbaren Immunglobulinen behandelt werden. Milde Reaktionen treten meist in den ersten 30 Minuten der Immunglobulingabe auf und können durch eine Verlangsamung der Infusionsrate oder einer kurzfristigen Aussetzung der Infusion behandelt werden. Zu den Symptomen gehören Kopfschmerz, Rückenschmerzen, Muskelschmerzen, Gelenkschmerzen, Müdigkeit, Kältegefühl, Übelkeit und bei Patienten mit Risiko für Hypertension erhöhter Blutdruck. Heftigere Nebenwirkungen können nach 48-72 Stunden auftreten und zu einer akuten aseptischen Meningitis mit Pleozytose der Cerebrospinalflüssigkeit führen. Verhindert werden kann dies durch die Gabe von nicht-steroidalen antiinflammatorischen Wirksubstanzen. Sehr selten kann es zu schweren anaphylaktischen Reaktionen gegen IgA kommen, wenn Patienten während einer Langzeitbehandlung durch Spuren von IgA sensibilisiert wurden. Diese Reaktion tritt in der ersten Stunde nach der Gabe auf und kann durch intravenös verabreichbaren Immunglobulin, welches frei von IgA ist, verhindert werden. Bei älteren Patienten, Patienten mit Diabetes und bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion besteht zudem das Risiko eines akuten Nierenversagens [33]. Neuere Daten legen zudem nahe, dass bei einer einmaligen hochdosierten Gabe von intravenös verabreichbarem Immunglobulin vor allem bei Kawasaki Syndrom die Blutviskosität ansteigt und so möglicherweise das Risiko für eine Thromboembolie erhöht ist [4].

Das wesentliche Wirkprinzip der Substitution mit IVIgG ist das der Immunmodulation des Empfängerorganismus durch die Immunglobuline.

Mechanismen, die der Immunmodulation zugrundeliegen, werden mittlerweile in Ansätzen verstanden und lassen sich wie folgt zusammenfassen [33, 55]:

- Blockade von Fc γ -Rezeptoren
- Absättigung des neonatalen Fc-Rezeptors
- beschleunigte Elimination zirkulierender und gewebsgebundener Immunkomplexe
- Einflüsse auf das Komplementsystem
- Einflüsse auf die Antigenerkennung und Antigenpräsentation
- Einflüsse auf die Apoptose
- Eingriffe in das Idiotyp-Anti-Idiotyp-Netzwerk
- Neutralisation von Zytokinen und Superantigenen
- Einflüsse auf die Zelladhäsion durch natürliche RGD-Antikörper

1.1.3 *Einsatz von IVIgM*

Eine besondere immunregulierende Rolle scheinen natürliche (Auto-)Antikörper des Isotyps IgM zu spielen. Mittels ELISA konnte für einige Autoantigene, aber nicht für Fremdartigene, im Mausmodell [1] und im Humansystem [25] eine Hemmung der Reaktivität natürlicher Autoantikörper des Isotyps IgG durch im autologen Plasma vorhandenes IgM gezeigt werden. Diese Daten sind konsistent mit der Beobachtung, dass das natürliche autologe IgM Antikörper-Repertoire im Tiermodell *in vivo* die Immunantwort bei allogener [7, 8, 15, 41] ebenso wie bei autologer [9, 14] Stimulation regulierend beeinflusst. So verhindert das natürliche IgM Antikörper-Repertoire im Maus-Infektionsmodell die Aussaat pathologischer Keime in überlebenswichtige Organe und kontrolliert ihre Ansammlung in sekundär-lymphatischen Organen, in denen eine spezifische Immunantwort induziert werden kann [41]. IgM-defiziente Mäuse zeigen darüber hinaus eine eingeschränkte adaptive Immunantwort gegenüber T-Zell-abhängigen Antigenen [8, 15]. Der Einfluss des autologen IgM Antikörper-Repertoires auf die Aufrechterhaltung von Selbsttoleranz im Tiermodell wird dadurch belegt, dass es bei IgM-defizienten Mäusen zu IgG-vermittelten Autoimmunerkrankungen kommt [9, 14]. Diese Daten sind

konsistent mit der Beobachtung, dass gepooltes humanes IgM gesunder Blutspender anti-idiotypische Antikörper der IgM-Klasse enthält, die IgG-Autoantikörper von Patienten mit Autoimmunerkrankungen in vitro neutralisieren und in vivo im Tiermodell vor experimentell induzierten IgG-vermittelten Autoimmunerkrankungen zu schützen vermögen [26]. Es wird daher seitens der Plasma-verarbeitenden Industrie zur Zeit versucht, IgM-angereicherte Immunglobulinpräparate zum therapeutischen Einsatz zur Verfügung zu stellen, die neben dem Einsatz beim Immundefektsyndrom in der Zukunft auch eine wesentliche Rolle bei der Therapie von Autoimmunerkrankungen spielen könnten. Ein erstes solches Präparat für den klinischen Einsatz ist das Pentaglobin® der Firma Biotest (Biotest Pharma, Dreieich, Deutschland), das eine 12%ige IgM-Lösung enthält. Die Firma LFB (Les Ulis, Frankreich) hat eine >90% reine IgM-Lösung hergestellt, die bisher allerdings nur für den experimentellen Einsatz zur Verfügung steht [26].

1.2 Erythrozyten-Zell-Interaktionen

1.2.1 Endothelzellen

1.2.1.1 Anatomische und physiologische Charakteristika des vaskulären Endothels

Der Aufbau aller Blutgefäße ist im Wesentlichen ident: Die Intima setzt sich aus dem Endothel und dem subendothelialen Bindegewebe zusammen. Das Endothel besteht aus einer dichten Schicht flacher Zellen, den Endothelzellen deren Kern sich in das Gefäßlumen vorwölben, die untereinander durch Nexus und Zonulae occludentes miteinander verbunden sind und einer Basalmembran anliegen. Um eine intravasale Gerinnung zu vermeiden, muss der Verbund der Endothelzellen (EC) unversehrt sein. Der Grundbauplan des Endothel weist in den verschiedenen Gefäßabschnitten (arteriell, venös, mikrovaskulär) spezifische Charakteristika auf [12].

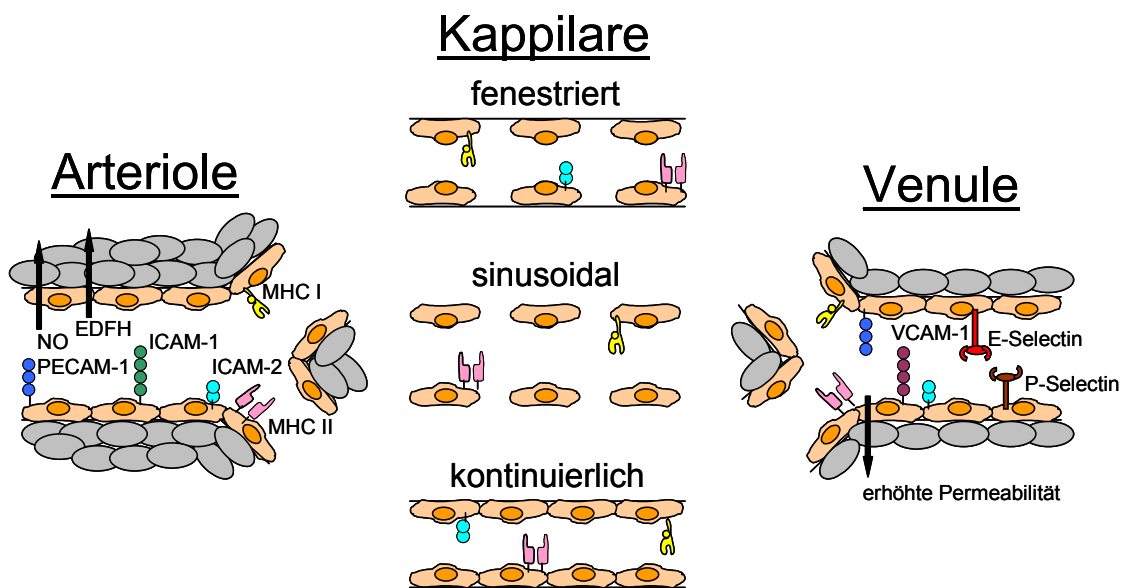


Abbildung 01: Heterogenität der Endothelzellen (modifiziert nach Choi et al.)

1.2.1.2 Immunologische Bedeutung des vaskulären Endothels

Endothelzellen tragen, wie alle kernhaltigen Zellen eines Organismus, MHC-I-Komplexe auf der Zelloberfläche, können aber unter besonderen Umständen zusätzlich auch MHC-II-Komplexe ausbilden, die im Regelfall nur von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden. Zudem stehen sie in engem physiologischen Kontakt mit T-Zellen [12].

Um MHC-II-Komplexe auf der Oberfläche zu exprimieren, nehmen diese Zellen Antigene nach Bindung an Zelloberflächenrezeptoren durch Endozytose auf, fragmentieren diese in den Lysosomen zu Peptiden, binden sie intrazellulär an MHC-II-Komplexe und translozieren die beladenen Komplexe vesikulär in die Plasmamembran, wo sie den T-Zellrezeptoren der T-Lymphozyten präsentiert werden [36].

Da auch Endothelzellen diese MHC-II-Komplexe auf der Oberfläche tragen können, vermögen sie grundsätzlich ebenfalls an der Rekrutierung von im Blut zirkulierenden T-Lymphozyten in Entzündungsgebiete des peripheren Gewebes beteiligt sein. Es wird vermutet, dass Endothelzellen auf diesem Wege T-Gedächtnis-Zellen zur Immunerhaltung mikrobielle Antigene präsentieren könnten. Im Gegenzug scheinen T-Zellen Endothelzellen über humorale

Faktoren sowie über direkten Zellkontakt in ihrer Funktion modulieren zu können [12, 45, 48]. Auch bei Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen von vaskularisiertem Gewebe spielen die Endothelzellen vermutlich eine entscheidende Rolle, da sie die ersten Zellen sind, die mit den Gaft-Zellen in Kontakt treten [45].

1.2.1.3 *Hämorheologische Bedeutung des Endothels*

Unter hämorheologischen Aspekten ist das Endothel vor allem im mikrovaskulären System von wesentlicher Bedeutung. Die Endothelzellen verhindern unter physiologischen Bedingungen durch verschiedene Mechanismen die Hämostase und die Koagulogenese [10, 11, 16]. Diese Abläufe werden von gefäßwirksamen Substanzen (NO und Prostaglandin), welche von den Endothelzellen produziert werden, unterstützt [43]. Unter dem Einfluss von Zytokinen kann es zu einer prothrombotischen Veränderung der Endothelzellen kommen und damit zur Bildung prokoagulatorischer Proteine [38].

1.2.2 *Monozyten*

Zu den sogenannten professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC) zählen neben den dendritischen Zellen und den B-Lymphozyten die Monozyten, die Vorläuferzellen der Makrophagen. Monozyten / Makrophagen, große einkernige Zellen, die zur Phagozytose befähigt sind, spielen sowohl in der angeborenen als auch in der adaptiven Immunantwort eine wichtige Rolle. In der Frühphase der Immunantwort schützen die Makrophagen den Körper durch ihre Fähigkeit zur Phagozytose und induzieren zusätzlich über die Freisetzung von Interleukinen (z. B. IL-1, IL-6) die Sekretion von Akut-Phase-Proteinen. Während der Phase der adaptiven Immunantwort werden sie als antigenpräsentierende Zellen tätig und fungieren zudem als Effektorzellen für die humorale und zelluläre Immunreaktion [29]. Zusätzlich zu ihrer Rolle bei der Bekämpfung mikrobieller Agenzien beeinflussen Makrophagen auch die

Kapillarisation und den Bindegewebsumbau der Gefäße, indem sie Zytokine sezernieren und Gewebs- und Zelltrümmer phagozytieren [35, 40].

1.2.3 *Dendritische Zellen*

Dendritische Zellen (DC) findet man in der Epidermis als klassische Langerhans-Zellen, im peripheren lymphatischen Gewebe und zu einem geringen Anteil (0,1-1,0% der zirkulierenden PBMCs) im peripheren Blut [21]. Allerdings ist ihre Aufgabe im peripheren Blut noch unklar [44]. Die überaus wichtige Rolle der dendritischen Zellen bei der spezifischen Immunantwort begründet sich auf die, im Vergleich zu anderen antigenpräsentierenden Zellen, erhöhte Konzentration von MHC-II-Komplexen, costimulatorischen Molekülen sowie Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche, die eine höchst effiziente antigenpräsentierende Funktion sicherstellen [5, 6]. Kürzlich wurde zusätzlich über einen weiteren Mechanismus der dendritischen Zellen im Kontext der Antigenpräsentation berichtet, bei dem es durch die Sezernierung von Serinproteasen zu einer extrazellulären enzymatischen Prozessierung der Antigene kommt. Die Antigene müssen also nicht internalisiert werden, sondern werden nach der extrazellulären Aufspaltung an leere MHC-II-Moleküle der dendritischen Zellen gebunden [13, 46, 47]. Außer der Expression von MHC-II-Proteinen werden weitere Stimuli benötigt, um die Antigene effektiv zu präsentieren. Zu diesen zählen inflammatorische Zytokine, sowie virale und mikrobakterielle Bestandteile. Eine weitere wichtige Rolle der dendritischen Zellen stellt die Präsentation von Selbstantigenen dar, die zur Etablierung und dem Erhalt der Immuntoleranz notwendig ist [19, 37]. Es wird vermutet, dass dendritische Zellen auch unabhängig von der Interaktion mit T-Zellen ruhende B-Zellen aktivieren können und so die Initiierung sowie die Regulation der Antikörperbildung beeinflussen [57].

Erythrozyten (RBC) stehen in der peripheren Zirkulation in Interaktion mit allen diesen hier genannten Zelltypen (Gefäßendothel, Monozyten, dendritische Zellen). Die klinisch-immunologische Relevanz der Beeinflussung von

Erythrozyten-Zell-Interaktionen in der peripheren Zirkulation unter Einfluss therapeutisch applizierbarer Immunglobuline der Isotypen IgG und IgM ist bisher in der Literatur nicht thematisiert worden, könnte aber für das Verständnis von Allo- und Autoimmunisierungsprozessen gegen Erythrozytenantigene oder deren Prophylaxe von hämotherapeutischer Bedeutung sein.

1.2.4 *Antigenpräsentation im Kontext der Erythrozyten-Zell-Interaktionen*

Um einen Immunantwort auszulösen, ist die Präsentation von Antigenen bzw. Antigenfragmenten durch antigenpräsentierende Zellen eine unerlässliche Voraussetzung. Dazu wird beim erstmaligen Kontakt eines Antigen mit einer antigenpräsentierenden Zellen das Antigen internalisiert, intrazellulär durch Proteolyse fragmentiert, und die Fragmente mit Hilfe von MHC-Proteinen auf der Zelloberfläche präsentiert. MHC-Proteine werden in Proteine der Klasse I, auf allen Körperzellen vorkommend, und MHC-Proteine der Klasse II, die nur auf den antigenpräsentierenden Zellen expremiert werden, unterteilt. Treten T-Lymphozyten mit antigenpräsentierenden Zellen in Kontakt, werden diese T-Lymphozyten entweder zu zytotoxischen CD8-T-Lymphozyten oder zu CD4-Helfer-T-Lymphozyten aktiviert. Über einen spezifischen T-Zellrezeptor interagieren die CD8-T-Lymphozyten mit Zellen, die Antigenfragmente mit Hilfe der MHC-I-Proteine präsentieren. Durch diese Interaktion werden zytotoxische Proteine, wie Proteasen und Perforine, gebildet, welche die antigenpräsentierenden Zellen abtöten. Der Kontakt zwischen den CD4-T-Lymphozyten und den MHC-II-Proteinen auf den antigenpräsentierende Zellen führt zur Freisetzung von Interleukinen, die wiederum für die Umwandlung von B-Lymphozyten in Antikörper produzierende Plasmazellen erforderlich sind. Die dendritischen Zellen, die Makrophagen bzw. Monozyten und die B-Zellen sind die wichtigsten Zellen, die den T-Lymphozyten Antigene präsentieren. Zur Aktivierung von B-Lymphozyten sind ebenfalls antigenpräsentierende Zellen erforderlich, da sie über die Aktivierung von CD4-Lymphozyten zur Freisetzung

von IL-2 und IL-4 führen, welche für die Umwandlung von B-Lymphozyten in antikörperproduzierende Plasmazellen verantwortlich sind [28].

Wie in den letzten Jahren zunehmend beschrieben wird, spielen vaskuläre Endothelzellen bei der Antigenpräsentation eine wesentliche Rolle, da sie auf der Oberfläche sowohl MHC-I-Komplexe als auch - unter besonderen Umständen - MHC-II-Komplexe tragen und in unmittelbarem Kontakt mit T-Zellen stehen. Zudem können sie maßgeblich daran beteiligt sein, T-Lymphozyten aus dem zirkulierenden Blut in Entzündungsgebiete im peripheren Gewebe zu rekrutieren [3, 42, 45]. Darüber hinaus sind bei Transplantationen von vaskularisiertem Gewebe Endothelzellen die ersten Zellen, die mit den Lymphozyten des Wirts zusammentreffen und dadurch maßgeblich zur Initialisierung einer Abstoßungsreaktion beitragen können [45]. Eine Immunantwort gegen das Endothel ist von besonderer Bedeutung, da sie zu vaskulären Umbauprozessen und zur Entwicklung von Artherosklerose führen kann [45].

Bei der Interaktion von Erythrozyten mit den Endothelzellen werden auch die Erythrozyten beeinflusst. So haben Studien gezeigt, dass unter physiologischen Bedingungen und unter dem Einfluss von Scherkräften, wie sie physiologisch in Kapillaren, Venolen und Arteriolen vorkommen, die Adhäsion zwischen Erythrozyten und Endothelzellen in Gegenwart von autologem Plasma als gering zu bezeichnen ist [22, 39, 52]. Eine um den Faktor 5 noch geringere Adhäsion wird zwar in Anwesenheit von Albumin-Puffer statt von autologem Plasma erreicht, dies ändert aber nichts an der Aussage, dass auch die Adhäsion in Gegenwart von autologem Plasma normaler Zusammensetzung beim gesunden Probanden als gering zu bezeichnen ist [24, 51]. Eine vermehrte Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion scheint zudem zum physiologischen Erythrozytenabbau beizutragen [51]. Bisher veröffentlichte Untersuchungen der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion beziehen sich allerdings zum Großteil auf pathologisch veränderte Erythrozyten, also Zellen mit Veränderungen der Membran. Auch über eine gesteigerte

Adhäsionsneigung von gealterten Erythrozyten an Endothelzellen wurde schon in Studien aus den 80er Jahren berichtet [51]. Vermutlich ist ein immunologischer Mechanismus Hintergrund dieser Beobachtung [30-32, 52]. Die Interaktion Antikörper-beladener Erythrozyten mit Monozyten stellt einen wesentlichen Mechanismus des Erythrozytenclearings bereits unter physiologischen Bedingungen im Rahmen des Erythrozytenalterungsprozesses dar [34] und dendritische Zellen im peripheren Blut könnten als direkt am „Ort des Geschehens“ verfügbare antigenpräsentierende Zellen für Erythrozyten-Antigene eine wesentliche pathophysiologische Rolle bei der Entstehung der anti-erythrozytären Immunisierung spielen. Erste Hinweise für eine mögliche Funktion von dendritischen Zellen im Rahmen der Erythrozyten-Antigenpräsentation ergeben sich aus einer älteren experimentellen Arbeit, die die Fähigkeit epidermaler Langerhans-Zellen der Maus zeigt, Schaf-Erythrozyten-Antigene zu präsentieren und die Antikörperproduktion gegen Schaf-Erythrozyten zu induzieren [20]. Für eine Subpopulation dendritischer Zellen im peripheren Blut wurde zudem kürzlich die Fähigkeit zur Phagozytose opsonisierter Schaf-Erythrozyten beschrieben [49]. Ob und wie die Interaktion von Erythrozyten mit Endothelzellen, dendritische Zellen des peripheren Blutes und Monozyten in der peripheren Zirkulation eine Rolle beim Pathomechanismus der anti-erythrozytären Immunisierung, insbesondere der anti-erythrozytären Autoimmunisierung, spielt, ist auf dem Hintergrund der existierenden Literatur eine berechtigte Frage, die derzeit noch in keiner Weise experimentell angegangen worden ist.

1.3 Anti-erythrozytäre Autoimmunisierung

Die Bildung von Antikörpern gegen die eigenen Erythrozyten mit nachfolgender Lyse der Erythrozyten ist das wesentliche Charakteristikum der autoimmunhämolytischen Anämien (AIHA).

1.3.1 *Anti-erythrozytäre Wärmeautoantikörper*

Die Autoimmunhämolytischen Anämien, welche durch Wärmeautoantikörper vermittelt werden (warm autoimmune hemolytic anemia, WAIHA), machen ca. 70% der AIHA aus [23]. Die Wärmeautoantikörper binden bei Körperkerntemperatur optimal an die Erythrozyten, gehören zum Isotyp IgG, und können zum Teil Komplement aktivieren. Die Lyse der IgG-beladenen Erythrozyten erfolgt in der Regel extravasal in Leber und Milz. Die WAIHA kann idiopathisch (ca. 45%) und als sekundäre Erkrankung (ca. 55%) (systematischer Lupus erythematoses, andere Autoimmunerkrankungen, chronische lymphatische Leukämie oder Medikamente) auftreten.

1.3.2 *Anti-erythrozytäre Kälteautoantikörper*

Bei den durch Kälteautoantikörpern vermittelte AIHA (cold agglutinin disease, CAD; ca. 15% der AIHA) binden Antikörper in der Regel des Isotyps IgM mit einem Temperaturoptimum von 4°C an die Erythrozytenoberfläche. Physiologisch kommen diese Kälteautoagglutinine bei allen Menschen vor, Titer und Temperaturamplitude sind aber im Vergleich zu erkrankten Personen zu gering, um eine pathologische Wirkung zu haben. Die CAD tritt in Folge von akuten infektiösen Erkrankungen wie zum Beispiel der Mononukleose oder in Begleitung lymphoproliferativer Erkrankungen wie dem M. Waldenström auf. Der Lysemechanismus der Erythrozyten ist sowohl IgM/C5b-9-vermittelt intravasal, als auch - in Abhängigkeit von der Temperaturamplitude der Kälteautoagglutinine - C3b-vermittelt extravasal.

1.3.3 *Einsatz therapeutisch applizierbaren Immunglobulins bei anti-erythrozytär autoimmunisierten Patienten*

Die Kälteautoimmunhämolyse ist derzeit keine klinische Indikation für den Einsatz therapeutisch applizierbaren Immunglobulins. Im Fall der IgG-vermittelten Wärmeautoimmunhämolyse legt der Fcγ-Rezeptor abhängige

Lysemechanismus den Einsatz von IVIgG nahe. Allerdings ist IVIgG nur zum Teil bei der IgG-vermittelten WAIHA wirksam, ohne dass der Mechanismus der verminderten Wirksamkeit verstanden wird, so dass die WAIHA nicht als gesicherte Indikation für IVIgG gilt [2]. Neuere Untersuchungen zur Bedeutung einer defekten Kontrolle autologen IgM's über natürliches autoreaktives IgG als pathogenetisches Prinzip bei der Wärmeautoimmunhämolyse [53, 54] eröffnen die Perspektive der Rekonstitution physiologischer IgM-IgG-Interaktionen mit einem zukünftig verfügbaren hochreinen IVIgM als mögliches zukünftiges Therapiekonzept der WAIHA.

1.4 Fragestellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit untersucht die Modifikation von Erythrozyten-Zell-Interaktionen durch therapeutisch applizierbare Immunglobuline der Isotypen IgG und IgM. Im Detail sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Besteht ein Einfluss therapeutisch applizierbaren Immunglobulins bei gesunden Probanden auf hämorheologisch relevante Erythrozyten-Zell-Interaktionen ?
2. Besteht ein Einfluss therapeutisch applizierbaren Immunglobulins bei Patienten mit anti-erythrozytären Wärme- und Kälteautoantikörpern auf hämorheologisch relevante Erythrozyten-Zell-Interaktionen?
3. Ist der Einfluss therapeutisch applizierbaren Immunglobulins auf Erythrozyten-Zell-Interaktionen funktionell relevant?

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchung von Erythrozyten-Zell-Interaktionen unter Real-Time-Bedingungen

2.1.1 *Herkunft und Isolierung der untersuchten Zielzellen*

2.1.1.1 *Isolierung mononukleärer Zellen aus Vollblut*

Zur Isolierung von Lymphozyten wurden Vollblutspenden bei 20°C und 3000 U/min ohne Bremse für 15 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Buffy coat, der im wesentlichen die Fraktion der Leukozyten enthält, mit der Pipette entnommen. In neuen Röhrchen wurde der Buffy coat mit Zellkulturmedium (RPMI, Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt. Die Isolierung der mononukleären Zellschicht, bestehend aus Lymphozyten und Monozyten, aus dem Buffy Coat erfolgte nach dem Prinzip der Dichtegradienten-Zentrifugation. Dazu wurden in frischen Röhrchen Ficoll-Lösung (Firma Biochrom Seromed, Berlin, Deutschland) mit Zellsuspension im Verhältnis 1:1 überschichtet. Das Gemisch wurde bei 20°C und 2400 U/min ohne Bremse für 30 Minuten zentrifugiert. Danach wurde die mononukleäre Zellschicht entnommen und dreimal in RPMI gewaschen. Nach der Resuspension in RPMI-FCS 5% (FCS von Biochrom Seromed, Berlin, Deutschland) wurde die Konzentration der mononukleären Zellen nach dem Prinzip der Impedanzmessung (Sysmex Gerät, TOA Medical Electronics GmbH, Norderstedt, Deutschland) ermittelt.

2.1.1.2 *Isolierung von Monozyten*

Aus der mononukleären Zellfraktion des Vollblutes wurden die Monozyten wie folgt isoliert:

8-Well-Platten (Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden, Deutschland) wurden mit 2ml 5%igem FCS/Well für eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert. Der Überstand wurde danach verworfen. 1,5ml Zelllösung, mit einer Konzentration von 1×10^7 mononukleären Zellen/ml RPMI-FCS 5% wurden pro Well aufgebracht und für 2h bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert. Danach hafteten die Monozyten am Boden der 8-Well-Platten an und der Überstand

konnte vorsichtig mittels einer Pasteurpipette abgenommen werden. Um die Zielzellen, die Monozyten, von der Plattenoberfläche zu lösen, wurden die Wells erneut mit 2ml/Well frischen RPMI-FCS 5% befüllt und für zwei Minuten auf einen Eisblock gestellt. Danach konnten die Monozyten durch leichtes Schütteln abgelöst, in ein Röhrchen umgefüllt und mittels Impedanzmessverfahren in ihrer Konzentration bestimmt werden.

2.1.1.3 Isolierung dendritischer Zellen des peripheren Blutes

Die Isolierung der dendritischen Zellen aus peripherem Blut erfolgte mittels positiver/direkter Selektion der Zielzellen. Dazu wurde diese Zellpopulation mit magnetischen dextranüberzogenen Nanopartikeln aus Eisen, mittels eines tetrameren Antikörperkomplexes (TAC) markiert. Dieser Komplex erkennt sowohl Antigene auf der Oberfläche der Zielzellen, als auch Dextran. Das Prinzip des Einsatzes zyklischer tetramolekularer Komplexe monoklonaler Antikörper wurde 1986 und 1989 ausführlich beschrieben (Landsorb, Thomas). Die Isolierung der dendritischen Zellen erfolgte mit einem Isolierungskit der Firma StemCell Technologies (CellSystems, St. Katharinen, Deutschland) im Detail nach folgendem Schema:

- Isolierung von Lymphozyten aus peripherem Blut
- Versetzen der Lymphozyten mit magnetischen Nanopartikeln
- Einstellen der Zelllösung auf 1×10^8 /ml
- Blocken der Zellsuspension mit Anti-CD32
- Versetzen der Lösung mit dem Antikörper-Cocktail in einer Konzentration von 100 μ l/ml Zellen
- Inkubation der Zelllösung bei Raumtemperatur für 20 Minuten
- Hinzufügen von 200 μ l magnetischen, dextranüberzogenen Eisenpartikeln pro 2ml Zellsuspension
- Inkubation der Zelllösung für 12 Minuten bei Raumtemperatur
- Isolation der Zielzellpopulation mittels magnetbeschichteter Säulen (Firma Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland)

- Überführung der dendritischen Zellen in FACS-Röhrchen mit 1ml RPMI-FCS 5%ig
 - Einstellung der dendritischen Zellen auf die gewünschte Konzentration
- Zur Optimierung der Zellausbeute wurden alle Lösungen mit 2mM EDTA versetzt.

2.1.1.4 Endothelzellen

Mikrovaskuläre Endothelzellen humanen Ursprungs, isoliert aus der Dermis (HDMEC), wurden für die Untersuchung der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion herangezogen. Die Zellen wurden von der Firma PromoCell (Hamburg, Deutschland) im kryokonservierten Zustand bei -70°C bezogen. Die Zellen waren frei von Bakterien, Fungiziden, Mykoplasmen, HIV, Hepatitis B und Hepatitis C und wurden positiv auf den Von-Willebrand-Faktor getestet. Die Zellen wurden in den folgenden Medien kultiviert:

ECGS/H	0,4%
FCS	5%
Epidermal Growth Factor	10 ng/ml
Hydrokortison	1 $\mu\text{g/ml}$
Amphotericin B	50 $\mu\text{g/ml}$
Gentamycin	50 $\mu\text{g/ml}$

Auftauen und Aussaat der Zellen nach Lieferung

Auf dem Boden einer Kulturflasche wurde die Zellkulturlösung mit $200\mu\text{l/cm}^3$ verteilt und bei 37°C unter Zusatz von 5% CO_2 für 30 Minuten inkubiert. Die kryokonservierten Endothelzellen wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und unter sterilen Kautelen in die vorbereiteten Kulturflaschen gefüllt. Das Zellkulturmedium wurde im 24 Stunden Abstand erneuert. Wenn 70-90% des Flaschengrundes mit Zellen bedeckt waren und Zeichen der Zellteilung erkennbar waren, wurden Subkulturen angelegt.

Anlegen der Subkulturen

Zur Anlegung der Subkulturen wurden die Endothelzellen von der Oberfläche des Kulturgefäßes unter kontrollierten Bedingungen unter Einsatz von Trypsin/EDTA-Lösung gelöst, unter sterilen Kautelen gewaschen, in frischem Kulturmedium resuspendiert, in ihrer Konzentration bestimmt und erneut ausgesät (Konzentration: 2ml; HDMEC in einer Konzentration von $4,3 \times 10^5$ /ml Kulturmedium). Für die Analysen wurden die Endothelzellen nach der zweiten oder dritten Passage eingesetzt.

2.1.1.5 Erythrozyten

Für die Versuchsreihen wurden ausschließlich Erythrozyten gesunder Blutspender der Blutgruppe 0 Rh(D) positiv eingesetzt. Die Präparation der Erythrozyten für die verschiedenen Versuche wird im Folgenden beschrieben:

2.1.1.5.1 Gewaschene Erythrozyten aus EDTA-Blut

In der Blutspende der Universitätsklinik Münster wurden, je nach Bedarf, EDTA-Röhrchen mit Vollblut der Blutgruppe 0 Rh (D) positiv von gesunden Spendern zur Verfügung gestellt. Das Vollblut wurde bei Raumtemperatur (20°C) und 3000 U/min mit Bremse 9 für 5 Minuten zentrifugiert. Das Sediment wurde mit physiologischer Kochsalzlösung dreimal gewaschen. Die gewaschenen Erythrozyten wurden mit HBS (Hepes Buffered Saline Solution, Firma Biacore, Uppsala, Schweden. HBS-N Puffer: 10mM Hepes pH 7,4 und 150mM NaCl, pH nach Zugabe von 3,4mM EDTA zwischen 6,6-6,8) auf eine Konzentration von 4×10^9 Zellen/ml eingestellt.

2.1.1.5.2 Gewaschene Erythrozyten aus Erythrozytenkonzentraten

Ebenfalls von der Blutspende der Universitätsklinik Münster wurden Erythrozytenkonzentrate zur Verfügung gestellt, die im geschlossenen Beutelsystem (Leukotrap; ca. 450ml Spenderblut/Beutel) gewonnen wurden.

Die Erythrozytenkonzentrate werden üblicherweise in einer SAG-M-Additivlösung mit folgender Zusammensetzung suspendiert: Natriumchlorid (8,77mg/ml), Adenin (0,17mg/ml), Glucose (Monohydrat) (9,0mg/ml), Mannitol (5,25 mg/ml) und Wasser. Die Erythrozyten wurden am Tag der Herstellung des EK (= Tag 1) aus dem Beutelsystem entnommen, gewaschen, und mit HBS auf eine Konzentration von 4×10^9 Zellen/ml eingestellt.

2.1.1.5.3 Gewaschene Erythrozyten aus Erythrozytenkonzentraten, gepoolt

Für einige Versuche wurden aus Erythrozytenkonzentraten gewonnene, gewaschene Erythrozytenkonzentrate gepoolt ($n = 10$) und in die entsprechenden Versuche eingesetzt (4×10^9 Zellen/ml).

2.1.1.6 Plasmapräparationen und therapeutische Immunglobuline

Plasmapräparationen

Die Erythrozyten-Zell-Interaktion wurde unter dem Einfluss der folgenden Plasmapräparationen untersucht:

- Plasmapool gesunder Blutspender, Blutgruppe 0 Rh (D) positiv, $n=10$, sowie die im Pool enthaltenen Einzelplasmen
- Einzelplasmen, gewonnen von 5 verschiedenen Patienten mit Wärmeautoimmunhämolyse

Die Plasmen sind definiert durch den Nachweis panreaktiver anti-erythrozytärer Wärmeautoantikörper des Isotyps IgG, detektierbar im indirekten Coombs-Test, mit einem Autoantikörper-Titer im Bereich von 2-128. Nach Autoabsorption der anti-erythrozytären Wärmeautoantikörper an die Erythrozyten der Patientenblutproben konnte das zusätzliche Vorliegen anti-erythrozytärer Alloantikörper ausgeschlossen werden.

- CAD-Einzelplasmen von 5 verschiedenen Patienten

Die Plasmen sind definiert durch den Nachweis anti-erythrozytärer Kälteautoantikörper des Isotyps IgM, Spezifität Anti-I,

Temperaturamplitude auf den 4°C-Bereich beschränkt, Titer 8-512. Das zusätzliche Vorliegen anti-erythrozytärer Alloantikörper konnte ausgeschlossen werden.

Immunglobuline

Bei den durchgeführten Erythrozyten-Zell-Interaktionsmessungen wurden therapeutisch applizierbare Immunglobuline der Isotypen IgG und IgM eingesetzt.

a) IVIgG

Als IVIgG wurde in der vorliegenden Arbeit Venimmun N[®] (Aventis Behring GmbH, Liederbach, Deutschland) verwendet. Venimmun N[®] ist ein lyophilisiertes Antikörperkonzentrat, das aus gepooltem Humanplasma von 1000-10000 Spendern besteht und hinsichtlich der IgG-Komponente folgende Charakteristika aufweist: Die Immunglobulin-Moleküle verteilen sich wie folgt auf die Ig-Klassen: ca. 80% IgG (IgG1 63%, IgG2 27%, IgG3 3% und IgG4 7%), ca. 12% IgA und ca. 8% IgM. Bei der Verteilung hinsichtlich der verschiedenen Molekülgröße ergibt sich folgendes Ergebnis: 3-5% Polymere, ca. 17% Dimere, ca. 76% Monomere und 1-2% Fragmente. Das Gleichgewicht zwischen Monomeren und Dimeren ist pH-abhängig und weist im Alkalischen einen erhöhten Dimeranteil auf. Bei Venimmun N[®] ergibt sich daher aufgrund des neutralen pH-Wert ein Dimeranteil von ca. 17%.

Vor Beginn der Interaktionsmessungen wurde anhand einer Dosis-Wirkungskurve die ideale Konzentration für die zu verwendende Immunglobulinpräparation ermittelt. In die Versuche wurde IVIgG in einer Konzentration von 5 mg/ml eingesetzt.

b) IVIgM

Das eingesetzte IVIgM ist ein von der Firma LFB (Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies, Les Ulis, Frankreich) aus gepooltem Humanplasma von mehr als 2500 gesunden Spendern hergestelltes und derzeit nur für experimentelle Zwecke zur Verfügung gestelltes hochreines IgM-Präparat mit einem IgM-Anteil von >90%, das bereits in tierexperimentellen Systemen erfolgreich intravenös eingesetzt worden ist [26].

Auch für das verwendete IVIgM wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve zur Konzentrationsbestimmung durchgeführt. In die Versuche wurde IVIgM in einer Konzentration von 1 mg/ml eingesetzt.

2.1.2 Biomolekulare Interaktionsanalyse

2.1.2.1 Prinzip der Messung

Die Erythrozyten-Zell-Interaktionen in Gegenwart verschiedener Plasma- und Immunglobulinpräparationen wurden mit Hilfe der IAsys-Technologie (IAsys™, Thermo Labsystems, Cambridge, England) analysiert. Diese misst unter Echtzeitbedingungen mit Hilfe von optischen Biosensoren die biomolekulare Interaktion. Damit die Analyse durchführbar ist, müssen zuerst die zu analysierenden Zellen („Liganden“) auf der Sensoroberfläche (Coupling Layer), der zu dem System gehörenden Küvetten, immobilisiert werden (Protokoll 2.1.2.2). Die Abbildung 2 zeigt exemplarisch eine Küvette.

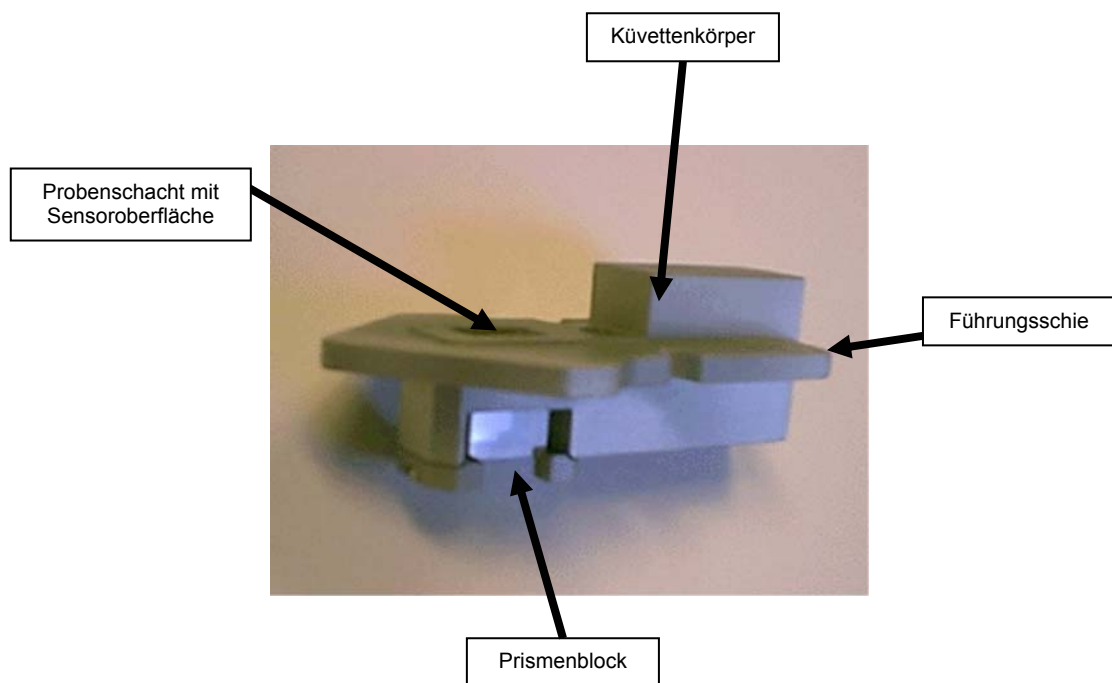


Abbildung 02: Abbildung einer IAsys-Küvette

Die Abbildung zeigt eine IAsys-Küvette, bestehend aus dem Küvettenkörper, der Führungsschiene, dem Prismenblock auf der Unterseite und dem Probenschacht mit der

Sensoroberfläche an dessen Grund. (Abbildung übernommen von IAsys, Thermo Labsystems, Cambridge, England)

Nachdem sich die Küvette im Gerät befindet werden die Erythrozyten und die verschiedenen Plasma- und Immunglobulinpräparationen nach Protokoll auf die Oberfläche der immobilisierten Zellen pipettiert, um die zu messende Interaktion zu ermöglichen.

Ein automatischer Rührer (Vibro-Stirrer) garantiert eine homogene Konzentration des auf die Küvette aufgetragenen Analyts. An der Unterseite der Küvette unter der Sensoroberfläche befindet sich ein Resonanz Spiegel (Resonant Mirror, bestehend aus einer Schicht mit hoher Resonanz und einer Schicht mit niedriger Resonanz) und darunter ein Prismenblock. Aufschluss über die Interaktionsstärke zwischen immobilisierten Zielzellen und Erythrozyten in Gegenwart der verschiedenen Plasma- und Immunglobulinpräparationen gibt eine Messung der Intensität der Lichtresonanz. Dazu wird Laserlicht durch das Prisma auf den Resonanz Spiegel geworfen, dort entsprechend des Interaktionsgrades der Zellen reflektiert und, nachdem es das Prisma auf der anderen Seite verlassen hat, polarisiert. Dieses polarisierte Licht wird von einem Detektor aufgefangen, in ein elektronisches Signal umgewandelt und EDV-technisch registriert und in der Einheit der Winkelsekunde (arc sec) dokumentiert.

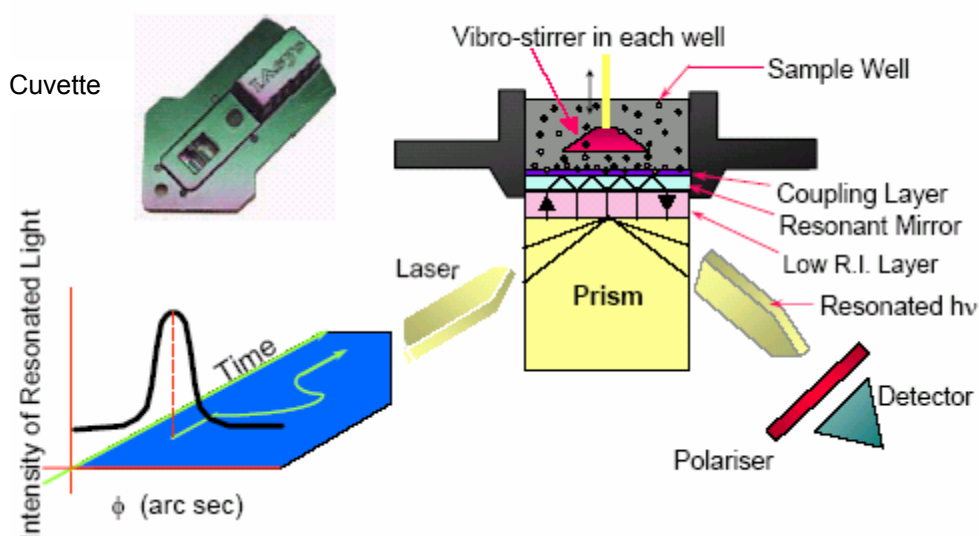


Abbildung 03: Schematische Darstellung des IAsys-Funktionsmechanismus

In der Abbildung wird der IAsys-Funktionsmechanismus schematisch dargestellt. Am Boden des Probenschachtes (Sample Well) erfolgt die Bindung der Analyte mit den immobilisierten Zellen (Coupling Layer). Laserlicht, welches durch den Prismenblock geleitet wird, wird vom Resonanzspiegel (Resonant Mirror) je nach Interaktionsstärke unterschiedlich stark durch den Prismenblock zurückreflektiert. Nach dem Austritt aus dem Prisma wird das Laserlicht polarisiert (Polariser), von einem Detektor aufgefangen und in ein elektronisches Signal umgewandelt (Graph links unten) (Abbildung übernommen von IAsys, Thermo Labsystems, Cambridge, England)

Im Anschluss muss die Küvettenoberfläche für die nächste Messung von Erythrozyten, Plasma- und Immunglobulinpräparationen gereinigt werden. Dies erfolgt nach den einleitend zu dieser Arbeit etablierten Protokollen (2.1.2.3).

2.1.2.2 *Immobilisierung der Liganden*

Zur Immobilisierung der Endothelzellen und der Antigenpräsentierenden Zellen wurden unterschiedliche Küvettenarten verwendet. Die Endothelzellen wurden auf einer Küvette mit planarer Carboxylatoberfläche immobilisiert. Dies erfolgte nach folgendem Protokoll: Im Vorfeld wurde das IAsys-Gerät auf 20°C und eine Stirrer-Kapazität von 75% eingestellt. Um die Küvettenoberfläche für die Bindung der Endothelzellen vorzubereiten, wurde sie als erstes mit Puffer (PBS pH 7.4) gewaschen und dann mit EDC/NHS (1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide / N-hydroxy succinimide) aktiviert. Die Bindung der Endothelzellen erfolgte im sauren Milieu in einem Acetat-Puffer (pH 4.5) Die Zellpräparation wurde in folgender Konzentration auf die Küvette aufgebracht:

HDMEC: 1×10^5 Zellen/ml

Die Inkubationszeit der Endothelzellen auf der aktivierten Küvettenoberfläche betrug 20 Minuten. Anschließend wurde die überschüssige Zellsuspension von der Küvettenoberfläche abgesaugt. Die immobilisierte Zellpopulation wurde mit PBS (pH 7.4) gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit BSA/PBS (2mg/ml, pH 7.4) gelockt. Für die Messungen wurde die Küvette in HBS-Puffer (pH 6,6 - 6,8) gelagert.

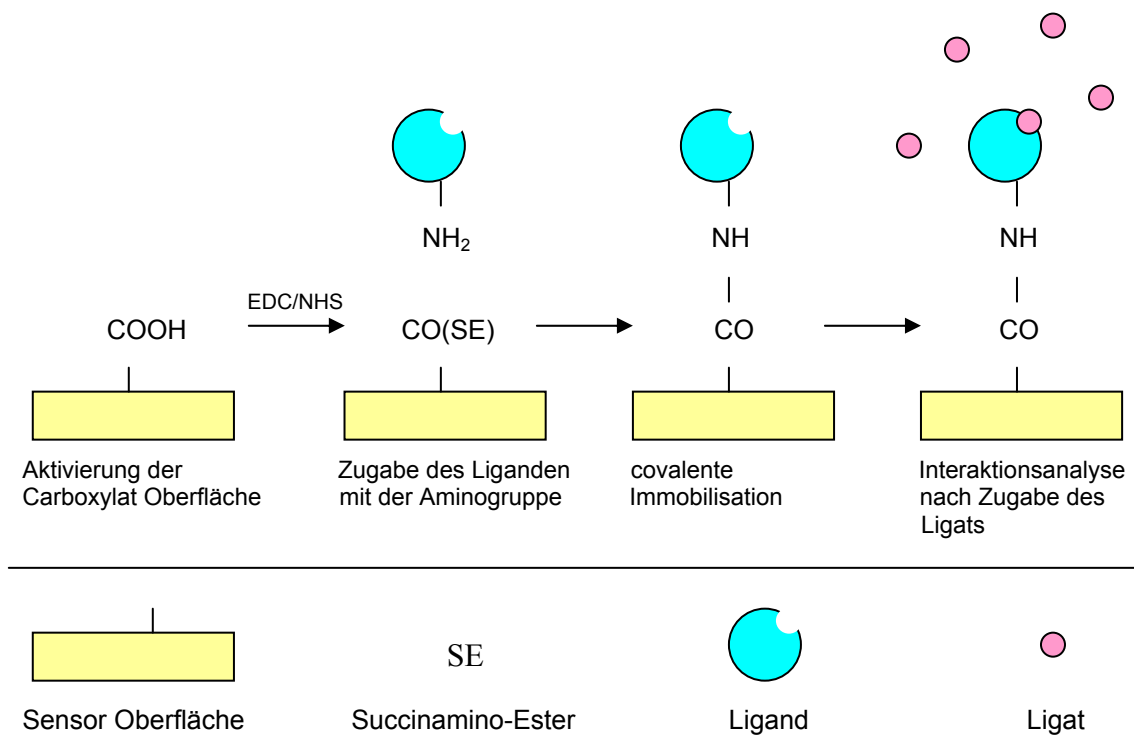


Abbildung 04: Immobilisierung an einer Carboxylatoberfläche

Es wird das Prinzip der Immobilisierung an einer Carboxylatoberfläche gezeigt. Um die Immobilisierung zu ermöglichen, muss die Küvettenoberfläche (Sensor Oberfläche) vorbehandelt werden (Zugabe von EDC/NHS) und die Zielzellen (Ligand) für eine bestimmte Zeit auf die aktivierte Oberfläche aufgebracht werden. Nach dem Entfernen überschüssiger Zellsuspension, Waschen der Küvette und locken der unspezifischen Bindungsstellen, ist die Küvette für Interaktionsversuche mit verschiedenen Analyten (Ligate) bereit (Abbildung modifiziert übernommen von IAsys, Thermo Labsystems, Cambridge, England)

Der gesamte Vorgang der Immobilisierung der Endothelzellen kann unter real-time Bedingungen online verfolgt, kontrolliert und quantitativ verifiziert werden. Für die CM-Dextran Oberfläche gilt dabei als Kalibrationsfaktor: 200 arc seconds = 1ng/mm². Für die Messungen wurden Küvetten eingesetzt, auf denen ca. 5,24ng/mm² HDMEC immobilisiert waren.

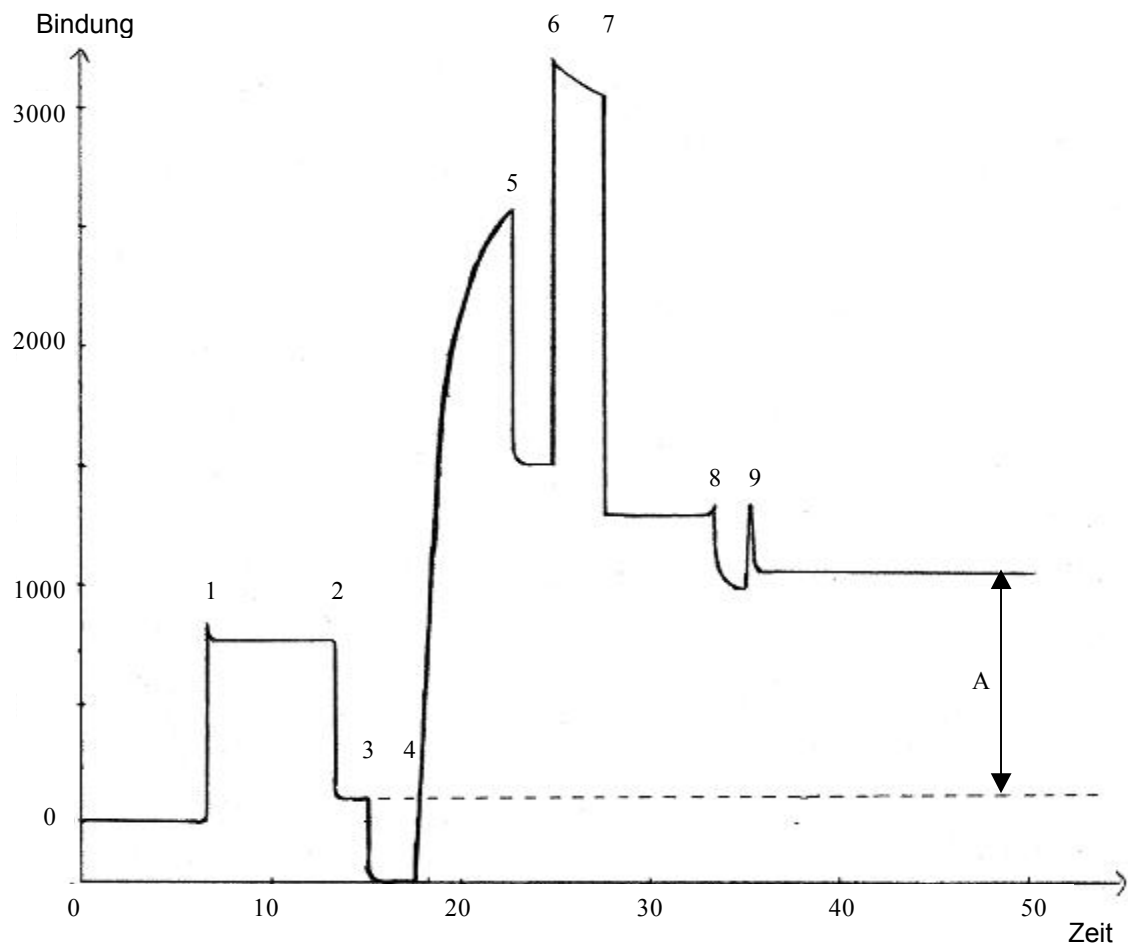


Abbildung 05: Graphen der Immobilisierung an einer Carboxylat-Küvette

Beispiel eines Graphen über den Zeitraum der Immobilisierung von Endothelzellen an einer Carboxylat-Küvette. Die einzelnen Abschnitte definieren sich wie folgt (modifiziert nach IAsys, Thermo Labsystems, Cambridge, England):

- 1 Aktivierung mit EDC/NHS
 - 2 Waschen mit PBS/T
 - 3 Wechsel auf Acetat-Puffer
 - 4 Zugabe von Endothelzellen
 - 5 Waschen mit PBS/T
 - 6 Block der unspezifischen Bindungsstellen
 - 7 Waschen mit PBS/T
 - 8 Waschen mit 1M Ameisensäure
 - 9 Waschen mit PBS/T
- A Menge der immobilisierten Zielzellen

Als antigenpräsentierende Zellen für die IAsys-Analyse wurden in dieser Arbeit dendritische Zellen verwendet. Diese sind an einer Aminosilan-Küvette

immobilisiert worden. Auch hier wählte man eine Voreinstellung des Gerätes auf 20°C und 75% Stirrer-Kapazität. Die Immobilisierung erfolgte nach folgendem Protokoll: Die Küvettenoberfläche wurde mittels Puffer (PBS pH 7.4) und BS³ (Aktivierung) für die Bindung mit den antigenpräsentierenden Zellen vorbereitet. Als letzte Vorbereitung für das Aufbringen der Zellsuspension wurde die Küvettenoberfläche ein weiteres Mal mit Puffer (PBS) gewaschen. Die 250µl Zellsuspension der antigenpräsentierenden Zellen ist in folgender Konzentration aufgebracht worden:

Dendritische Zellen: 2,16 x 10⁷ Zellen/ml

Nach der Inkubationszeit von 20 Minuten wurden die nicht immobilisierten Zellen abgesaugt und die Küvettenoberfläche mit den immobilisierten Zellen erneut mit PBS (pH 7.4) gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen sind mit BSA/PBS (2mg/ml) geblockt worden und die Küvette wurde für die Lagerung auf HBS-Puffer (pH 6,6 - 6,8) umgestellt.

Unter real-time Bedingungen war die Immobilisierung der antigenpräsentierenden Zellen online mitzuverfolgen, zu kontrollieren und im Anschluss quantitativ zu verifizieren. Für eine planare Oberfläche gilt als Kalibrationsfaktor: 600 arc seconds = 1ng/mm². Auf der dendritische Zell-Küvette ergab sich eine Zelldichte von ca. 0,73ng/mm².

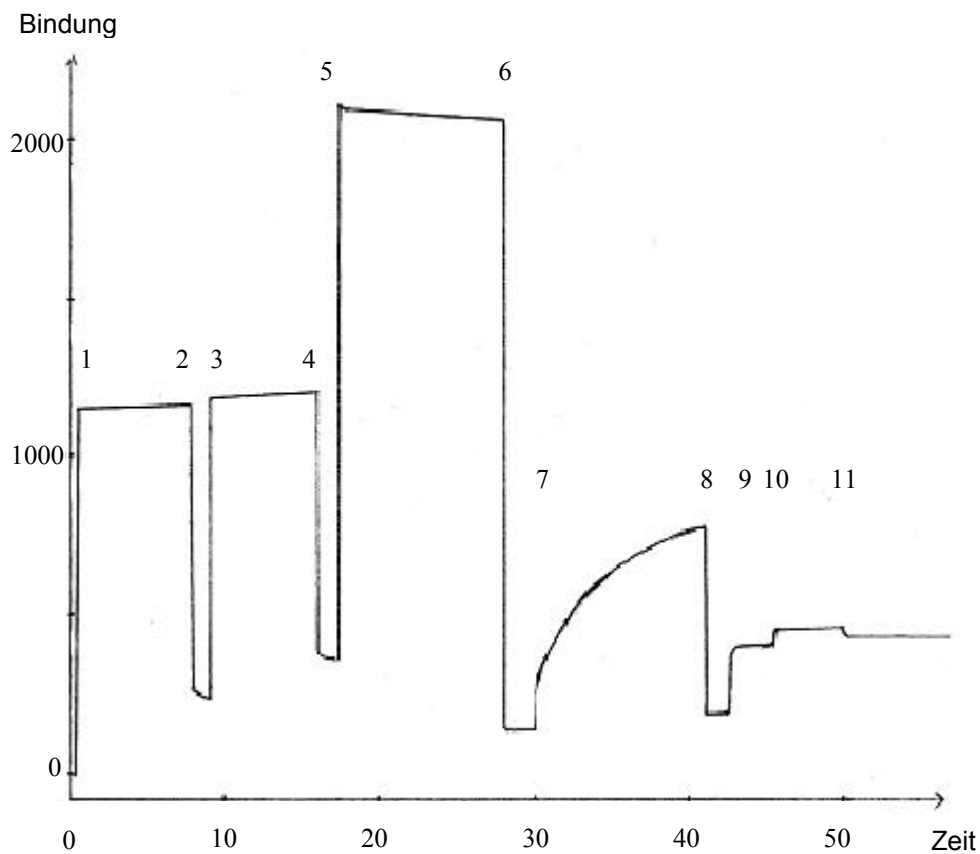


Abbildung 06: Graphen einer Immobilisierung an einer Aminosilan-Küvette

Beispiel eines Graphen über den Zeitraum der Immobilisierung von Antigenpräsentierenden Zellen an einer Aminosilan-Küvette. Die einzelnen Abschnitte definieren sich wie folgt (modifiziert nach IAsys, Thermo Labsystems, Cambridge, England):

- 1 1. Aktivierung mit EDC/NHS
- 2 Waschen mit PBS/T
- 3 2. Aktivierung mit EDC/NHS
- 4 Waschen mit PBS/T
- 5 Zugabe von 1M Diaminoethan
- 6 Waschen mit PBS/T
- 7 Zugabe von BS³
- 8 Waschen mit PBS/T
- 9 Zugabe von Zellen
- 10 erneute Zugabe von Zellen
- 11 Waschen mit PBS/T

Im Anschluss blocken der unspezifischen Bindungsstellen und Umstellung auf HBS.

2.1.2.3 Messzyklus

Abbildung 7 stellt das Prinzip eines Messzyklus schematisch dar:

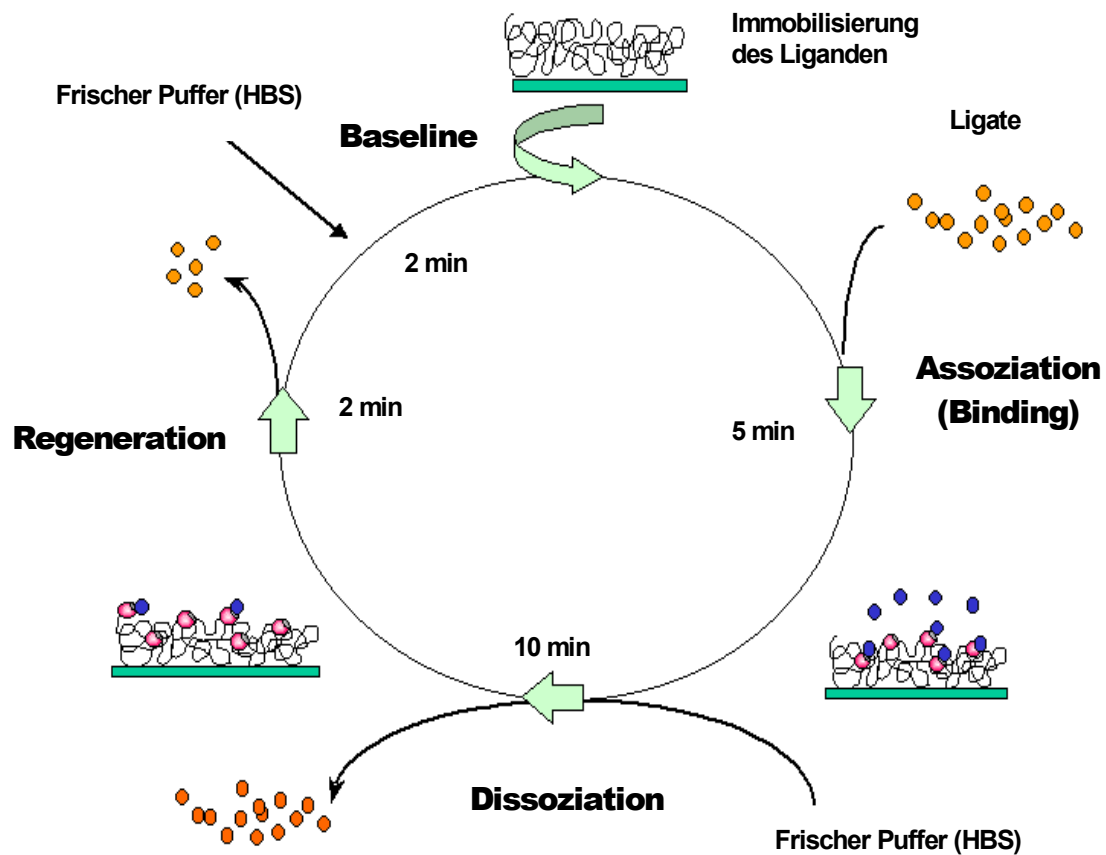


Abbildung 07: Schematische Darstellung des Messzyklus

Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung eines Messzyklus. Nach der abgeschlossenen Immobilisierung der Liganden kann mit der Messung begonnen werden. In der Phase der Assoziation binden die Liganden (Analyte) an die Liganden (immobilisierte Zellen). Nach einer Wäsche mit frischem Puffer folgt die Phase der Dissoziation. Diese ist gefolgt von der Regeneration und der erneuten Einstellung der Baseline mit HBS, nach der eine neue Messung begonnen werden kann. (modifiziert nach IAsys, Thermo Labsystems, Cambridge, England)

Im Detail stellte sich das Messprotokoll wie folgt dar:

Nachdem sich mittels 3x 120µl HBS eine konstante Baseline eingestellt hatte, wurde das HBS durch die zu analysierende Lösung, bestehend aus 120µl Erythrozyten und 120µl Plasmapräparation oder 120µl Plasma- und

Immunglobulinpräparation ersetzt. In einer 5-minütigen Phase der Assoziation (Binding) konnten die Endothelzellen oder die dendritischen Zellen unter dem Einfluss der Plasma- und Immunglobulinpräparation beziehungsweise der Plasma- und Immunglobulinpräparation eine Bindung mit den Erythrozyten eingehen. Nicht an die Zielzellpopulation gebundene Erythrozyten wurden anschließend durch Waschen der Küvettenoberfläche mit HBS (pH 6,6 - 6,8) aus der Küvette entfernt. Anschließend wurde in HBS über einen Zeitraum von 10 Minuten die Dissoziation der gebundenen Erythrozyten von der Oberfläche der Zielzellpopulation unter real-time Bedingungen online verfolgt und dokumentiert. Es erfolgte eine anschließende Regeneration der Küvettenoberfläche. Dazu musste 3x 120µl 10mM HCl, ohne Einwirkzeit, und danach 3x 120µl 1 mM HCl für zwei Minuten auf die Küvette pipettiert werden. Zum Abschluss des Messzyklusses wurde erneut die Baseline mit 3x 120µl HBS eingestellt, so dass eine neue Messung begonnen werden konnte.

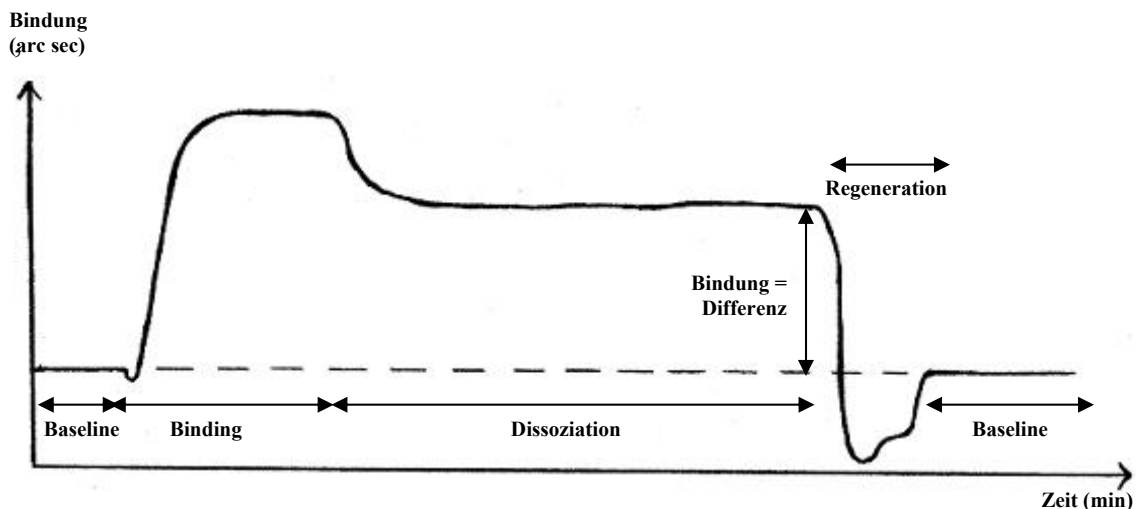


Abbildung 08: Graphen eines Messzyklus

Gezeigt wird ein Beispiel des Graphen eines Messzyklus. Beginnend mit einer stabilen Baseline erfolgt nach Zugabe des Analyts die Bindung an die Küvettenoberfläche. Nach der Wäsche mit Puffer folgt die Phase der Dissoziation. Am Ende der Dissoziationsphase kann die Stärke der Bindung als Differenz zwischen Baseline und Dissoziation abgelesen werden. Vor der nächsten Messung muss die Oberfläche regeneriert werden und erneut eine stabile Baseline eingestellt werden.

Um die Intensität der Erythrozyten-Zell-Interaktion zu ermitteln, wurde die Differenz, gemessen in arc sec, zwischen dem Level der Baseline direkt vor der Assoziation und dem Level der Dissoziation direkt vor der Regeneration gebildet.

2.2 Untersuchung der funktionellen Bedeutung der Erythrozyten-Zell-Interaktionen mit der Genchip-Analytik

2.2.1 Untersuchung des Einflusses von Erythrozyten und unterschiedlichen Blutplasmen auf die Genexpression von Monozyten und Endothelzellen mittels PIQOR™ Immunology Microarray

Die funktionelle Relevanz des Einflusses therapeutisch einsetzbarer Immunglobulinpräparationen auf die Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion, sowie die Erythrozyten-Monozyten-Interaktion wurde orientierend in Experimenten zur Analyse des Endothelzell- und Monozyten-Genexpressionsprofils untersucht. Die Durchführung dieser Analyse erfolgte unter dem Einfluss der therapeutisch einsetzbaren Immunglobulinpräparationen IVIgG und IVIgM.

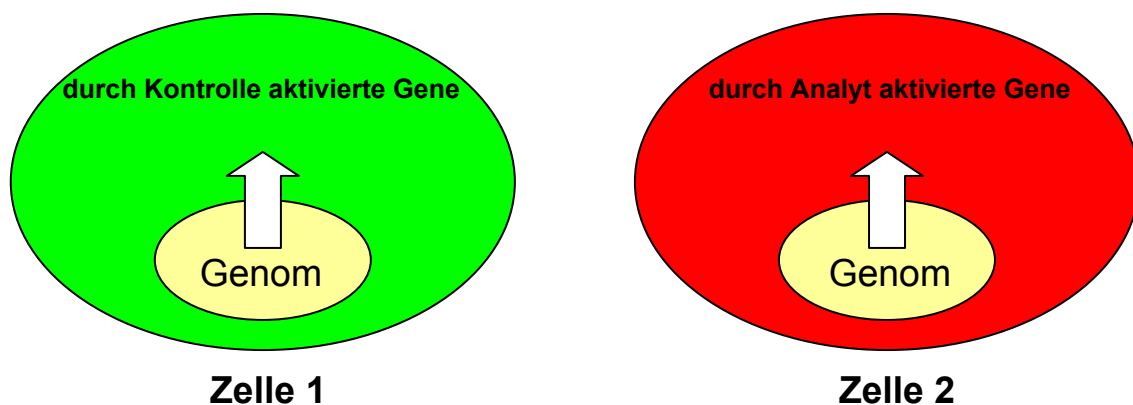


Abbildung 09: Prinzip der komparativen Genexpressionsanalyse

In den Versuchen wird die Aktivierung von Genen in den Testzelle festgestellt und unterschieden, ob diese Aktivierung durch eine Kontrollsubstanz oder ein Analyt bewirkt wurde (modifiziert nach Memorec Biotec GmbH, Köln, Deutschland)

Zur Genexpressionsanalyse fand der PIQOR™ Immunology Microarray (Memorec Biotec GmbH, Köln, Deutschland) [18] Verwendung.

Auf 8-Well-Platten (Nunc GmbH + Co KG, Wiesbaden, Deutschland) sind die in Tabelle 1 aufgelisteten Proben angesetzt worden:

Tabelle 01: Probenübersicht für die Genchip-Analytik

Probenbezeichnung	Ansatz	Lagendauer der RBC-Pools
M_01	M + RBC + HBS	1d
M_02	M + RBC + Normalplasma	1d
M_08	M + RBC + IVIgG	1d
M_09	M + RBC + IVIgM	1d
EC_01	EC + RBC + HBS	1d
EC_02	EC + RBC + Normalplasma	1d
EC_08	EC + RBC + IVIgG	1d
EC_09	EC + RBC + IVIgM	1d

Gezeigt wird die Probenübersicht mit der Versuchsnummer, dem eingesetzten Substanzen und der Lagerungsdauer der eingesetzten Erythrozytenpools. (modifiziert nach Memorec Biotec GmbH, Köln, Deutschland)

M: Monozyten

EC: Endothelzellen

IVIgG: intravenöses Immunglobulin G

IVIgM: intravenöses Immunglobulin M

Für die Versuche wurden 5×10^5 Endothelzellen mit 4×10^9 Erythrozyten und 5×10^6 Monozyten mit 4×10^9 Erythrozyten eingesetzt. Unter dem Einfluss der verschiedenen Analyte sind die Zellen kultiviert und nach einem festgelegten Zeitpunkt geerntet worden. Die bei -192°C in flüssigem Stickstoff tiefgefrorenen Zellen wurden danach an die Firma Memorec Biotec GmbH (Köln, Deutschland) eingesandt. Die Präparation der RNA aus den Monozyten und Endothelzellen und die Hybridisierung der Genchips übernahm die Firma Memorec. Die Datenauswertung erfolgte am Institut für Transfusionsmedizin im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit.

2.2.2 Präparation der RNA

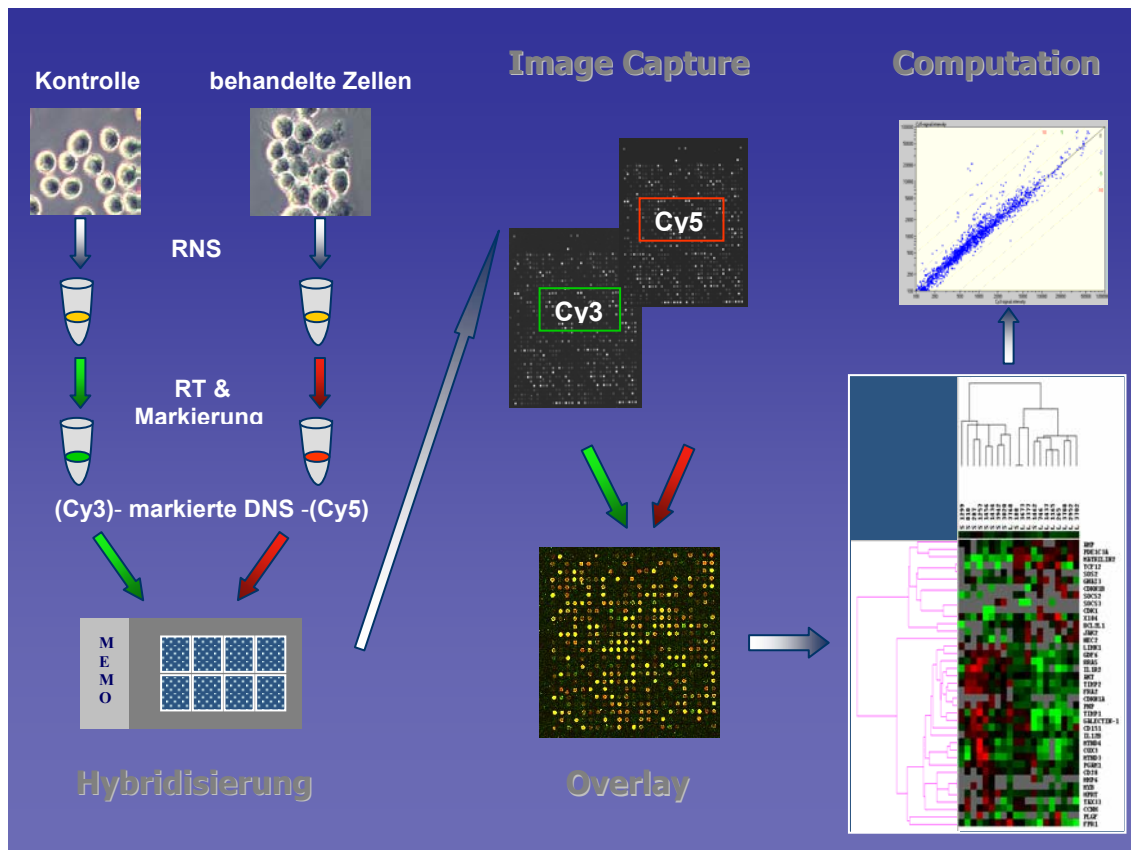


Abbildung 10: Anfertigung eines Genexpressionsprofils

Gezeigt wird das Prinzip der Erstellung eines Genexpressionsprofils. Nach der RNA-Isolierung folgt ihre Reinigung und Markierung mit fluoreszenzmarkierten Nucleotiden (Cy3 oder Cy5), je nach Herkunft (RNA aus Kontrollzellen, oder aus behandelten Zellen). Die Auswertung erfolgt nach der Hybridisierung mittels eines Laser-Scanning-Geräts und der Übereinanderlegung der beiden digitalen Bilder (Overlay). Mit Hilfe des Computers wurden Hintergrundwerte entfernt, Signale normiert und Artefakte mittels visueller Kontrolle ausgeschlossen. (modifiziert nach Memorec Biotec GmbH, Köln, Deutschland)

Die gefrorenen Zellpellets wurden in je 3,5ml RNA-Extraktionslösung gegeben (Blood RNA kit, QIAGEN GmbH-Germany, Hilden, Deutschland) und bei Raumtemperatur innerhalb von zwei Stunden gelöst. Mit dem PAXgene Blood RNA Kit (PreAnalytiX, QIAGEN GmbH-Germany, Hilden, Deutschland) erfolgte die Isolierung und Reinigung der RNA gemäß des PAXgene Blood RNA Kit Handbuch nach folgendem Prinzip:

- selektive Lyse der Erythrozyten
- Trennung von den Leukozyten / Endothelzellen durch Zentrifugation
- Lyse der Leukozyten / Endothelzellen unter stark denaturierenden Bedingungen (Inaktivierung der RNAsen)
- Homogenisierung mit der QIAshredder™ Spinsäule und Zugabe von Ethanol
- Bindung der RNA an die QIAamp Membran (Silicagel Membran)
- Entfernung der übrigen Substanzen durch dreimaliges Waschen
- Elution der gebrauchsfertigen RNA

Anschließend erfolgte die spektrometrische Vermessung mit dem Bioanalyzer 2001 (Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) zur Bestimmung der Reinheit und der Konzentration der RNA sowie der RNA-Ausbeute.

2.2.3 *Hybridisierungen der PIQOR™ Microarrays*

Für die Erstellung der Expressionsprofile wurde jeweils 1µg aRNA jeder Versuchsgruppe verwendet und mit dem fluoreszenzmarkierten Nucleotid Cy3-dCTP (Cy3: Referenzprofil) oder Cy5-dCTP (Cy5: Profil der Zellen unter dem Einfluss des Analyts) markiert. Auf dem PIQOR™ Immunology Microarray ist gemäß Hybridisierungsplan (Tabelle 2) die Hybridisierung durchgeführt worden. Memorec hat für die Erstellung des PIQOR™ Immunology Microarray cDNA-Fragmente der Spezies Mensch, Maus und Ratte zusammengestellt, welche für die bestimmten Fragestellungen ausgesucht, kloniert und sequenziert wurden. Zum Erreichen einer möglichst hohen Selektivität und zur Vermeidung von falsch positiven und falsch negativen Ergebnissen durch Kreuzhybridisierung mussten von den cDNA-Fragmenten folgende Kriterien erfüllt werden:

1. enthalten sind keine repetitiven Elemente (z.B. Alu, B1, MIRs, Mikrosatelliten)
2. die Sequenzhomologie zu allen anderen bekannten cDNAs (öffentliche Datenbanken) ist < 85%
3. die Fragmentlänge beträgt 200 - 400 bp
4. alle alternativen Spleiß- und Polyadenylierungsvarianten werden von den ausgewählte Fragment abgedeckt

Ursprünglich war vorgesehen, dass die Proben M_02 und EC_02 als Kontrollen (Cy3-Markierung) eingesetzt werden sollten. Allerdings erhielt man bei den Endothelzell-Experimenten nicht genügend aRNA der Kontrollprobe für alle geplanten Hybridisierungen. Aus diesem Grund wurde ein Pool aus vier Endothelzell-Proben als Kontrollprobe für die Endothelzell-Experimente erstellt und mit Cy3 markiert.

Tabelle 02: Hybridisierungsplan der Microarrays

Experiment/ Hybridisierung	Cy5-Markierung (Analyt)	Cy3-Markierung (Kontrolle)	Microarray Nummer
1	M_01	M_02	000305(041)
7	M_08	M_02	000305(047)
8	M_09	M_02	000305(048)
9	EC_01	Pool EC	000305(049)
10	EC_02	Pool EC	000305(050)
16	EC_08	Pool EC	000305(056)
17	EC_09	Pool EC	000305(057)

Es wird der Plan für die Hybridisierungen der 7 Microarrays gezeigt. Versuche 1, 7 und 8 wurden an Monozyten durchgeführt und Versuche 9, 10, 16 und 17 an Endothelzellen. Als Kontrolle für die Monozytenhybridisierungen wurde M_02 (Monozyten + Erythrozyten + Normalplasma) verwendet und für die Endothelzellversuche ein Pool EC (Endothelzellen + Erythrozyten + WAIHA + CAD + IVIgG + IVIgM). (modifiziert nach Memorec Biotec GmbH, Köln, Deutschland)

2.2.4 Erstellung der Expressionsprofile

Um ein Expressionsprofil zu erhalten, sind die Fluoreszenzsignale der hybridisierten Microarrays mittels eines Laser-Scanning-Geräts (ScanArray Lite, Packard Bioscience) eingelesen und die Bilder der beiden Fluoreszenzmarkierungen digital übereinander gelegt („Overlay“) worden. Die Overlays der Versuche sind in Abbildung 11 dargestellt.

Exp.1



Exp.7



Exp.8



Exp.9



Exp.10



Exp.16



Exp.17



Abbildung 11: Overlays der verschiedenen Microarrays

Die Abbildung zeigt die digital übereinandergelegten Cy5- und Cy3-Bilder ("Overlays") nach dem Einlesen der Microarrays in den Computer. Es sind drei verschiedene Farben zu erkennen: Die roten Markierungen stehen für eine erhöhte Intensität der Genexpression der Cy5-markierten Gene, die grünen für eine Erhöhung der Expression der Cy3-markierten Gene. Bei gleicher Expressionsintensität sind gelbe Markierungen zu finden. (Abbildung übernommen von Memorec Biotec GmbH, Köln, Deutschland)

In den Overlays sind drei verschiedene Farben zu erkennen. Die rote Markierung bedeutet, dass das zu analysierende Gen, also das Gen mit der Cy5-Markierung, eine höhere Intensität der Genexpression aufweist, als die Kontrolle. Erscheint eine grüne Markierung, drückte dies umgekehrt aus, dass das Gen im Kontrollansatz (Cy3-Markierung) höher exprimiert wurde. Fluoreszenzen, welche die gleiche Intensität aufwiesen und somit in beiden

Ansätzen die Expression des Gens gleich stark war, konnten als gelbe Signale identifiziert werden. Vor der eigentlichen Erstellung des Expressionsprofils der hybridisierten Microarrays mussten noch die Signal- und Hintergrund-Intensitäten von Cy3 und Cy5 mittels der ImaGene™ Software 5.1 (BioDiscovery) bestimmt werden. Nach Abzug der Hintergrundwerte von den Signalintensitäten abgezogen konnte der Quotient aus Cy5/Cy3-Signal berechnet werden. Die Werte wurden über den Medien aller Signalquotienten normiert und danach der Mittelwert der 4-fache Replikate berechnet. Zum Ausschluss von Artefakten erfolgte eine visuelle Kontrolle. In der Auswertung sind ausschließlich Werte (Signalquotienten Cy5/Cy3) dargestellt worden, bei denen die Intensität der Fluoreszenz mindestens 2-fach über dem Mittelwert des Hintergrundes aller validen Spots („unflagged“) lag und wurden somit als „detektiert“ bezeichnet. Durch die Erfüllung dieser Kriterien konnten falsch positive Ergebnisse, verursacht durch sehr schwache Signalwerte, ausgeschlossen werden.

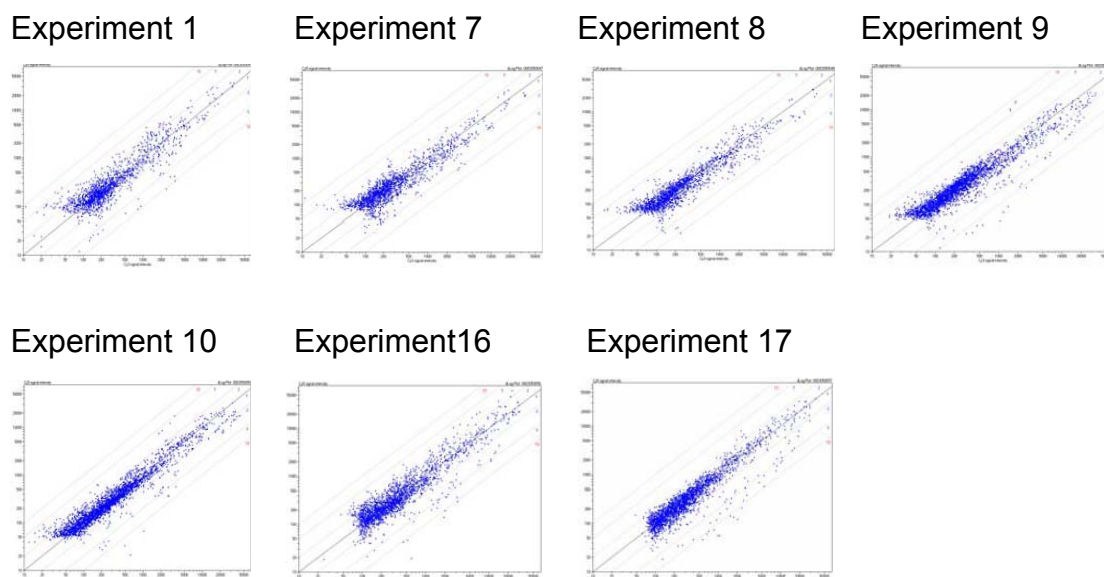


Abbildung 12: Signalintensitäten

Beispielhafte Darstellung der Signalintensitäten der Spots in den Experimenten 1, 7, 8, 9, 10, 16 und 17. Die Signalintensitäten der jeweiligen cDNA (als Punkt erkennbar) ist doppellogarithmisch dargestellt. Auf der Abszisse sind die Cy3-Signalintensität, auf der Ordinate die Cy5-Signalintensität aufgetragen. Die gestrichelten Diagonalen definieren die

Bereiche x-fach differentieller Signalintensitäten. (übernommen von Memorec Biotec GmbH, Köln, Deutschland)

2.2.5 Datenanalyse

Die Ergebnisse der Genanalysen lieferte die Memorec Biotec GmbH (Köln, Deutschland) in Form von Excel-Tabellen. Ein Ausschnitt aus der Tabelle, die die Ergebnisse des Ansatzes M_08 mit der Microarray Nr. 047 darstellt ist hier beispielhaft abgebildet.

Tabelle 03: Ergebnisse der Genexpressionsprofile

A	B	C	D	E
Gene #	Gene name	SProt/trEMBL	UniGene	3050047
664	C3AR1	Q16581 Q92868 O43771	Hs.155935	0.34 / 8 %
970	EBI2	P32249	Hs.784	0.80 / 17 %
1026	GPR17	Q13304 Q9UDZ6 Q9UE21	Hs.46453	2.60 / 20 %
1068	PTAFR	P25105	Hs.46	0.49 / 23 %
1416	TGFB1_1	Q9UCG4 P01137	Hs.1103	1.11 / 30 %
1436	VEGF_1	Q16889 O60720 O75875 Q9U	Hs.73793	1.94 / - %
1638	CBP	O60759 Q8NE32 Q15630 Q91	Hs.270	1.40 / 20 %
1695	GRO1_HUMAN	P09341	Hs.789	0.55 / 7 %
1718	HSPCA	Q9BVQ5 P07900	Hs.446579	0.93 / 8 %
1928	ITK	Q08881	Hs.211576	5.10 / 20 %
1935	LCK	P06239 P07100 Q9NYT8 Q96	Hs.1765	2.44 / 13 %
2011	CCR1	P32246	Hs.301921	0.22 / 14 %
2073	CX3CR1	P49238	Hs.78913	1.29 / - %
2185	LAP18	P16949	Hs.209983	2.99 / 55 %

Die Ergebnisse der Genchip-Analysen übermittelte Memorec in Form einer Excel-Tabelle. Als Ergebnis wurde eine Kandidatenliste der Gene aufgestellt, die gleiche oder 2-fach größere Signalintensitäten gegenüber den Negativkontrollen hatten und die größer oder gleich 1,5-fach differentiell exprimiert wurden. Diese Liste enthielt die Nr. des Gens in der Memorec Kollektion von cDNA-Fragmenten (Spalte A) den Gennamen (Spalte B), den SwissProt- und UniGene-Eintrag (Spalte C + D) und den Signalquotienten und den Variationskoeffizient der Doppelspots (Spalte E). Der Signalquotient bildet sich aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensität von Cy5 zu Cy3. Der Kehrwert der Quotienten wurde für die reprimierten Gene mit -1 multipliziert. Die mindestens 2-fach hochregulierten Gene sind von Memorec Biotec GmbH rot unterlegt worden, während die mindestens 2-fach herunterregulierten Gene grün gekennzeichnet wurden. (Tabelle übernommen von Memorec Biotec GmbH, Köln, Deutschland)

Die weitere Aufarbeitung der von der Firma Memorec gelieferten Rohdaten (4-fach Spots-Replikate) erfolgte eigenständig im Rahmen der hier vorgelegten Dissertation in Zusammenarbeit mit Frau N. Osada, wiss. Mitarbeiterin im Institut für Medizinische Informatik und Biomathematik der WWU Münster. Zentrales Element der Aufarbeitung war die SAM-Analyse (Significance Analysis of Microarrays). Mittels der Software „siggenes“ (Version 1.8.0.) von Bioconductor - ein open source und open development Software-Projekt zur Analyse und zum Verständnis genomischer Daten - wurden die signifikant unterschiedlich exprimierten Gene identifiziert und die FDR (false discovery rate) geschätzt [50]. Unter der Bedingung, die FDR auf maximal 10% und die Anzahl der falsch positiven Gene auf maximal 2 zu begrenzen, sind 20 Gene mit den signifikantesten Unterschieden bezüglich der Genexpression unter Einfluss der beiden Plasmapräparationen mittels „siggenes“ identifiziert worden. Anschließend erfolgte eine Einordnung diese 20 signifikanten Gene in die immunologische Funktionsgruppen der Firma Memorec. Die Analyse des Genmusters (induzierte und reprimierte Genexpression) ermöglicht es, eine Aussage über die biologische Relevanz des Plasmamilieus und der Erythrozyten-Zell-Interaktionen zu treffen.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung von Erythrozyten-Zell-Interaktionen unter Real-Time-Bedingungen

3.1.1 Validierung der Methodik

3.1.1.1 Reproduzierbarkeit der Messungen

Zur Überprüfung der Beschaffenheit und der Eigenschaften der einzelnen Küvetten während der Versuchszeit, wurden regelmäßig Messungen der Erythrozyten-Zell-Interaktion unter dem alleinigen Einflusses eines Plasmapools

gesunder Probanden, der vor Beginn der Versuchsreihen angesetzt wurde, durchgeführt. An allen Küvetten zeigte sich bei diesen Messungen eine Konstanz der Werte. Die folgenden Diagramme zeigen an einigen der Erythrozyten-Zell-Interaktionen exemplarisch die Reproduzierbarkeit der Messungen:

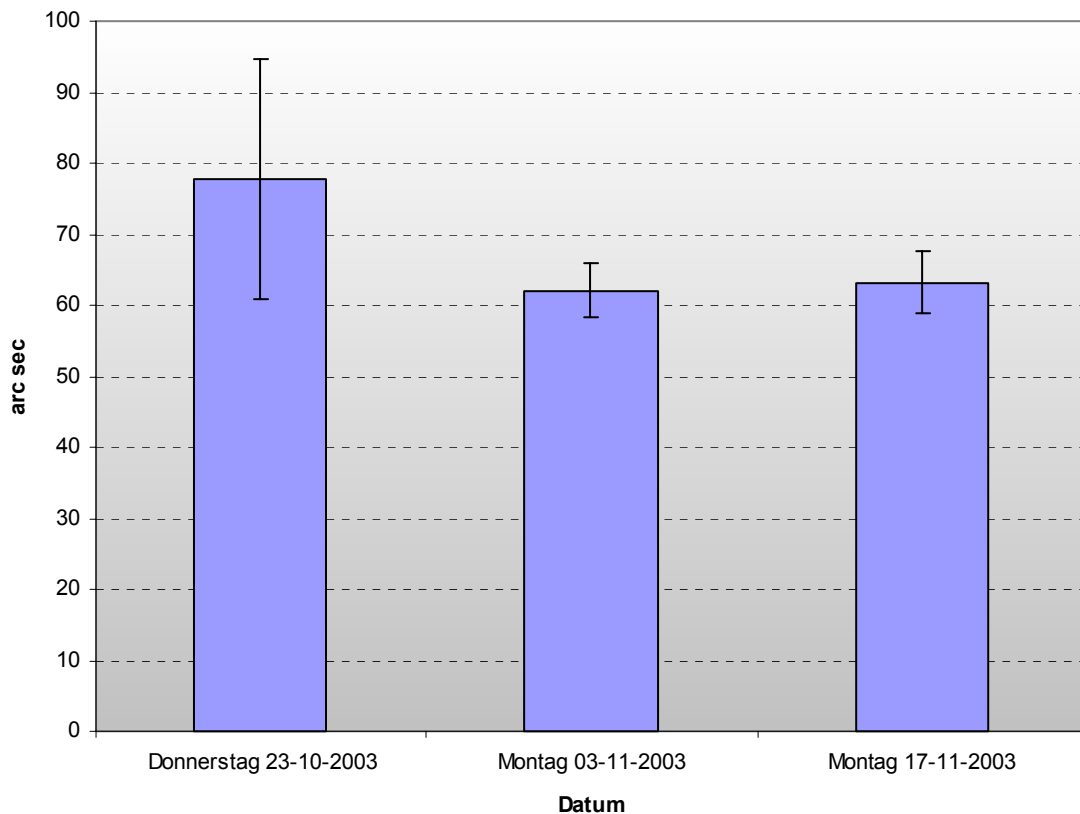


Abbildung 13: Reproduzierbarkeit der Messungen an der HDMEC-Küvette

Die Abbildung zeigt drei Messungen an der HDMEC-Küvette, welche an drei nicht aufeinander folgenden Tagen durchgeführt wurden. Es handelt sich bei den dargestellten Werten um Mittelwerte, die jeweils aus drei einzelnen Messzyklusergebnissen gebildet wurden.

Anhand dieser Messungen ist ersichtlich, dass auch über einen längeren Zeitraum die Werte nur geringen Schwankungen unterworfen sind. Um diese Aussage weiter zu belegen, wurde der Mittelwert über alle Plasmamessungen für jede einzelnen Küvetten errechnet und mit den exemplarischen Einzelwerten verglichen. Bei der HDMEC-Küvette betrug der Mittelwert 66,98 arc sec und lag somit im Bereich der oben aufgelisteten Einzelwerte.

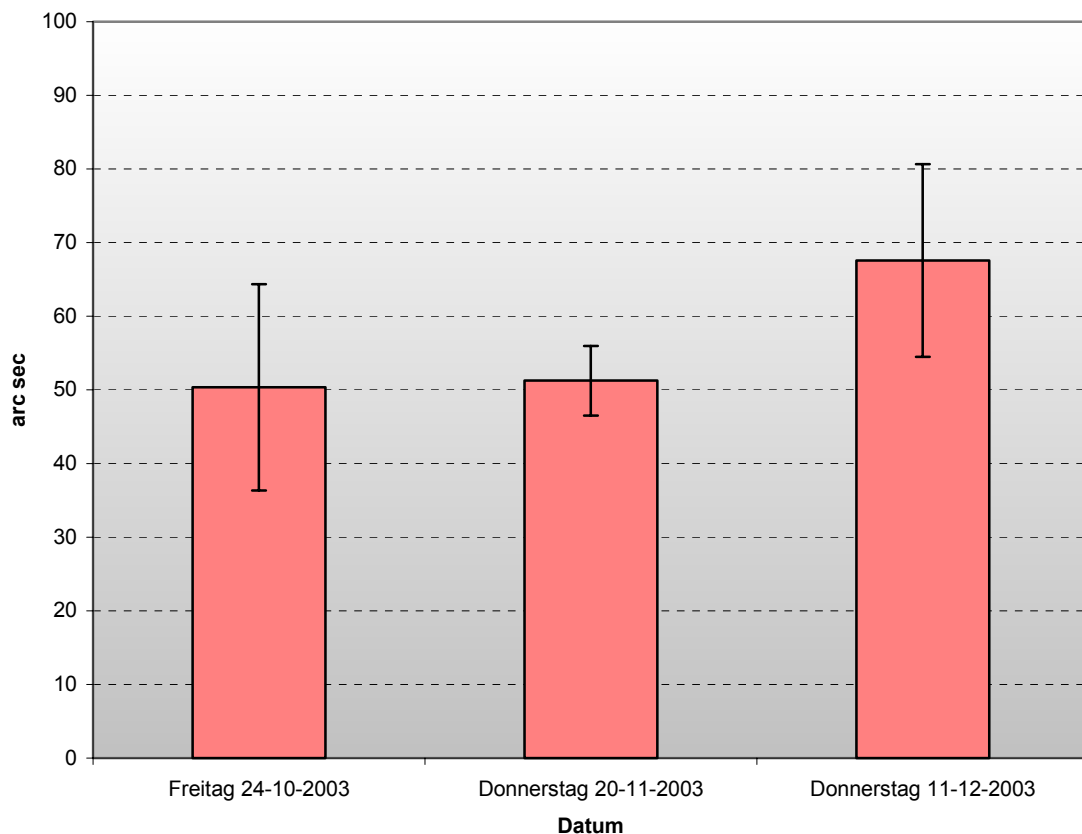


Abbildung 14: Reproduzierbarkeit der Messungen an der DC-Küvette

Die Abbildung zeigt drei Messungen an der DC-Küvette, welche an drei nicht aufeinander folgenden Tagen durchgeführt wurden. Es handelt sich bei den dargestellten Werten um Mittelwerte, die jeweils aus drei einzelnen Messzyklusergebnissen gebildet wurden.

Auch an der DC-Küvette lagen die Werte eng beieinander und sprechen somit für eine gute Reproduzierbarkeit der Messung. Der Mittelwert aller Plasmamessungen an der DC-Küvette betrug 55,48 arc sec und belegt diese Aussage zusätzlich.

Zusammenfassend sprechen die Daten für eine hohe Wertigkeit der angewandten Methode im Bezug auf die Reproduzierbarkeit der einzelnen Messungen und damit auch für die Authentizität der gesamten Daten der Versuchsreihen. Es ist somit möglich, über einen längeren Versuchszeitraum hinweg zuverlässige Daten zu produzieren. Zudem ist die Konstanz der Daten Nachweis der gleichbleibenden Oberflächenqualität der Küvette. Die Beachtung der Standardabweichung bei allen Messungen ist im Hinblick auf die häufige

Arbeit mit Mittelwerten bei der späteren Auswertung zu sehen. Diese war im Durchschnitt aller Messungen mit ca. 13,04% gering. In der folgenden Tabelle sind einige Messungen mit den dazugehörigen Mittelwerten und Standardabweichungen exemplarisch aufgeführt.

HDMEC	Best. 1	Best. 2	Best. 3	MW	Std.-Abw.	Std.-Abw. in %
19.11.2003						
120 µl RBC + 60 µl Sp 1 + 60 µl Pp	66,6	51,52	51,02	56,38	8,85	15,7
	0	0	0	0	0	0
120 µl RBC + 60 µl Sp1 + 60 µl IVIG	80,93	69,59	73,22	74,58	5,79	7,76
	0	0	0	0	0	0
120 µl RBC + 60 µl Sp 1 + 60 µl IVIgM	43,35	50,88	39,08	44,44	5,97	13,43
	0	0	0	0	0	0
DC	Best. 1	Best. 2	Best. 3	MW	Std.-Abw.	Std.-Abw. in %
12.11.2003						
120 µl RBC + 60 µl WAIHA 2 + 60 µl Pp	23,05	23,06	20,58	22,23	1,43	6,43
	0	0	0	0	0	0
120 µl RBC + 60 µl WAIHA 2 + 60 µl IVIG	4,47	4,3	0	2,92	2,53	86,64
	0	0	0	0	0	0
120 µl RBC + 60 µl WAIHA 2 + 60 µl IVIgM	26,79	25,03	33,85	28,56	4,67	16,35
	0	0	0	0	0	0

Abbildung 15: Exemplarische Mittelwerte und Standardabweichungen

Die Tabelle zeigt exemplarisch je drei Messreihen an der HDMEC- und der DC-Küvette. In den drei rechten Spalten sind der Mittelwert (MW), die Standardabweichungen (Std.-Abw.) und die Standardabweichung in % (Std.-Abw. in %) zu sehen.

Um die einzelnen Werte der Messungen, welche die Auswirkung des Einflusses von therapeutisch applizierbarem Immunglobulin untersuchen, miteinander vergleichen zu können, wurde zudem für jeden Versuchsansatz auch eine Messung mit dem oben genannten Plasmapool durchgeführt. Diese Messung sind dann zur Normierung der jeweilig zugehörigen Versuchswerte herangezogen worden. Die Messung des Versuchsansatzes mit dem Plasmapool ist gleich 100 Prozent und die zugehörigen Werte zu diesem ins Verhältnis gesetzt worden wie aus folgenden Beispiel ersichtlich wird. An der HDMEC-Küvette wurde ein Absolutwert der Plasmamessung von 53,21 arc sec gleich 100% gesetzt und die zugehörige Messungen von IVIgG und IVIgM mit 52,23 arc sec und 1,89 arc sec mit 98,16% und 3,55% im Verhältnis zu dieser

Messung angegeben. Durch dieses Vorgehen war eine objektive Betrachtung der Messwerte möglich und somit eine optimalen Ausgangssituation für die Auswertung der Analyse geschaffen.

3.1.1.2 Bindungsintensitäten bei 20°C und bei 37°C

Eine weitere Frage, die sich vor Beginn der Messungen stellte, war die der Temperaturabhängigkeit der Erythrozyten-Zell-Interaktion in Anwesenheit verschiedener Patientenplasmen (Plasma gesunder Probanden, WAIHA-Plasma und CAD-Plasma). Dazu sind vergleichende Messungen zur Adhäsion von Erythrozyten an mikrovaskulären Endothelzellen bei 20°C und bei 37°C unter dem Einfluss von Normalplasma (n = 6; Kontrollansatz), von Plasma von Patienten mit Wärmeautoimmunhämolyse (n = 6) und von Plasma von Patienten mit Kälteautoimmunhämolyse (n = 5 Temperaturamplitude auf den 4°C-Bereich beschränkt, Titer 8 - 512) durchgeführt worden. Es konnte keine statistisch signifikante Änderung der Bindungsintensität durch Änderung der Temperatur von 20°C auf 37°C bei der Erythrozyten-Zell-Interaktion unter Einfluss der verschiedenen hier eingesetzten Plasmen nachgewiesen werden. (HDMEC: p= 0,0849). Trotzdem wurden die Untersuchungen unter Einsatz von Plasma von CAD-Patienten grundsätzlich bei 37°C durchgeführt. Die Kontrollmessungen erfolgten mit Plasmapools gesunder Probanden bei 37°C im Parallelansatz.

3.1.1.3 IVIgM / IVIgG Dosis-Wirkungs-Kurven

Im Vorfeld der Untersuchungen zum Einfluss von therapeutischen Immunglobulinen auf die Erythrozyten-Zell-Interaktion sind Messungen durchgeführt worden, um die ideale Konzentration der einzusetzenden Immunglobuline, IVIgG und IVIgM, zu ermitteln. Dazu wurde der Einfluss der Immunglobuline in aufsteigender Konzentration an der HDMEC-Küvette gemessen. Zum Einsatz kam intravenöses Immunglobulin G in neun Verdünnungsstufen von 50 mg/ml bis 0,2 mg/ml. Zur Feststellung eines

Maximalwertes ist eine Messung mit Plasmapool und für einen Minimalwert eine Messung mit Plasmapool und HBS im Verhältnis 1:1 durchgeführt worden.

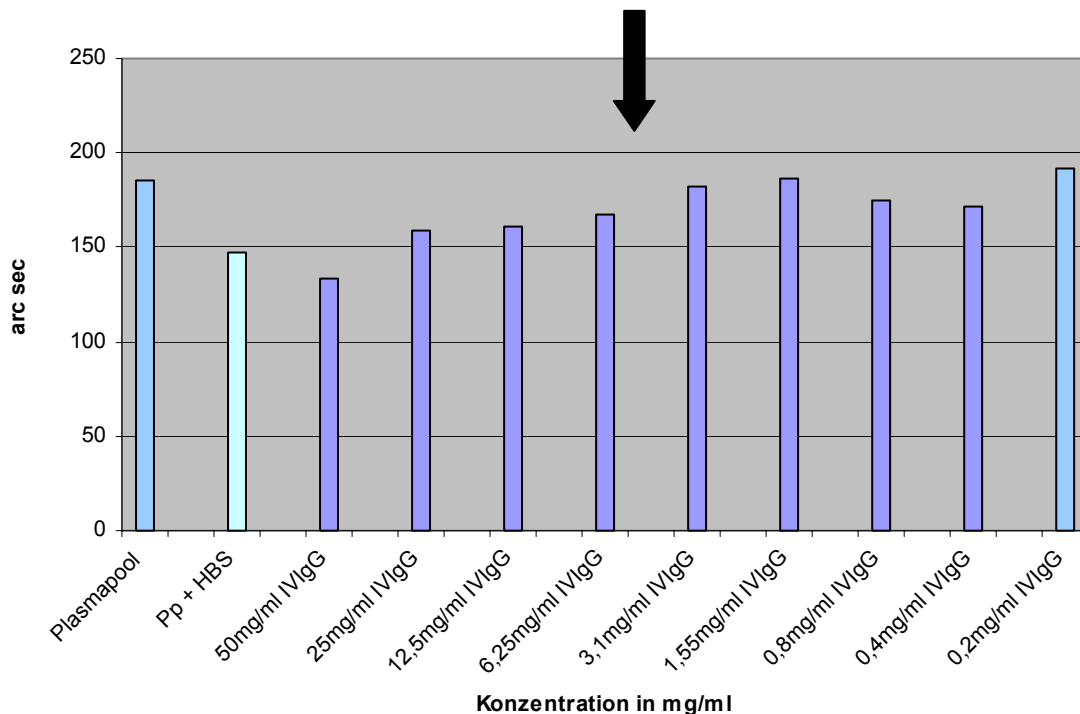


Abbildung 16: Dosis-Wirkungs-Kurve von IVIgG an HDMEC

In der Abbildung sind die Messergebnisse der 9 Verdünnungsstufen sowie eine Maximal- (Plasmapool) und eine Minimalkontrolle (Plasmapool mit HBS) zu sehen. Es handelt sich bei den dargestellten Werten um Mittelwerte, die jeweils aus drei einzelnen Messzyklusergebnissen gebildet wurden. Die Standardabweichung lag im Schnitt bei ca. 4.08%. Der Pfeil markiert die schlussendlich eingesetzte Konzentration von 5 mg/ml.

Abbildung 16 zeigt exemplarisch die Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit von IVIgG auf die Erythrozyten-HDMEC-Interaktion. Durch den Einfluss von IVIgG auf die Erythrozyten-Zell-Interaktion stiegen die Messwerte mit zunehmender Verdünnung des IVIgG bis zur optimalen Konzentration an und fielen danach wieder ab. Die Tatsache, dass sich die Messwerte bei immer stärker Verdünnung des IVIgG wieder dem Wert der Plasmapoolmessung (Maximalwert) annäherten, lässt sich durch den abnehmenden Einfluss des IVIgG und den zunehmenden Einfluss des Normalplasmas erklären. Aus diesem Grund ist die letzte Verdünnungsstufe in der Abbildung in der gleichen Farbe dargestellt, wie der Plasmapoolwert.

In den in dieser Arbeit nachfolgend dargestellten Untersuchungen ist eine Konzentration von 5 mg/ml IVIgG eingesetzt worden, auch, um im Vergleich mit dem parallel eingesetzten IVIgM, einem Pentamer, die gleiche Anzahl an Fab-Bindungsstellen für beide Immunglobuline in die Versuche einzubringen.

Ebenso ist bei der Ermittlung der Konzentration des intravenösen Immunglobulin M eine Maximalwertmessung mit Plasmapool und eine Minimalwertmessung mit Plasmapool und HBS im Verhältnis 1:1 durchgeführt worden. Die hier verwendeten Konzentrationen des intravenösen Immunglobulin M reichten von 20 mg/ml bis 0,08 mg/ml.

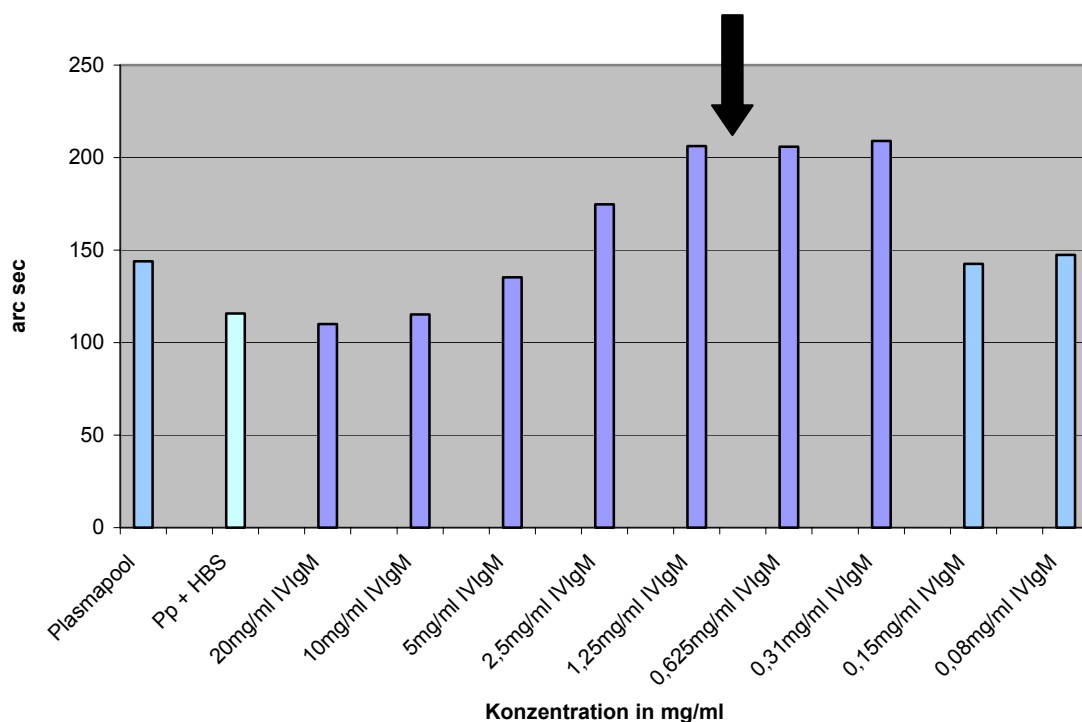


Abbildung 17: Dosis-Wirkungs-Kurve von IVIgM an HDMEC

In der Abbildung sind die Messergebnisse der 9 Verdünnungsstufen sowie eine Maximal- (Plasmapool) und eine Minimalkontrolle (Plasmapool mit HBS) zu sehen. Es handelt sich bei den dargestellten Werten um Mittelwerte, die jeweils aus drei einzelnen Messzyklusergebnissen gebildet wurden. Die Standardabweichung lag im Schnitt bei ca. 4,72%. Der Pfeil markiert die schlussendlich eingesetzte Konzentration von 1 mg/ml.

Abbildung 17 zeigt exemplarisch die Dosis-Wirkungs-Kurve von IVIgM an der HDMEC-Küvette. Auch hier stiegen die Messwerte mit zunehmender

Verdünnung des IVIgM bis zur optimalen Konzentration an und fielen danach wieder ab. Ebenfalls nähern sich die Messwerte bei sehr starker Verdünnung wieder dem Wert der Plasmapoolmessung (Maximalwert) an, was sich auch an dieser Stelle durch den abnehmenden Einfluss des IVIgM und den zunehmenden Einfluss des Normalplasmas erklären lässt. Aus diesem Grund sind hier die zwei letzten Verdünnungsstufen in der gleichen Farbe wie der des Plasmapoolwertes markiert.

In den in dieser Arbeit nachfolgend dargestellten Untersuchungen wurde eine Konzentration von 1 mg/ml IVIgM eingesetzt.

3.1.2 Einfluss therapeutisch applizierbaren Immunglobulins bei gesunden Probanden auf Erythrozyten-Zell-Interaktionen

3.1.2.1 Erythrozyten-HDMEC-Interaktionen

Abbildung 18 zeigt die Ergebnisse der Erythrozyten-HDMEC-Interaktionen im Vergleich der Substitution des Einzelspenderplasmas mit einem Normalplasmapool, mit IVIgG und mit IVIgM: Die Bindung zwischen Erythrozyten und Endothelzellen wird im Vergleich zu Normalplasma durch die Zugabe von IVIgG leicht erhöht, diese Erhöhung der Bindung ist jedoch nicht statistisch signifikant (Normalplasma versus NHP+IVIgG: $p=0,917$). Durch die Zugabe von IVIgM kommt es zu einer nicht statistisch signifikanten Minderung (Normalplasma versus NHP+IVIgM: $p=0,249$). Durch die gegensätzliche Auswirkung nach der Zugabe von IVIgG und IVIgM auf die Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion ist der Bindungsunterschied zwischen diesen beiden Messungen statistisch signifikant (NHP+IVIgG versus NHP+IVIgM: $p= 0,028$).

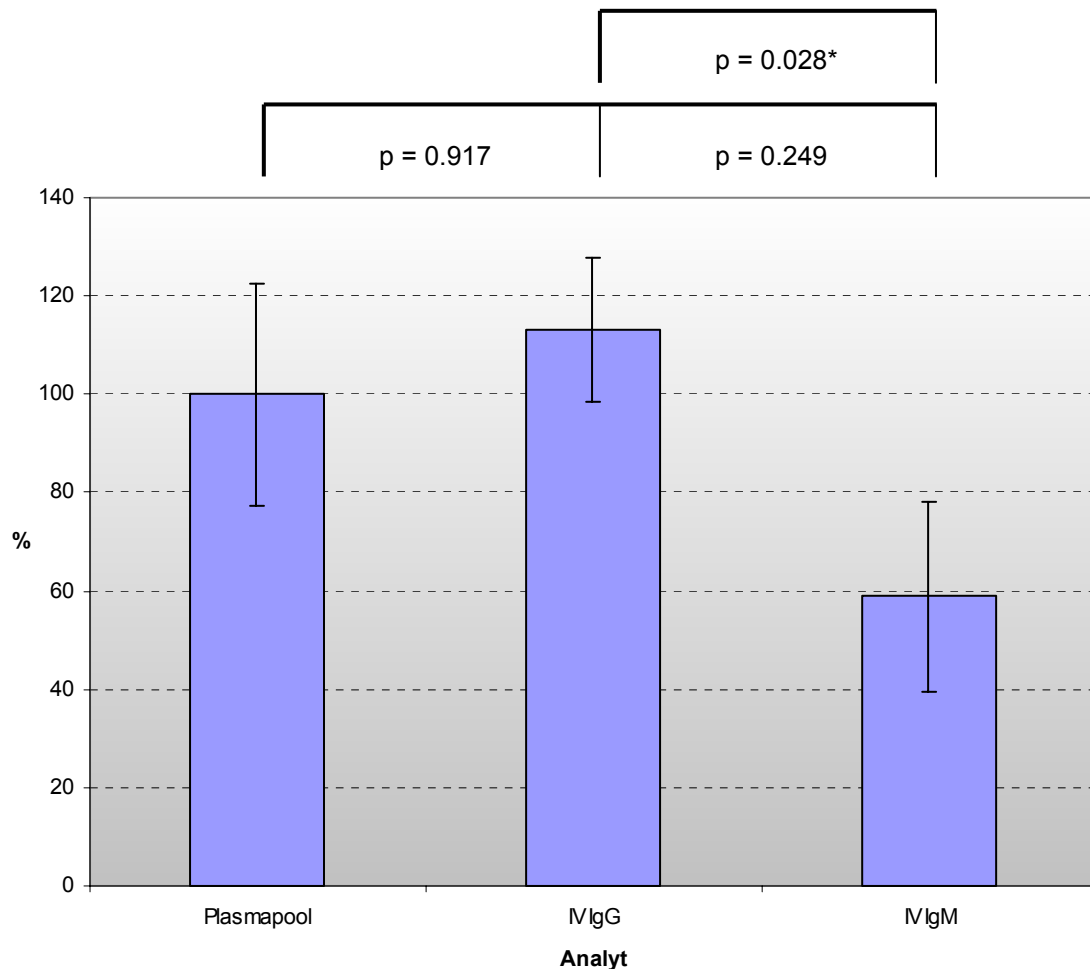


Abbildung 18: Auswirkung von IVIgG und IVIgM auf die Erythrozyten-HDMEC-Interaktion in Gegenwart von Normalplasma

Die Abbildung zeigt die Messergebnisse, gewonnen an mikrovaskulären Endothelzellen bei 20°C. Die Säulen stellen den Mittelwert der Messungen von 5 Einzelspenderplasmen (in der Regel jeweils im Dreifachansatz gemessen) inklusive der Standardabweichung dar. Bei der Interaktion reagierten jeweils 120µl RBC mit einer Plasmapräparation bestehend aus 60µl Spenderplasma und 60µl Normalplasmapool, IVIgG oder IVIgM, je nach Ansatz. Die mit einem * gekennzeichneten Unterschiede der Effekte auf die Interaktion sind statistisch signifikant (hier nur der Unterschied zwischen IVIgG und IVIgM).

3.1.2.2 Erythrozyten-DC-Interaktionen

Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse der Erythrozyten-DC-Interaktionen im Vergleich der Substitution des Einzelspenderplasmas mit einem

Normalplasmapool, mit IVIgG und mit IVIgM: Die Bindung zwischen Erythrozyten und dendritischen Zellen wird im Vergleich zu Normalplasma durch die Zugabe von IVIgG statistisch signifikant abgeschwächt (Normalplasma versus NHP+IVIgG: $p=0,046$). Auch durch die Zugabe von IVIgM zeigte sich eine Abschwächung der Bindungsintensität. Diese Minderung ist aber nicht statistisch signifikant (Normalplasma versus NHP+IVIgM: $p=0,249$). IVIgG mindert die Bindung am stärksten, der Unterschied zur IVIgM-induzierten Minderung ist aber nicht statistisch signifikant (NHP+IVIgG versus NHP+IVIgM: $p=0,753$).

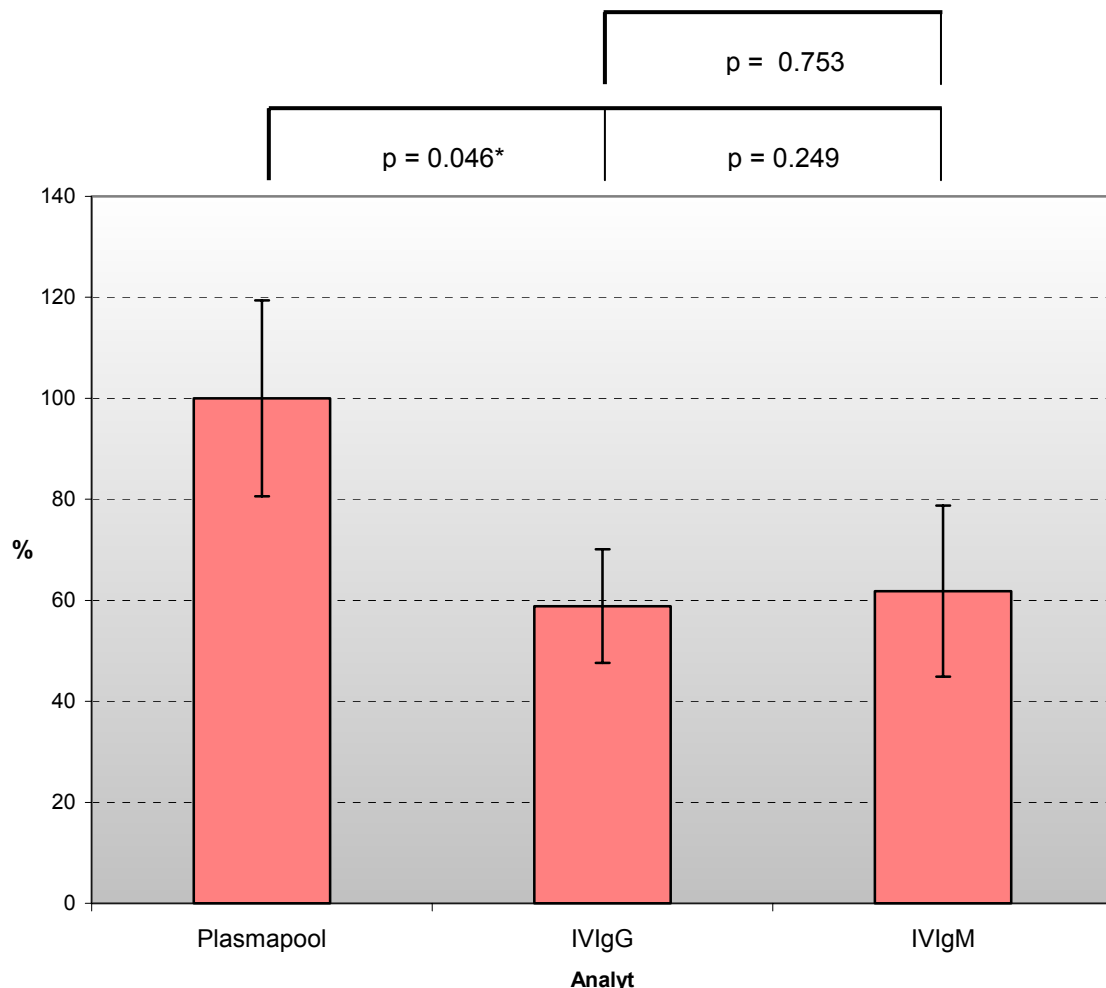


Abbildung 19: Auswirkung von IVIgG und IVIgM auf die Erythrozyten-DC-Interaktion in Gegenwart von Normalplasma

Die Abbildung zeigt die Messergebnisse, gewonnen an dendritischen Zellen bei 20°C. Die Säulen stellen den Mittelwert der Messungen von 5 Einzelspenderplasmen (in der Regel jeweils

im Dreifachansatz gemessen) inklusive der Standardabweichung dar. Bei der Interaktion reagierten jeweils 120µl RBC mit einer Plasmapräparation bestehend aus 60µl Spenderplasma und 60µl Normalplasmapool, IVIgG oder IVIgM, je nach Ansatz. Die mit einem * gekennzeichneten Unterschiede der Effekte auf die Interaktion sind statistisch signifikant (hier der Unterschied zwischen Normalplasma und IVIgG).

3.1.3 *Einfluss therapeutisch applizierbaren Immunglobulins bei Patienten mit anti-erythrozytären Wärmeautoantikörpern auf Erythrozyten-Zell-Interaktionen*

3.1.3.1 *Erythrozyten-HDMEC-Interaktionen*

Abbildung 20 zeigt die Ergebnisse der Erythrozyten-HDMEC-Interaktionen im Vergleich der Substitution der einzelnen Plasmen der Patienten mit Wärmeautoimmunhämolyse mit einem Normalplasmapool, mit IVIgG und mit IVIgM: Die Bindung zwischen Erythrozyten und Endothelzellen wird im Vergleich zu Normalplasma durch die Zugabe von IVIgG nicht statistisch signifikant verändert (NHP+WAIHA-Plasma versus WAIHA-Plasma+IVIgG: $p=0,116$). Durch die Zugabe von IVIgM wird die Bindungsintensität statistisch signifikant gemindert (NHP+WAIHA-Plasma versus WAIHA-Plasma+IVIgM: $p=0,028$). IVIgM mindert die Bindung stärker als IVIgG. Der Unterschied ist aber nicht statistisch signifikant (WAIHA-Plasma+IVIgG versus WAIHA-Plasma+IVIgM: $p=0,173$).

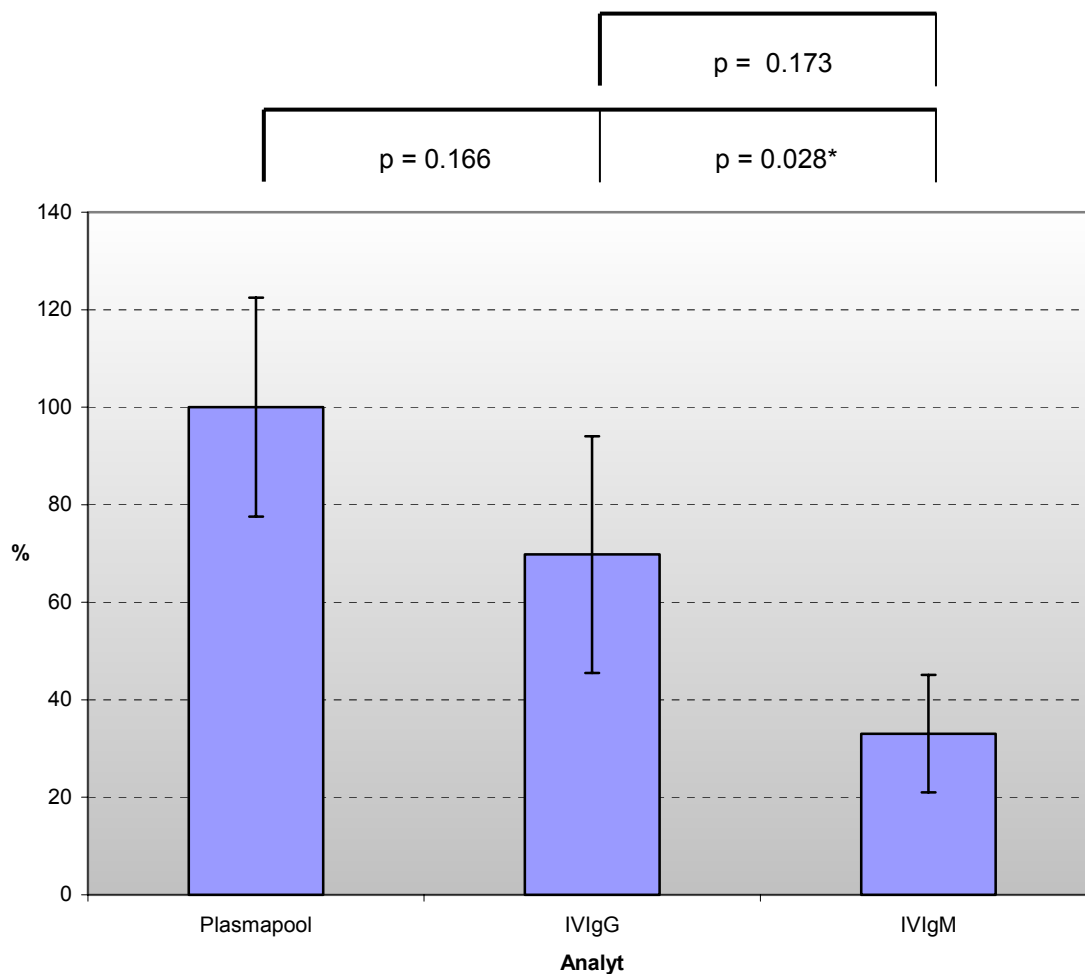


Abbildung 20: Auswirkung von IVIgG und IVIgM auf die Erythrozyten-HDMEC-Interaktion in Gegenwart von WAIHA-Plasma

Die Abbildung zeigt die Messergebnisse, gewonnen an mikrovaskulären Endothelzellen bei 20°C. Die Säulen stellen den Mittelwert der Messungen von 5 Einzelspenderplasmen (in der Regel jeweils im Dreifachansatz gemessen) inklusive der Standardabweichung dar. Bei der Interaktion reagierten jeweils 120µl RBC mit einer Plasmapräparation bestehend aus 60µl WAIHA-Plasma und 60µl Normalplasmapool, IVIgG oder IVIgM, je nach Ansatz. Die mit einem * gekennzeichneten Unterschiede der Effekte auf die Interaktion sind statistisch signifikant (hier der Unterschied zwischen Normalplasma und IVIgM).

3.1.3.2 Erythrozyten-DC-Interaktionen

Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse der Erythrozyten-DC-Interaktionen im Vergleich der Substitution der einzelnen Plasmen der Patienten mit Wärmeautoimmunhämolyse mit einem Normalplasmapool, mit IVIgG und mit

IVIgM: Die Bindung zwischen Erythrozyten und dendritischen Zellen wird im Vergleich zu Normalplasma durch die Zugabe von IVIgG statistisch signifikant abgeschwächt (NHP+WAIHA-Plasma versus WAIHA-Plasma+IVIgG: $p=0,046$). Auch durch die Zugabe von IVIgM wird die Bindungsintensität abgeschwächt, wobei diese Minderung aber nicht statistisch signifikant ist (NHP+WAIHA-Plasma versus WAIHA-Plasma+IVIgM: $p=0,345$). IVIgG schwächt die Bindungsintensität am stärksten ab. Der Unterschied im Vergleich zur IVIgM-induzierten Abschwächung ist aber nicht statistisch signifikant (WAIHA-Plasma+IVIgG versus WAIHA-Plasma+IVIgM: $p=0,463$).

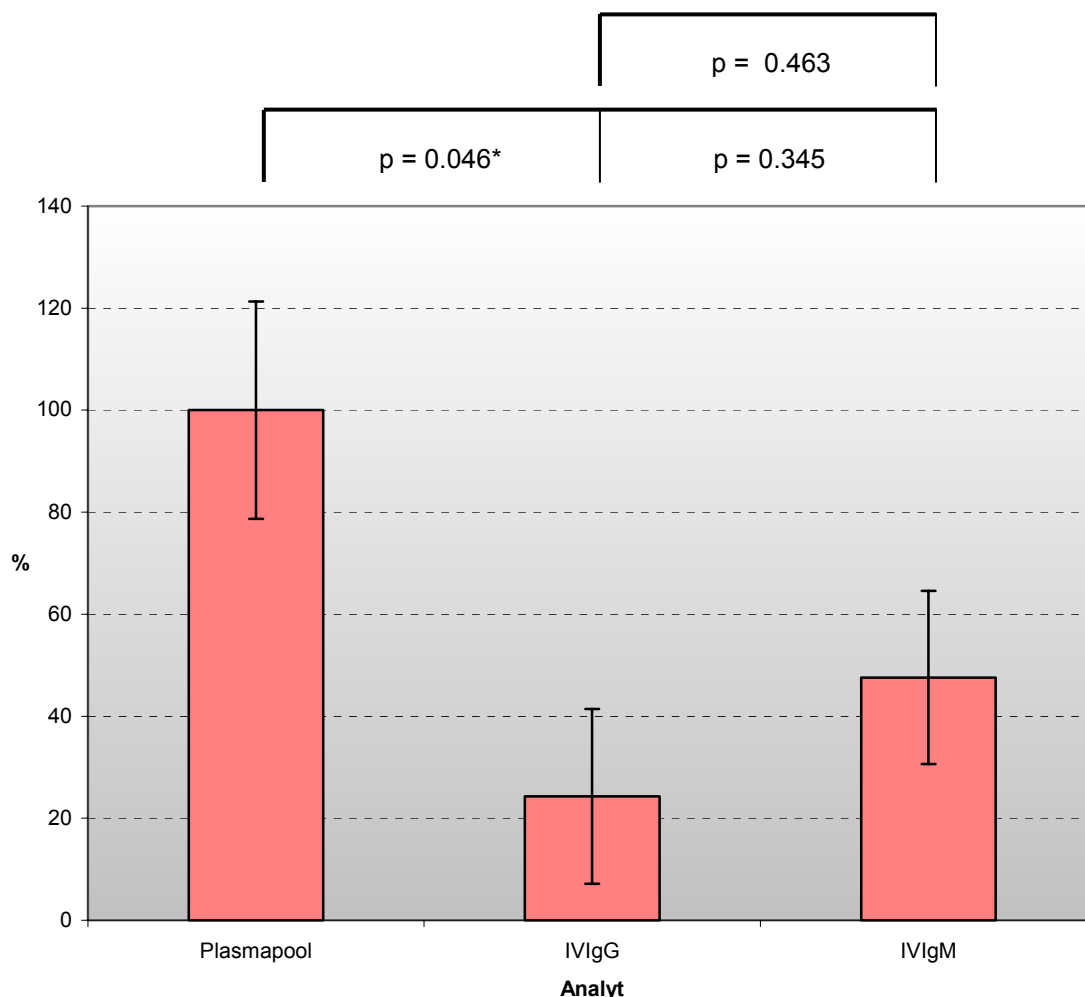


Abbildung 21: Auswirkung von IVIgG und IVIgM auf die Erythrozyten-DC-Interaktion in Gegenwart von WAIHA-Plasma

Die Abbildung zeigt die Messergebnisse, gewonnen an dendritischen Zellen bei 20°C. Die Säulen stellen den Mittelwert der Messungen von 5 Einzelspenderplasmen (in der Regel jeweils

im Dreifachansatz gemessen) inklusive der Standardabweichung dar. Bei der Interaktion reagierten jeweils 120µl RBC mit einer Plasmapräparation bestehend aus 60µl WAIHA-Plasma und 60µl Normalplasmapool, IVIgG oder IVIgM, je nach Ansatz. Die mit einem * gekennzeichneten Unterschiede der Effekte auf die Interaktion sind statistisch signifikant (hier der Unterschied zwischen Normalplasma und IVIgG).

3.1.4 *Einfluss therapeutisch applizierbaren Immunglobulins bei Patienten mit anti-erythrozytären Kälteautoantikörpern auf Erythrozyten-Zell-Interaktionen*

3.1.4.1 *Erythrozyten-HDMEC-Interaktionen*

Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse der Erythrozyten-HDMEC-Interaktionen im Vergleich der Substitution der einzelnen Plasmen der Patienten mit Kälteautoimmunhämolyse mit einem Normalplasmapool, mit IVIgG und mit IVIgM: Die Bindung zwischen den Erythrozyten und den Endothelzellen wird im Vergleich zu Normalplasma durch die Zugabe von IVIgG deutlich abgeschwächt, jedoch zeigt diese Abschwächung lediglich einen Trend, der statistische Signifikanz auf dem Niveau von $p < 0.05$ nicht erreicht (NHP+CAD-Plasma versus CAD-Plasma+IVIgG: $p=0,08$). Durch die Zugabe von IVIgM kommt es zu einer statistisch signifikanten Minderung der Interaktion (NHP+CAD-Plasma versus CAD-Plasma+IVIgM: $p=0,043$).

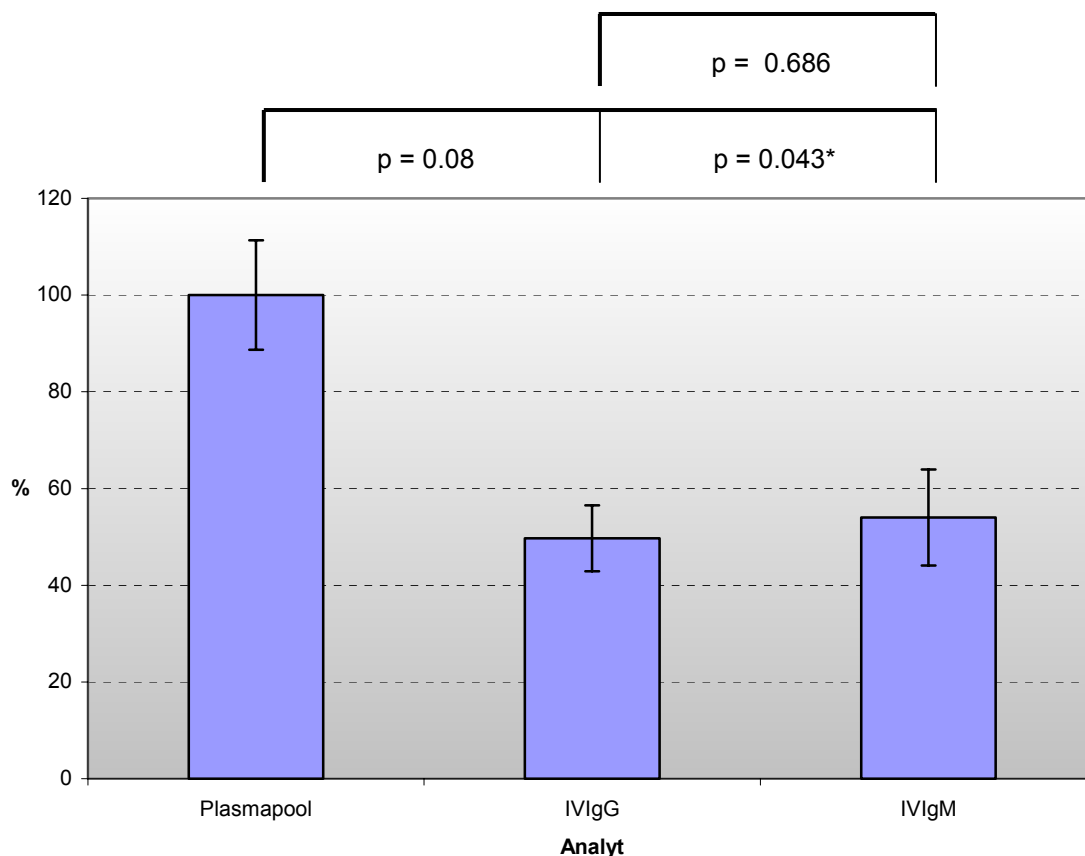


Abbildung 22: Auswirkung von IVIgG und IVIgM auf die Erythrozyten-HDMEC-Interaktion in Gegenwart von CAD-Plasma

Die Abbildung zeigt die Messergebnisse, gewonnen an mikrovaskulären Endothelzellen bei 37°C. Die Säulen stellen den Mittelwert der Messungen von 5 Einzelspenderplasmen (in der Regel jeweils im Dreifachansatz gemessen) inklusive der Standardabweichung dar. Bei der Interaktion reagierten jeweils 120µl RBC mit einer Plasmapräparation bestehend aus 60µl Spenderplasma und 60µl Normalplasmapool, IVIgG oder IVIgM, je nach Ansatz. Die mit einem * gekennzeichneten Unterschiede der Effekte auf die Interaktion sind statistisch signifikant (hier der Unterschied zwischen Normalplasma und IVIgM).

3.1.4.2 Erythrozyten-DC-Interaktionen

Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse der Erythrozyten-DC-Interaktionen im Vergleich der Substitution der einzelnen Plasmen der Patienten mit Kälteautoimmunhämolyse mit einem Normalplasmapool, mit IVIgG und mit IVIgM: Die Bindung zwischen den Erythrozyten und den dendritischen Zellen wird im Vergleich zu Normalplasma durch die Zugabe von sowohl IVIgG als

auch von IVIgM statistisch nicht signifikant abgeschwächt (NHP+CAD-Plasma versus CAD-Plasma+IVIgG: $p=0,5$ und NHP+CAD-Plasma versus CAD-Plasma+IVIgM: $p=0,138$). IVIgM mindert die Bindung am stärksten, dies hat aber keinen statistisch signifikant Unterschied zur IVIgG-induzierten Abschwächung zur Folge (CAD-Plasma+IVIgG versus CAD-Plasma+IVIgM: $p=0,5$).

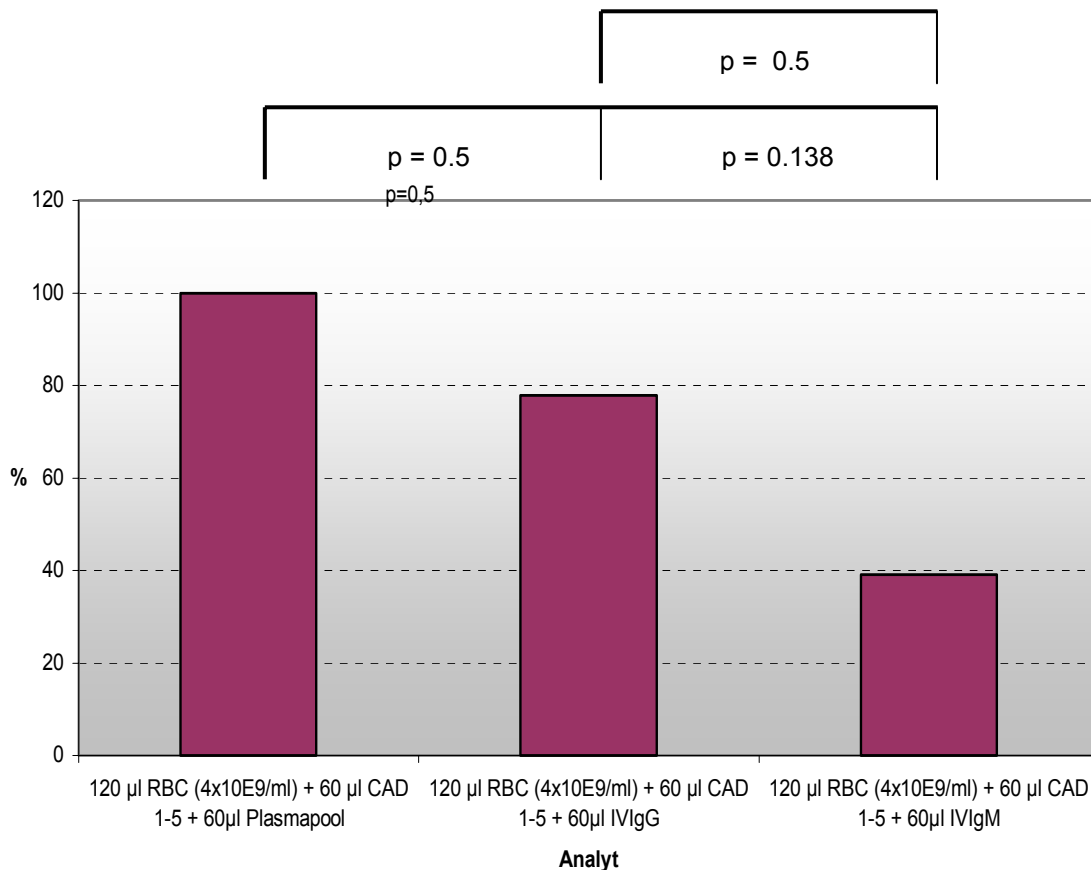


Abbildung 23: Auswirkung von IVIgG und IVIgM auf die Erythrozyten-DC-Interaktion in Gegenwart von CAD-Plasma

Die Abbildung zeigt die Messergebnisse, gewonnen an dendritischen Zellen bei 37°C. Die Säulen stellen den Mittelwert der Messungen von 5 Einzelspenderplasmen (in der Regel jeweils im Dreifachansatz gemessen) inklusive der Standardabweichung dar. Bei der Interaktion reagierten jeweils 120µl RBC mit einer Plasmapräparation bestehend aus 60µl Spenderplasma und 60µl Normalplasmapool, IVIgG oder IVIgM, je nach Ansatz. Die mit einem * gekennzeichneten Unterschiede der Effekte auf die Interaktion sind statistisch signifikant (hier ist keiner der Unterschiede statistisch signifikant).

3.2 Untersuchung der funktionellen Bedeutung der Erythrozyten-Zell-Interaktionen mit der Genchip-Analytik

Zur Untersuchung der Frage, ob der Einfluss von therapeutisch applizierbarem Immunglobulin auf Erythrozyten-Zell-Interaktionen von funktioneller Relevanz für die Zielzellen ist, wurde in „proof-of-principle“-Versuchen das Genexpressionsprofil der Zielzellen nach der Erythrozyten-Zell-Interaktion unter Einfluss therapeutisch applizierbarer Immunglobuline im Vergleich zu Normalplasma untersucht. Als Zielzellen wurden mikrovaskuläre Endothelzellen und Monozyten eingesetzt.

3.2.1 Einfluss therapeutisch applizierbaren Immunglobulins auf das Genexpressionsprofil von Endothelzellen im Kontext der Erythrozyten-Zell-Interaktionen

Zur Analyse des Genexpressionsprofils sind die auf den Array aufgebrachten Gene entsprechend ihrer Funktion in 12 Gruppen summiert worden. Während der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion in Gegenwart von Normalplasma wurde folgende Gene hochreguliert (↑) oder herunterreguliert (↓).

Tabelle 04: Durch Normalplasma regulierte Gene bei der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion

Endothelzellen	Plasma	
Funktionsgruppen	↑	↓
I. Cytokine signalling	TNFRSF6	GM-CSF, IL8_HUMAN, INHBA, VEGC, CCL20
II. Apoptose/ Inflammation	TNFRSF6, AMSH	IAP1, IKBE, BNIP3L
III. Cell cycle	AMSH	
IV. DNA Repair + metabolism		
V. Extracellular matrix	ITGB4, BIGLYCAN, MDC9, NIDOGEN	MMP10, IAP1, PAI1, FN1, MMP1_HUMAN
VI. Stress	TNFRSF6	HSC73, HSPA1A, HSPA6- HSPA7_Human, IKBE, BNIP3L
VII. Acute phase	THBD	SELE
VIII. Complement system		
IX. General signal transduction	TNFRSF6, RASH1_2, VAV2, MDC9, AMSH	MMP10, PLA2G4, MMP1_HUMAN, IKBE
X. Surface marker	TNFRSF6, ITGB4, THBD, MCAM, CD34, BY55	SELE, ICAM1
XI. Protein degradation	MDC9	MMP10, IAP1, MMP1_HUMAN
XII. Transcription factors	FOS_1, HES1, EGR1	IKBE
Ohne Gruppenzuordnung		MAFG_BAD(3654), SOD2 (6216)

Die regulierten Gene stehen in Zuordnung zu ihren Funktionsgruppen. 5-fach regulierte Gene sind gelb unterlegt.

Im Nachfolgenden werden jene Gene gezeigt, die spezifisch in Abhängigkeit von der eingesetzten Plasmapräparation durch IVIgG an Endothelzellen hoch- oder herunterreguliert wurden:

Tabelle 05: Durch IVIgG regulierte Gene bei der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion

Endothelzellen	IVIgG	
Funktionsgruppen	↑	↓
I. Cytokine signalling	IL17, CCL21	IL8_HUMAN, CCL20, GM-CSF, TNFC, IL3RA, VEGF_1, GRO1_HUMAN, INHBA, VEGC, CCL2_HUMAN
II. Apoptose/ Inflammation	CASP9	IAP1, TNFC, IKBE, BNIP3L
III. Cell cycle		
IV. DNA Repair + metabolism		
V. Extracellular matrix	ITGB4, ITGA8, LTBP4, MAGP1, MMP17, SERPINB1	MMP10, PAI1, MMP1_HUMAN, MMP25_1
VI. Stress	CASP9	IAP1, GRO1_HUMAN, IKBE, BNIP3L
VII. Acute phase		SELE
VIII. Complement system		
IX. General signal transduction	GADD153, CASP9, PTP, SHC1, PLCG2, MMP17	MMP10, SOS1, MMP1_HUMAN, IKBE, MMP25_1
X. Surface marker	ITGB4, PECAM1	IL3RA, SELE, ICAM1
XI. Protein degradation	MMP17	MMP10, IAP1, MMP1_HUMAN, MMP25_1
XII. Transcription factors	FOS_1	IKBE
Ohne Gruppenzuordnung	GAPD (2211)	SOD2 (6216)

Die regulierten Gene stehen in Zuordnung zu ihren Funktionsgruppen. 5-fach regulierten Gene sind gelb unterlegt.

In der nachfolgenden Tabelle stehen die Gene, die die spezifisch in Abhängigkeit von der eingesetzten Plasmapräparation durch IVIgM an Endothelzellen hochreguliert oder herunterreguliert wurden:

Tabelle 06: Durch IVIgM regulierte Gene bei der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion

Endothelzellen	IVIgM	
Funktionsgruppen	↑	↓
I. Cytokine signalling		IL8_HUMAN, TNFC, CCL2_HUMAN, CCL20, GM-CSF, IL3RA, GRO1_HUMAN
II. Apoptose/ Inflammation		TNFC, IAP1, BNIP3L
III. Cell cycle	CCND3	
IV. DNA Repair + metabolism		
V. Extracellular matrix		MMP10, PAI1, FN1, MMP1_HUMAN
VI. Stress		HSPA6-HSPA7_HUMAN, IAP1, GRO1_HUMAN, HSPA1A, BNIP3L
VII. Acute phase		SELE
VIII. Complement system		
IX. General signal transduction		MMP10, LYP1, MMP1_HUMAN
X. Surface marker		SELE, IL3RA, ICAM1
XI. Protein degradation		MMP10, IAP1, MMP1_HUMAN
XII. Transcription factors		
Ohne Gruppenzuordnung		SOD2 (6216)

Die regulierten Gene stehen in Zuordnung zu ihren Funktionsgruppen. 5-fach regulierten Gene sind gelb unterlegt.

Zusammenfassend werden bei der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion insgesamt mehr Gene herunterreguliert als hochreguliert. 5-fach regulierte Gene sind ausschließlich bei den herunterregulierten Genen zu finden.

Nachdem in den oben aufgeführten Tabellen ein Überblick über die regulierten Gene an den Endothelzellen gegeben wurde, sollen nun die möglichen Zusammenhänge zwischen Plasma und IVIgG bzw. IVIgM und IVIgG und IVIgM gezeigt werden. Die folgende Tabelle zeigt die Gene der drei Gruppen (Plasma, IVIgG und IVIgM), aufgeteilt nach exprimierten (↑) und reprimierten (↓) Genen, die die Schnittmenge der Expression im Vergleich Plasma / IVIgG, Plasma / IVIgM, und IVIgG / IVIgM bilden.

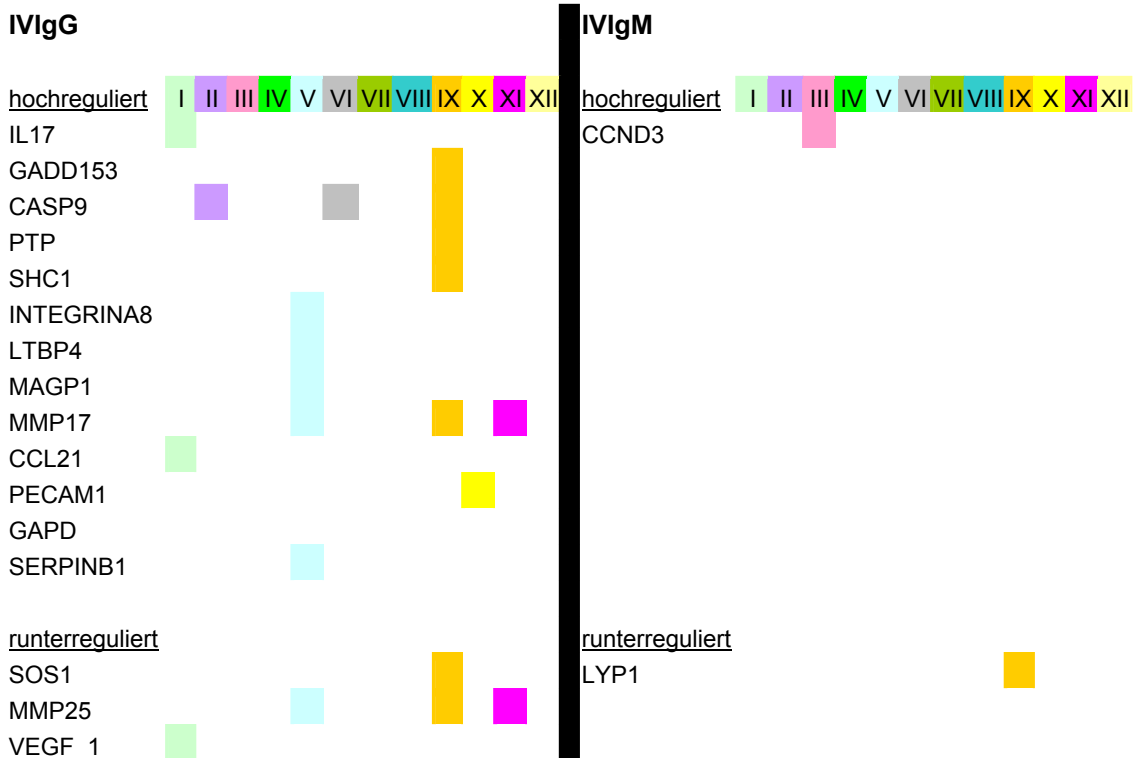
Tabelle 07: Schnittmengen der durch Plasma, IVIgG und IVIgM regulierten Gene an Endothelzellen

Endothelzellen	Plasma/IVIgG		Plasma/IVIgM		IVIgG/IVIgM	
Funktionsgruppen	↑	↓	↑	↓	↑	↓
I. Cytokine signalling		IL8_HUMAN, INHBA, VEGC, CCL20, GM-CSF		IL8_HUMAN, CCL20, GM-CSF		IL8_HUMAN, TNFC, IL3RA, GRO1_HUMAN, CCL2_HUMAN, CCL20, GM-CSF
II. Apoptose/ Inflammation		IAP1, IKBE, BNIP3L		IAP1, BNIP3L		IAP1, TNFC, BNIP3L
III. Cell cycle						
IV. DNA Repair + metabolism						
V. Extracellular matrix	ITGB4	PAI1, MMP10, MMP1_HUMAN		PAI1, FN1, MMP10, MMP1_HUMAN		PAI1, MMP10, MMP1_HUMAN
VI. Stress		IAP1, IKBE, BNIP3L		IAP1, BNIP3L, HSPA1A, HSPA6-HSPA7_HUMAN		IAP1, GRO1_HUMAN, BNIP3L
VII. Acute phase		SELE		SELE		SELE
VIII. Complement system						
IX. General signal transduction		MMP10, MMP1_HUMAN, IKBE		MMP10, MMP1_HUMAN		MMP10, MMP1_HUMAN
X. Surface marker	ITGB4	SELE, ICAM1		SELE, ICAM1		IL3RA, SELE, ICAM1
XI. Protein degradation		IAP1, MMP10, MMP1_HUMAN		IAP1, MMP10, MMP1_HUMAN		IAP1, MMP10, MMP1_HUMAN
XII. Transcription factors	FOS_1	IKBE				
Ohne Gruppenzuordnung		SOD2 (6216)		SO D 2 (6216)		SO D 2 (6216)

Die regulierten Gene stehen in Zuordnung zu ihren Funktionsgruppen. 5-fach regulierten Gene sind gelb unterlegt. Ist das Gen nur durch ein Substrat 5-fach reguliert, so ist die entsprechende Hälfte unterlegt.

Da sich diese Arbeit wesentlich mit der Auswirkung der therapeutisch applizierbaren Immunglobuline IVIgG und IVIgM beschäftigt, sind im Nachfolgenden jene Gene aufgelistet, die in ihrer Regulation spezifisch für die Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion sind:

Tabelle 08: Gene, die an Endothelzellen spezifisch durch IVIgG oder IVIgM reguliert werden.



Über den Farbencode werden die regulierten Gene den folgenden 12 Funktionsgruppen zugeordnet:

- I: cytokine signalling
- II. Apoptosis/Inflammation
- III. Cell cycle
- IV. DNA repair and metabolism
- V. Extracellular matrix (ECM)
- VI. Stress
- VII. acute phase
- VIII. complement system
- IX. general signal transduction
- X. surface marker
- XI. protein degradation
- XII. transcription factors

3.2.2 Einfluss therapeutisch applizierbaren Immunglobulins auf das Genexpressionsprofil von Monozyten im Kontext der Erythrozyten-Zell-Interaktionen

In der folgenden Tabelle werden jene Gene gezeigt, die an Monozyten spezifisch in Abhängigkeit von der eingesetzten Plasmapräparation hochreguliert (↑) oder herunterreguliert (↓) wurden.

Tabelle 09: Durch Plasma regulierte Gene bei der Erythrozyten-Monozyten-Interaktion

Monozyten		Plasma	
Funktionsgruppen		↑	↓
I.	Cytokine signalling	IL3RA, IL4R, IL2RA, TGFB1_1, VEGF_1, CX3CR1, IL6, SOCS3	CCL2_HUMAN, IL2RG, TLR5, AIF1
II.	Apoptose/ Inflammation	BCL2A1, CD14, NFKB3, SOCS3, BNIP3L	TLR5, ALG2
III.	Cell cycle	BTG1, PC3B	
IV.	DNA Repair + metabolism		
V.	Extracellular matrix	COL7A1, SERPINA1_1_HUMAN, MAGP2	MMP9, MMP19, TGFB1
VI.	Stress	BCL2A1, NFKB3, SOCS3, BNIP3L, BTG1, HMOX1, PC3B	
VII.	Acute phase	THBD, SERPINA1_1_HUMAN	CD69
VIII.	Complement system		
IX.	General signal transduction	BCL2A1, EBI2, CX3CR1, NFKB3, SOCS3, NTE, RGS1	MMP9, MMP19, ALG2, CALM2, AIF1, TGFB1
X.	Surface marker	IL3RA, IL4R, THBD, PLAUR, LRP1, MDU1, CD14, IL2RA, CD44_EX3-5_HUMAN	CD52, IL2RG, CD69, CD97, CD33
XI.	Protein degradation		MMP9, MMP19
XII.	Transcription factors	ATF3, ATF4, E4BP4, FKHL1, FOXK2_1, NFKB3, BTG1, PC3B	
	Ohne Gruppenzuordnung	CBP (1638), GAPD (2211), MAFF_BAD (3652), MAFG_BAD (3654), PAFAH1B1 (9713), TKT1 (22882)	FLAP (5458), PAFA (5618), LGALS3 (11917), HLA-DQA_HUMAN (16798)

Die regulierten Gene stehen in Zuordnung zu ihren Funktionsgruppen. 5-fach regulierten Gene sind gelb unterlegt.

In der unten aufgeführten Tabelle stehen die Gene, die spezifisch in Abhängigkeit von der eingesetzten Plasmapräparation durch IVIg an Monozyten hochreguliert oder herunterreguliert wurden:

Tabelle 10: Durch IVIg regulierte Gene bei der Erythrozyten-Monozyten-Interaktion

Monozyten	IVIgG	
Funktionsgruppen	↑	↓
I. Cytokine signalling	TRAIL, TNFC, SOCS3	CCL2_HUMAN , IFNGR1, IL1R2, CCR1, CCL18_HUMAN, CXCL16, AIF1
II. Apoptose/ Inflammation	TRAIL, TNFC, SOCS3, BNIP3L	IL1R2, ALG2, TNFAIP3
III. Cell cycle		
IV. DNA Repair + metabolism		
V. Extracellular matrix		ITGB2, PAI2, TIMP1, TIMP2, MMP9, MMP19, CD164, TGFBI, SERPINB1
VI. Stress	HSPA6-HSPA7_HUMAN, SOCS3, BNIP3L	GAS3, TNFAIP3
VII. Acute phase	SELL	DCIR_HUMAN
VIII. Complement system		C3AR1
IX. General signal transduction	ITK , GPR17, LCK, SOCS3, RGS1	GAS3, C3AR1, PTAFR, CCR1, MMP9, MMP19, ALG2, CALM2, PTPN6_2, AIF1, TGFBI, TNFAIP3
X. Surface marker	CD2 , SELL, IFITM1	IFNGR1, IL1R2, CD63, CD74, ITGB2, ITGB1, PECAM1, FCGR2_HUMAN, CD33, CD164, CD44_EX13-15_HUMAN, CD44_EX11-13_HUMAN, PROCR
XI. Protein degradation		MMP9, MMP19
XII. Transcription factors	JUN, LEF1	
Ohne Gruppenzuordnung	LAP18 (2185)	FLAP (5458), MGST2 (9995)

Die regulierten Gene stehen in Zuordnung zu ihren Funktionsgruppen. 5-fach regulierten Gene sind gelb unterlegt.

In der unten gezeigten Tabelle werden jene Gene aufgeführt, die spezifisch in Abhängigkeit von der eingesetzten Plasmapräparation durch IVIgM an Monozyten hochreguliert oder herunterreguliert wurden:

Tabelle 11: Durch IVIgM regulierte Gene bei der Erythrozyten-Monozyten-Interaktion

Monozyten	IVIgM	
Funktionsgruppen	↑	↓
I. Cytokine signalling	IL1R2, VEGF_1, CX3CR1, SOCS3	AIF1 , TNFRSF5, TNFC, GRO1_HUMAN, CCL2_HUMAN, CCL3-CCL3L1_HUMAN, CXCL7, IL13RA1
II. Apoptose/ Inflammation	IL1R2, RELB, SOCS3	BAX_1, TNFRSF5, TNFC
III. Cell cycle		CCL3-CCL3L1_HUMAN
IV. DNA Repair + metabolism		
V. Extracellular matrix	ITGB8	SYNDECAN2, MMP19, SERPINH1-SERPINH2
VI. Stress	RELB, SOCS3	BAX_1, GRO1_HUMAN, HSPCA, HSP105, HSPA6-HSPA7_HUMAN, SERPINH1-SERPINH2
VII. Acute phase	THBD	CD69, DCIR_HUMAN
VIII. Complement system		
IX. General signal transduction	CX3CR1, RELB, SOCS3, NOS2A	AIF1 , LCK, MMP19, CALM2, PTPN2_1
X. Surface marker	IL1R2, THBD, MDU1	TNFRSF5, CD52, CD69, CD2, CD33, IL13RA1
XI. Protein degradation		MMP19
XII. Transcription factors	FOS_1, JUNB, RELB, YY1	
Ohne Gruppenzuordnung	CBP (1638), GAPD (2211), CTSD (11407), TKT1 (22882)	FLAP (5458), PAFA (5618), MGST2 (9995)

Die regulierten Gene stehen in Zuordnung zu ihren Funktionsgruppen. 5-fach regulierten Gene sind gelb unterlegt.

Zusammenfassend werden bei der Erythrozyten-Monozyten-Interaktion durch die Zugabe von Plasma insgesamt mehr Gene hochreguliert als herunterreguliert. Im Gegensatz dazu werden durch die Zugabe von IVIgG und IVIgM insgesamt mehr Gene herunterreguliert wurden, als hochreguliert.

Nach dem Überblick über die regulierten Gene an den Monozyten (vorherige Tabellen) sollen nun mögliche Zusammenhänge zwischen Plasma und IVIgG bzw. IVIgM und IVIgG und IVIgM aufgezeigt werden. Die Zusammenhänge werden mittels Schnittmengen der drei Gruppen (Plasma, IVIgG und IVIgM), aufgeteilt nach hoch- und herunterregulierten Genen, in der unten folgenden Tabelle dargestellt.

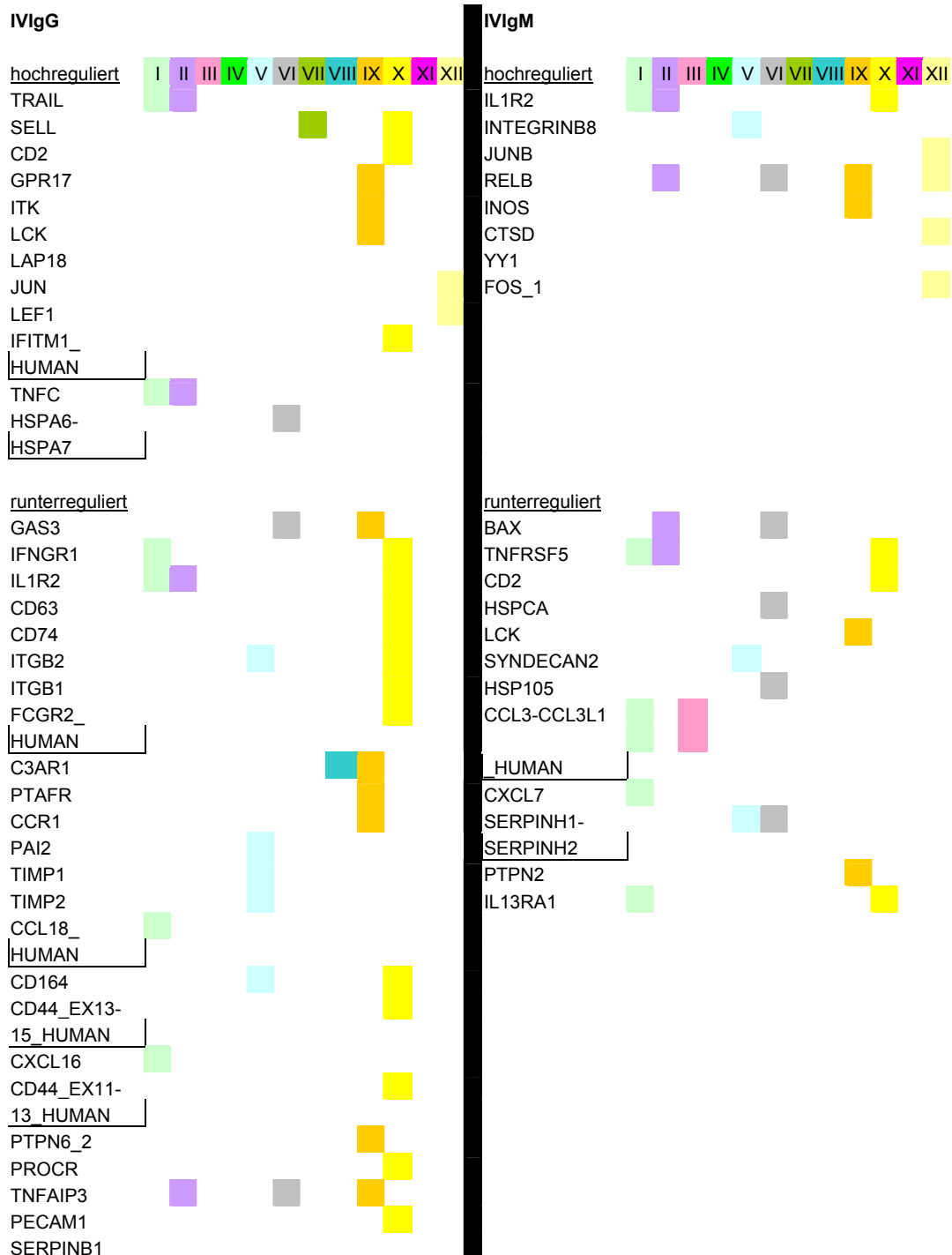
Tabelle 12: Schnittmengen der durch Plasma, IVIgG und IVIgM regulierten Gene an Monozyten

Monozyten	Plasma/IVIgG		Plasma/IVIgM		IVIgG/IVIgM	
	↑	↓	↑	↓	↑	↓
I. Cytokine signalling	SOCS3	CCL2_HUMAN, AIF1	VEGF_1, CX3CR1, SOCS3	CCL2_HUMAN, AIF1	SOCS3	CCL2_HUMAN, AIF1
II. Apoptose/ Inflammation	SOCS3, BNIP3L	ALG2	SOCS3		SOCS3	
III. Cell cycle						
IV. DNA Repair + metabolism						
V. Extracellular matrix		MMP9, MMP19, TGFB1		MMP19,		MMP19
VI. Stress	SOCS3, BNIP3L		SOCS3		SOCS3	
VII. Acute phase			THBD	CD69,		DCIR_HUMAN
VIII. Complement system						
IX. General signal transduction	SOCS3, RGS1	MMP9, MMP19, ALG2, CALM2, AIF1, TGFB1	CX3CR1, SOCS3	MMP19, CALM2, AIF1	SOCS3	MMP19, CALM2, AIF1
X. Surface marker		CD33	THBD, MDU1	CD52, CD69, CD33,		CD33
XI. Protein degradation		MMP9, MMP19		MMP19,		MMP19
XII. Transcription factors						
Ohne Gruppenzuordnung		FLAP (5458)	CBP (1638), GAPD (2211)	FLAP (5458), PAFA (5618)		FLAP (5458), MGST2 (9995)

Die regulierten Gene stehen in Zuordnung zu ihren Funktionsgruppen. 5-fach regulierten Gene sind gelb unterlegt. Ist das Gen nur durch ein Substrat 5-fach reguliert, so ist die entsprechende Hälfte unterlegt.

Um auch bei den Monozyten speziell auf die Auswirkung der therapeutisch applizierbaren Immunglobuline IVIgG und IVIgM einzugehen sind in der folgendem Tabelle auch hier die spezifischen Gene aufgelistet.

Tabelle 13: Gene, die an Monozyten spezifisch durch IVIgG oder IVIgM reguliert werden



Über den Farbencode werden die regulierten Gene den 12 Funktionsgruppen zugeordnet.

3.2.3 Vergleichende Analyse des Einflusses von IVIgG und IVIgM auf die während der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktionen regulierten Endothelzell-Gene

In einem weiteren Schritt wurde zur Einschätzung der immunologischen Bedeutung des Einflusses von IVIgG und IVIgM auf die während der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion in Gegenwart der Plasmapräparationen regulierten Endothelzell-Gene untersucht, welche 20 Gene mit höchster Signifikanz durch IVIgG und IVIgM unterschiedlich reguliert werden. Tabelle 14 nennt die 20 am signifikantesten in Gegenwart der Plasmapräparationen regulierten Gene, und Tabelle 15 ordnet sie den verschiedenen immunologischen Funktionsgruppen zu.

Tabelle 14: 20 am signifikantesten durch IVIgG und IVIgM unterschiedlich regulierte Gene in Endothelzellen

siggenes 56_vs_57	profile_2	Gene	Genename	UniGene	Exp_56	Exp_57
401f		2326	INTEGRINA8	Hs.171025	2,34	0,89
402f		2559	MMP17	Hs.159581	3,69	1,27
403f		3593	HSPA6-HSPA	Hs.3268	1,71	0,18
404s		12160	YY1	Hs.388927	0,57	1,43
405f		1677	PTP	Hs.387553	2,41	0,93
406f		4696	ENOS	Hs.446303	1,97	0,84
407f		59	BAX	Hs.159428	1,51	0,7
408f		2195	PLCG2	Hs.512298	2,36	0,89
409s		324	IFNGR1	Hs.180866	0,86	1,83
410s		2183	VEGC	Hs.79141	0,5	1,2
411s		3544	ATF3	Hs.460	0,76	1,66
412s		6238	YWHAZ	Hs.386834	0,72	1,3
413f		181	RRAS	Hs.9651	1,91	1,01
414f		2477	MAGP1	Hs.389137	2,3	1,3
415s		4027	CISH6	Hs.169836	0,92	1,55
416f		3582	HSPA1A	Hs.274402	0,99	0,44
417f		2443	DDR1	Hs.423573	1,86	1,08
418f		17692	SERPINB1	Hs.381167	2,3	0,77
419f		2471	LTBP4	Hs.85087	2,08	1,25
420f		4489	CCL21	Hs.57907	2,26	1,3

Verglichen wird der Einfluss von IVIgG (Exp.56) und IVIgM (Exp.57) auf die Genexpression der Endothelzellen. Die Tabelle zeigt die 20 Gene, bei denen der Einfluss der beiden Plasmapräparationen die signifikantesten Unterschiede in der Genexpression bewirkt. In der Spalte profile_2 wird gezeigt durch welche Plasmapräparation das Gen stärker hochreguliert

wird. Dabei weist ein f daraufhin, dass IVIgG die stärkere Regulation bewirkt und ein s weist auf die stärkere Regulation durch IVIgM hin.

Tabelle 15: Summierung der durch IVIgG und IVIgM am signifikantesten unterschiedlich regulierten Gene auf die immunologischen Funktionsgruppen

		EC: IgG vs IgM	
		Summe	steigend/fallend
1.	general signal transduction	8	2s; 6f
2.	Extracellular matrix (ECM)	6	6f
3.	cytokine signalling	4	3s; 1f
4.	Apoptosis/Inflammation	4	2s; 2f
5.	Stress	4	4f
6.	surface marker	2	1s; 1f
7.	transcription factors	2	2s
8.	protein degradation	1	1f
9.	Cell cycle	0	
10.	DNA repair and metabolism	0	
11.	acute phase	0	
12.	complement system	0	

Es wird die Anzahl der regulierten Gene der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion veranschaulicht. Die Reihenfolge der Funktionsgruppen ist absteigend nach Häufigkeit geordnet.

s = steigend bzw. stärker durch IVIgM reguliert

f = fallend bzw. stärker durch IVIgG reguliert

3.2.4 Vergleichende Analyse des Einflusses von IVIgG und IVIgM auf die während der Erythrozyten-Monozyten-Interaktionen regulierten Monozyten-Gene

Zur Einschätzung der immunologischen Bedeutung des Einflusses von IVIgG und IVIgM auf die während der Erythrozyten-Monozyten-Interaktion in Gegenwart der Plasmapräparationen regulierten Monozyten-Gene wurde untersucht, welche 20 Gene mit höchster Signifikanz durch IVIgG und IVIgM unterschiedlich reguliert werden. Tabelle 16 nennt die 20 am signifikantesten in Gegenwart der Plasmapräparationen regulierten Gene, und Tabelle 17 ordnet sie den verschiedenen immunologischen Funktionsgruppen zu.

Tabelle 16: 20 am signifikantesten unterschiedlich regulierte Gene durch IVIgG und IVIgM in Monozyten

siggenes 47 vs 48	profile 2	Gene	Genename	UniGene	Exp 47	Exp 48
101	f	249	TNFC	Hs.376208	2,2	0,31
102	f	1935	LCK	Hs.1765	2,44	0,5
103	f	3593	HSPA6-HSPA	Hs.3268	2,08	0,31
104	s	3644	JUNB	Hs.400124	1,3	3,59
105	s	22882	TKT1	Hs.89643	0,88	2,47
106	f	3582	HSPA1A	Hs.274402	1,57	0,53
107	s	461	MDU1	Hs.79748	1,29	2,83
108	s	328	IL1R2	Hs.25333	0,36	2
109	f	3535	JUN	Hs.78465	2,32	1,09
110	s	87	CDKN1A	Hs.370771	0,53	1,42
111	f	7529	BNIP3L	Hs.132955	3,26	1,59
112	f	405	SELL	Hs.82848	2	0,6
113	f	3580	HSP105	Hs.36927	1,21	0,39
114	f	1026	GPR17	Hs.46453	2,6	1,15
115	s	11750	CXCL16	Hs.82407	0,45	1,31
116	f	3578	HSC73	Hs.180414	1,53	0,55
117	f	4715	SERPINH1-S	Hs.241579	1,49	0,49
118	s	664	C3AR1	Hs.155935	0,34	1,11
119	f	105	DDR3	Hs.299558	1,7	0,78
120	s	12160	YY1	Hs.388927	1	2,14

Verglichen wird der Einfluss von IVIgG (Exp.47) und IVIgM (Exp.48) auf die Genexpression der Monozyten. Die Tabelle zeigt die 20 Gene, bei denen der Einfluss der beiden Plasmapräparationen die signifikantesten Unterschiede in der Genexpression bewirkt. Spalte "profile_2" veranschaulicht, durch welche Plasmapräparation das Gen stärker hochreguliert wird. Dabei zeigt ein f, dass IVIgG die stärkere Regulation bewirkt und ein s die stärkere Regulation durch IVIgM.

Tabelle 17: Summierung der durch IVIgG und IVIgM am signifikantesten unterschiedlich regulierten Gene auf die immunologischen Funktionsgruppen

		Monos: IgG vs IgM	
		Summe	steigend/fallend
1.	Stress	7	7f
2.	cytokine signalling	4	3s; 1f
3.	Apoptosis/Inflammation	4	1s; 3f
4.	general signal transduction	4	1s; 3f
5.	surface marker	3	2s; 1f
6.	transcription factors	3	2s; 1f
7.	Cell cycle	1	1s
8.	Extracellular matrix (ECM)	1	1f
9.	acute phase	1	1f
10.	complement system	1	1s
11.	DNA repair and metabolism	0	
12.	protein degradation	0	

Es wird die Anzahl der regulierten Gene der Erythrozyten-Monozyten-Interaktion dargestellt. Die Reihenfolge der Funktionsgruppen ist absteigend nach Häufigkeit geordnet.

s = steigend bzw. stärker durch IVIgM reguliert

f = fallend bzw. stärker durch IVIgG reguliert

3.2.5 Analyse des Einflusses von IVIgG und IVIgM auf die regulierten Gene in mikrovaskulären Endothelzellen und Monozyten im Hinblick auf die verschiedenen immunologischen Funktionsgruppen

Tabelle 18 gibt eine Übersicht über die durch IVIgG - im Vergleich zu IVIgM regulierten Gene in Endothelzellen und Monozyten differenziert nach den verschiedenen immunologischen Funktionsgruppen.

Tabelle 18: 20, Gene die im Vergleich IVIgG vs. IVIgM die signifikantesten Unterschiede bezüglich der Genregulation aufweisen, aufgeteilt nach immunologischer Funktion

EC				Monos			
1. Stress				Stress			
Genename	UniGene	Exp_56	Exp_57	Genename	UniGene	Exp_47	Exp_48
HSPA6-HSPA	Hs.3268	1,71	0,18	HSPA6-HSPA	Hs.3268	2,08	0,31
BAX	Hs.159428	1,51	0,7	HSPA1A	Hs.274402	1,57	0,53
RRAS	Hs.9651	1,91	1,01	BNIP3L	Hs.132955	3,26	1,59
HSPA1A	Hs.274402	0,99	0,44	HSP105	Hs.36927	1,21	0,39
				HSC73	Hs.180414	1,53	0,55
				SERPINH1-S	Hs.241579	1,49	0,49
				DDR3	Hs.299558	1,7	0,78
2. cytokine signalling				cytokine signalling			
Genename	UniGene	Exp_56	Exp_57	Genename	UniGene	Exp_47	Exp_48
IFNGR1	Hs.180866	0,86	1,83	TNFC	Hs.376208	2,2	0,31
VEGC	Hs.79141	0,5	1,2	IL1R2	Hs.25333	0,36	2
CISH6	Hs.169836	0,92	1,55	CXCL16	Hs.82407	0,45	1,31
CCL21	Hs.57907	2,26	1,3	DDR3	Hs.299558	1,7	0,78
3. Apoptosis/Inflammation				Apoptosis/Inflammation			
Genename	UniGene	Exp_56	Exp_57	Genename	UniGene	Exp_47	Exp_48
BAX	Hs.159428	1,51	0,7	TNFC	Hs.376208	2,2	0,31
YWHAZ	Hs.386834	0,72	1,3	IL1R2	Hs.25333	0,36	2
RRAS	Hs.9651	1,91	1,01	BNIP3L	Hs.132955	3,26	1,59
CISH6	Hs.169836	0,92	1,55	DDR3	Hs.299558	1,7	0,78
4. general signal transduction				general signal transduction			
Genename	UniGene	Exp_56	Exp_57	Genename	UniGene	Exp_47	Exp_48
MMP17	Hs.159581	3,69	1,27	LCK	Hs.1765	2,44	0,5
PTP	Hs.387553	2,41	0,93	GPR17	Hs.46453	2,6	1,15
ENOS	Hs.446303	1,97	0,84	C3AR1	Hs.155935	0,34	1,11
PLCG2	Hs.512298	2,36	0,89	DDR3	Hs.299558	1,7	0,78
YWHAZ	Hs.386834	0,72	1,3				
RRAS	Hs.9651	1,91	1,01				
CISH6	Hs.169836	0,92	1,55				
DDR1	Hs.423573	1,86	1,08				
5. surface marker				surface marker			
Genename	UniGene	Exp_56	Exp_57	Genename	UniGene	Exp_47	Exp_48
IFNGR1	Hs.180866	0,86	1,83	MDU1	Hs.79748	1,29	2,83
DDR1	Hs.423573	1,86	1,08	IL1R2	Hs.25333	0,36	2
				SELL	Hs.82848	2	0,6
6. transcription factors				transcription factors			
Genename	UniGene	Exp_56	Exp_57	Genename	UniGene	Exp_47	Exp_48
YY1	Hs.388927	0,57	1,43	JUNB	Hs.400124	1,3	3,59
ATF3	Hs.460	0,76	1,66	JUN	Hs.78465	2,32	1,09
7. Extracellular matrix (ECM)				Extracellular matrix (ECM)			
Genename	UniGene	Exp_56	Exp_57	Genename	UniGene	Exp_47	Exp_48
INTEGRINA8	Hs.171025	2,34	0,89	SERPINH1-S	Hs.241579	1,49	0,49
MMP17	Hs.159581	3,69	1,27				
MAGP1	Hs.389137	2,3	1,3				
DDR1	Hs.423573	1,86	1,08				
SERPINB1	Hs.381167	2,3	0,77				
LTBP4	Hs.85087	2,08	1,25				
8. Cell cycle				Cell cycle			
				Genename	UniGene	Exp_47	Exp_48
				CDKN1A	Hs.370771	0,53	1,42
9. acute phase				acute phase			
				Genename	UniGene	Exp_47	Exp_48
				SELL	Hs.82848	2	0,6
10. complement system				complement system			
				Genename	UniGene	Exp_47	Exp_48
				C3AR1	Hs.155935	0,34	1,11
11. protein degradation				protein degradation			
Genename	UniGene	Exp_56	Exp_57				
MMP17	Hs.159581	3,69	1,27				

Dargestellt werden die regulierte Gene in Endothelzellen und Monozyten während der Interaktion mit Erythrozyten aufgeteilt nach den verschiedenen immunologischen Funktionsgruppen. Durch IVIgG stärker regulierte Gene sind orange markiert, durch IVIgM stärker regulierte Genen sind rot markiert.

In der immunologischen Funktionsgruppe "DNA repair and metabolism" war kein reguliertes Gen der 20 Gene, welches mit höchster Signifikanz durch IVIgG und IVIgM unterschiedlich reguliert wurden, vertreten.

4 Diskussion

4.1 Klinisch-immunologischer Hintergrund und Entwicklung der Fragestellung

Die Substitution allogener Blutkomponenten ist in der modernen Medizin derzeit unverzichtbarer Bestandteil verschiedener therapeutischer Strategien. Das Erythrozytenkonzentrat ist dabei die am häufigsten transfundierte Blutkomponente. Das Verständnis der Pathophysiologie, sowohl der Alloimmunantwort als auch der Autoimmunantwort gegen Erythrozytenantigene, ist von wesentlicher Bedeutung für die Minimierung der immunologischen Risiken der Hämotherapie: Eine Sensibilisierung gegen Erythrozytenantigene mit Bildung von Alloantikörpern der Isotypen IgM und IgG ist bei 30% langfristig Erythrozyten-substitutionspflichtiger Patienten zu beobachten und birgt für weitere Transfusionen und für Schwangerschaften Risiken bis hin zu tödlichen Transfusionszwischenfällen und zum intrauterinen Fruchttod. Anti-erythrozytäre Autoimmunerkrankungen wie die IgM-vermittelte Kälteautoimmunhämolyse oder die IgG-vermittelte Wärmeautoimmunhämolyse führen bei der transfusionsmedizinischen Versorgung vor allem hämatologisch-onkologischer Patienten häufig zu Komplikationen der Hämotherapie. Die Präsentation erythrozytärer Allo- oder Autoantigene ist in der Literatur nicht im Detail gesondert untersucht worden. Man nimmt derzeit an, dass die üblichen Antigenpräsentationsmechanismen auch im Fall der Erythrozytenantigene sowohl bei der anti-erythrozytären Alloimmunantwort im Rahmen von Transfusionen als auch bei der anti-erythrozytären Autoimmunantwort zum Tragen kommen.

Erythrozyten unterliegen der Besonderheit, bereits in ihrem physiologischen Milieu - dem peripheren Blut - in Interaktion mit Zellen zu stehen, die grundsätzlich oder unter besonderen induzierenden Bedingungen wie der Entzündung zur Antigenpräsentation befähigt sind. Die klinisch-immunologische Relevanz von Erythrozyten-Zell-Interaktionen in der peripheren Zirkulation im Hinblick auf die Präsentation erythrozytärer Allo- oder Autoantigene ist bisher in der Literatur ebenso wenig thematisiert worden wie die Beeinflussung von Erythrozyten-Zell-Interaktionen in der peripheren Zirkulation durch therapeutisch applizierbare Immunglobuline der Isotypen IgG und IgM. Das Verständnis der klinisch-immunologischen Relevanz von Erythrozyten-Zell-Interaktionen in der peripheren Zirkulation im Hinblick auf die Präsentation erythrozytärer Antigene und ihre Beeinflussung durch therapeutisch applizierbares IVIgG und IVIgM könnte jedoch für das Verständnis der Pathophysiologie von Allo- und Autoimmunisierungsprozessen gegen Erythrozytenantigene und deren Prophylaxe von wesentlicher Bedeutung sein, zumal der Einsatz hochreinen humanen, gepoolten Immunglobulins mit dem Zweck der Immunmodulation bereits für eine Vielzahl von Erkrankungen in der modernen Medizin Stand von Wissenschaft und Technik geworden ist [33].

Die vorliegende Arbeit nähert sich dem Thema der Modifikation von Erythrozyten-Zell-Interaktionen durch therapeutisch applizierbare Immunglobuline der Isotypen IgG und IgM in einem ersten Schritt. Sie beschäftigt sich mit der Frage,

- (1) ob die Interaktion von Erythrozyten mit für die Antigenpräsentation potentiell relevanten Zellen des peripheren Blutes bei Patienten mit der IgM-vermittelten Kälteautoimmunhämolyse und bei Patienten mit der IgG-vermittelten Wärmeautoimmunhämolyse durch therapeutisch applizierbares hochgereinigtes gepooltes IgM oder IgG beeinflussbar ist, und
- (2) ob die Erythrozyten-Zell-Interaktion in Gegenwart von therapeutisch applizierbaren Immunglobulinen der Isotypen IgG und IgM im Vergleich zur Erythrozyten-Zell-Interaktion in Gegenwart von Normalplasma zu charakteristischen Veränderungen des Genexpressionsprofils, der mit den

Erythrozyten interagierenden, prinzipiell zur Antigenpräsentation befähigten Zellen, führt.

Es war Voraussetzung für die Durchführung der Arbeit als erstes ein experimentelles System zuverlässig zu etablieren und zu validieren, das es erlaubt, den funktionellen Impact von Normalplasma und von Allo- und Autoantikörperhaltigem Plasma auf die Erythrozyten-Zell-Interaktion und auf das Genexpressionsprofil der mit den Erythrozyten interagierenden, prinzipiell zur Antigenpräsentation befähigten Zellen in Abhängigkeit von dieser Interaktion zu untersuchen. Der für diese Arbeit gewählte methodische Ansatz kombiniert die biomolekulare Interaktionsanalyse und die Genexpressionsanalyse mit cDNA-Chips. Die biomolekulare Interaktionsanalyse erlaubt die markierungsfreie und zeitaufgelöste Messung der Bindung von Biomolekülen. Einer der beiden Interaktionspartner wird an eine geeignete Oberfläche gekoppelt, der andere befindet sich in Lösung. Seine Bindung an den immobilisierten Reaktionspartner wird online verfolgt. Zur Untersuchung von Zell-Zell-Interaktionen wurde das offene Küvettensystem eines IAsys[®]-single-well-Instrumentes eingesetzt. Potentiell zur Antigenpräsentation befähigte Zellen wurden an Carboxylat- oder Aminosilanoberflächen immobilisiert. Ligand sind die Erythrozyten. Die Interaktion fand in Gegenwart von definierten verschiedenen Plasmapräparationen statt. Die Genexpressionsanalyse wurde mit cDNA chips der Firma Memorec durchgeführt: Die Erythrozyten-Zell-Interaktion fand in Gegenwart der verschiedenen Plasmapräparationen statt. Es erfolgte die RNA Präparation der Zielzellen, die reverse Transkription der RNA, die Markierung der cDNA mit Fluoreszenzfarbstoffen, die Hybridisierung der Microarrays, das Scannen der Arrays und die PC-gestützte Analyse.

Neben den sogenannten professionellen antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zellen, Monozyten / Makrophagen, B Lymphozyten) könnten zwei weitere Zelltypen bei der Induktion anti-erythrozytärer Immunantworten eine

Rolle spielen, die bisher im Kontext der Frage der Induktion anti-erythrozytärer Antikörperantworten kaum Beachtung finden:

- Dendritische Zellen kommen nicht nur in der Epidermis als klassische Langerhans-Zellen und in den peripheren lymphatischen Geweben vor, sondern in einer Häufigkeit von anteilig 0,1-1,0% der zirkulierenden PBMCs auch im peripheren Blut [21]. DC im peripheren Blut interagieren Selektin-vermittelt mit Gefäßendothel und können so bei Bedarf in periphere Gewebe auswandern. Ihre physiologische Rolle im peripheren Blut ist derzeit jedoch noch unklar [44]. Die direkte Isolierung dendritischer Zellen aus peripherem Blut ist seit kurzem technisch möglich [44]. Dendritische Zellen im peripheren Blut könnten als direkt am „Ort des Geschehens“ verfügbare antigenpräsentierende Zellen für Erythrozyten-Antigene eine wesentliche pathophysiologische Rolle bei der Entstehung der anti-erythrozytären Immunisierung spielen. Für eine Subpopulation dendritischer Zellen im peripheren Blut wurde kürzlich die Fähigkeit zur Phagozytose opsonisierter Schaf-Erythrozyten beschrieben [49]. Ob dendritische Zellen des peripheren Blutes eine Rolle beim Pathomechanismus der anti-erythrozytären Immunisierung im Humansystem spielen, ist vor dem Hintergrund der existierenden Literatur eine berechnigte Frage, die derzeit noch in keiner Weise experimentell angegangen worden ist.
- In den letzten Jahren ist die Fähigkeit von Endothelzellen zur Antigenpräsentation zunehmend evident geworden: Arbeiten der letzten Jahre haben gezeigt, dass vaskuläre Endothelzellen opsonisierte Partikel via Fcγ-Rezeptor oder Complement-Rezeptor vermittelte Mechanismen internalisieren können [17]. Was geschieht mit diesen in die Endothelzelle internalisierten Partikeln? Vaskuläre Endothelzellen haben direkten Kontakt zu den Zellen des peripheren Blutes, unter anderem zu T-Lymphozyten. Sowohl vaskuläre Endothelzellen als auch T-Lymphozyten weisen Zelloberflächenrezeptoren auf, die die Endothelzell-T-Zell-Interaktion ermöglichen. Arbeiten der letzten drei-vier Jahre zeigen, dass Endothelzellen in der Tat in vivo als Antigen-

präsentierende Zellen fungieren können, und dass Antigenpräsentation via Endothelzelle zumindest im transgenen Mausmodell eine Rolle bei der Transplantatabstoßung spielen kann [45]. In der Zirkulation kommt es, vor allem im Bereich der kleinen Gefäße in der Mikrozirkulation, unter physiologischen Bedingungen zu engen Interaktionen zwischen Erythrozyten und Endothelzellen. Es stellt sich die Frage, ob diese Interaktion - besonders im Fall der IgG-Beladung von Erythrozyten - zur Präsentation von Erythrozytenantigenen beitragen kann. Diese Frage ist bisher in der Literatur noch nicht thematisiert worden.

Auf der Basis dieser Überlegungen wurden für die biomolekulare Interaktionsanalyse als Zielzellen der Plasma-abhängigen Erythrozyteninteraktion mikrovaskuläre Endothelzellen und dendritische Zellen des peripheren Blutes gewählt. Für die Genexpressionsanalysen wurden als Zielzellen neben mikrovaskulären Endothelzellen Monozyten des peripheren Blutes als „klassische“ antigenpräsentierende Zellen gewählt.

4.2 Ist die Interaktion von Erythrozyten mit für die Antigenpräsentation potentiell relevanten Zellen des peripheren Blutes bei Patienten mit der IgM-vermittelten Kälteautoimmunhämolyse und bei Patienten mit der IgG-vermittelten Wärmeautoimmunhämolyse durch therapeutisch applizierbares hochgereinigtes gepooltes IgM (IVIgM) oder IgG (IVIgG) beeinflussbar?

Die im Rahmen der vorgelegten Arbeit erhobenen Daten lassen sich wie folgt kondensieren:

Der Zusatz von IVIgG oder IVIgM zu **Normalplasma** beeinflusst die Interaktion von Erythrozyten mit mikrovaskulären Endothelzellen nicht signifikant, während der Zusatz von IVIgG, aber nicht von IVIgM zu Normalplasma die Interaktion von Erythrozyten mit dendritischen Zellen des peripheren Blutes statistisch signifikant supprimiert. Der Zusatz von IVIgG zu Plasma von Patienten mit **IgG-vermittelter Wärmeautoimmunhämolyse** beeinflusst die Interaktion von

Erythrozyten mit mikrovaskulären Endothelzellen nicht signifikant, supprimiert aber statistisch signifikant die Interaktion von Erythrozyten mit dendritischen Zellen des peripheren Blutes. Der Zusatz von IVIgM zu Plasma von Patienten mit IgG-vermittelter Wärmeautoimmunhämolyse supprimiert die Interaktion der Erythrozyten mit mikrovaskulären Endothelzellen statistisch signifikant, während der Zusatz von IVIgM zu Plasma von Patienten mit IgG-vermittelter Wärmeautoimmunhämolyse die Interaktion der Erythrozyten mit dendritischen Zellen des peripheren Blutes nicht signifikant beeinflusst. Der Zusatz von IVIgG zu Plasma von Patienten mit **IgM-vermittelter Kälteautoimmunhämolyse** ändert sowohl die Interaktion von Erythrozyten mit mikrovaskulären Endothelzellen als auch mit dendritischen Zellen des peripheren Blutes nicht signifikant im Vergleich zu einem Normalplasmapool. Der Zusatz von IVIgM zu Plasma von Patienten mit IgM-vermittelter **Kälteautoimmunhämolyse** supprimiert statistisch signifikant die Interaktion von Erythrozyten mit mikrovaskulären Endothelzellen, nicht aber mit dendritischen Zellen des peripheren Blutes.

Zusammenfassend ist die Interaktion von Erythrozyten mit für die Antigenpräsentation potentiell relevanten Zellen des peripheren Blutes bei Patienten mit der IgM-vermittelten Kälteautoimmunhämolyse und bei Patienten mit der IgG-vermittelten Wärmeautoimmunhämolyse durch therapeutisch applizierbares hochgereinigtes gepooltes IgM oder IgG somit prinzipiell beeinflussbar: **IVIgG** supprimiert - im Vergleich zu Normalplasma - die Interaktion von Erythrozyten mit dendritischen Zellen des peripheren Blutes bei gesunden Probanden und bei Patienten mit WAIHA. Bei Patienten mit CAD ist der supprimierende Effekt von IVIgG auf die Interaktion von Erythrozyten mit dendritischen Zellen des peripheren Blutes weitgehend aufgehoben. **IVIgM** supprimiert - im Vergleich zu Normalplasma - die Interaktion von Erythrozyten mit mikrovaskulären Endothelzellen bei Patienten mit IgG-vermittelter WAIHA und die Interaktion von Erythrozyten mit mikrovaskulären Endothelzellen bei Patienten mit IgM-vermittelter Kälteautoimmunhämolyse.

4.3 Führt die Erythrozyten-Zell-Interaktion in Gegenwart von therapeutisch applizierbaren Immunglobulinen der Isotypen IgG und IgM im Vergleich zur Erythrozyten-Zell-Interaktion in Gegenwart von Normalplasma zu charakteristischen Veränderungen des Genexpressionsprofils der mit den Erythrozyten interagierenden, prinzipiell zur Antigenpräsentation befähigten Zellen?

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Daten zeigen, dass die Erythrozyten-Zell-Interaktion in Gegenwart von therapeutisch applizierbaren Immunglobulinen der Isotypen IgG und IgM im Vergleich zur Erythrozyten-Zell-Interaktion in Gegenwart von Normalplasma zu charakteristischen Veränderungen des Genexpressionsprofils der mit den Erythrozyten interagierenden Zellen führt. Der in dieser Arbeit etablierte experimentelle Ansatz erlaubt zudem prinzipiell die Identifizierung von Markergenen, die für Erythrozyten-Zell-Interaktion unter den verschiedenen Bedingungen charakteristisch ist: Ein wesentliches Ergebnis der Analyse der 20 Gene, die mit höchster Signifikanz durch IVIgG und IVIgM reguliert werden, zeigt, dass in den untersuchten Zielzellen, mikrovaskulären Endothelzellen und Monozyten, durch den Einfluss von therapeutisch applizierbarem IVIgG vermehrt Gene exprimiert werden, die die immunologische Balance in Richtung einer pro-inflammatorischen und pro-apoptotischen Antwort verschieben können, während therapeutisch applizierbares IVIgM in Endothelzellen keine Effekte zeigt, die die pro-/anti-inflammatorische Balance beeinflussen, und in Monozyten die Immunantwort eher in Richtung einer anti-inflammatorischen Response verschiebt. Diese Daten bedürfen der weiteren Verifizierung in weiteren Versuchen und können erheblichen Einfluss gewinnen auf das Verständnis der seit einigen Jahren evident werdenden besonderen immunregulierenden Rolle natürlicher (Auto-)Antikörper des Isotyps IgM, die in vivo im Tiermodell vor experimentell induzierten IgG-vermittelten Autoimmunerkrankungen effizienter zu schützen vermögen als IVIgG [26].

4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Die wesentlichen Schlussfolgerungen der hier vorgelegten Daten lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Für die Präsentation von Erythrozytenantigenen grundsätzlich relevante Erythrozyten-Zell-Interaktionen werden spezifisch durch die in die anti-erythrozytäre Immunantwort involvierten Antikörper-Isotypen IgM und IgG beeinflusst.
- Die hier gezeigten in vitro Daten legen nahe, dass die Applikation hochgereinigter IgG- und IgM-Poolpräparationen im Hinblick auf immunologisch und darüber hinaus auch hämorheologisch relevante Erythrozyten-Zell-Interaktionen in vivo nicht inert ist.
- Das experimentelle Design der hier vorgelegten Studie erlaubt prinzipiell die Identifizierung verschiedener Marker-Gene für immunologisch und darüber hinaus auch hämorheologisch relevante Erythrozyten-Zell-Interaktionen.

Der im Rahmen der vorgelegten Arbeit etablierte experimentelle Ansatz ist damit prinzipiell geeignet,

- die Rolle anti-erythrozytärer Allo- und Autoantikörper für immunologisch und darüber hinaus auch hämorheologisch relevante Erythrozyten-Zell-Interaktionen zu beschreiben,
- die Rolle mikrovaskulärer Endothelzellen bei der Entstehung anti-erythrozytärer Immunantworten zu untersuchen, und
- mittelfristig Parameter für eine funktionell orientierte Qualitätskontrolle zellulärer Standardblutkomponenten zu definieren.

5 Abkürzungsverzeichnis

AIHA	autoimmunhämolytische Anämie
APC	antigen presenting cell
aRNA	amplified ribonucleic acid
arc sec	Winkelsekunden (Bogenmaß)
bp	Basenpaar
BS ³	bis(sulfosuccinimidyl)substrate
BSA	Bovines Serumalbumin
CAD	cold agglutinin disease
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cRNA	coding ribonucleic acid
DC	dendritische Zelle
EC	Endothelzelle
ECGS	endothelial cell growth supplement
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Erythrozytenkonzentrat
FCS	Fetal Calf Serum
°C	Grad Celsius
h	Stunde
HBS	Hepes Buffered Saline Solution
HCl	Salzsäure
HDMEC	Human Microvascular Endothelial Cell, aus der Dermis isoliert
Heper	N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulphonic acid]
HIV	human immunodeficiency virus
IAsys	Interaction Analysis system
Ig(G, M oder A)	Immunglobulin (G, M oder A)
IVIgG	intravenös verabreichbares Immunglobulin G
IVIgM	intravenös verabreichbares Immunglobulin M
Im/Ig	intramuskuläre Lösung

Iv/Ig	intravenöse Lösung
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
MW	Mittelwert
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NHP	Normalplasmapool
NHS	1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide / N-hydroxy succinimide
PBS	phosphate buffered saline
PBS/T	PBS, welches Tween 20 TM mit einer Konzentration von 0,05% enthält
pH	Pondus Hydrogenii
RBC	Erythrozyt
Rh(D)	Rhesusfaktor
RNS(RNA)	Ribonukleinsäure(-acid)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Kulturmedium)
SAG	saline Adenin-Glucose
Sc/Ig	subcutane Lösung
SE	Succinamino Ester
SAM	Significance Analysis of Microarray
Std.-Abw.	Standardabweichung
TAC	tetramer Antikörperkomplex
U	Umdrehung
vs	versus
WAIHA	warm autoimmune hemolytic anemia

6 **Abbildungsverzeichnis**

- Abbildung 01: Heterogenität der Endothelzellen (modifiziert nach Choi et al.)
- Abbildung 02: Abbildung einer IAsys-Küvette
- Abbildung 03: Schematische Darstellung des IAsys-Funktionsmechanismus
- Abbildung 04: Immobilisierung an einer Carboxylatoberfläche
- Abbildung 05: Graphen der Immobilisierung an einer Carboxylat-Küvette
- Abbildung 06: Graphen einer Immobilisierung an einer Aminosilan-Küvette
- Abbildung 07: Schematische Darstellung des Messzyklus
- Abbildung 08: Graphen eines Messzyklus
- Abbildung 09: Prinzip der komparativen Genexpressionsanalyse.
- Abbildung 10: Anfertigung eines Genexpressionsprofils
- Abbildung 11: Overlays der verschiedenen Microarrays
- Abbildung 12: Signalintensitäten
- Abbildung 13: Reproduzierbarkeit der Messungen an der HDMEC-Küvette
- Abbildung 14: Reproduzierbarkeit der Messungen an der DC-Küvette
- Abbildung 15: Exemplarische Mittelwerte und Standardabweichungen
- Abbildung 16: Dosis-Wirkungs-Kurve von IVIgG an HDMEC
- Abbildung 17: Dosis-Wirkungs-Kurve von IVIgM an HDMEC
- Abbildung 18: Auswirkung von IVIgG und IVIgM auf die Erythrozyten-HDMEC-
Interaktion in Gegenwart von Normalplasma
- Abbildung 19: Auswirkung von IVIgG und IVIgM auf die Erythrozyten-DC-
Interaktion in Gegenwart von Normalplasma
- Abbildung 20: Auswirkung von IVIgG und IVIgM auf die Erythrozyten-HDMEC-
Interaktion in Gegenwart von WAIHA-Plasma
- Abbildung 21: Auswirkung von IVIgG und IVIgM auf die Erythrozyten-DC-
Interaktion in Gegenwart von WAIHA-Plasma
- Abbildung 22: Auswirkung von IVIgG und IVIgM auf die Erythrozyten-HDMEC-
Interaktion in Gegenwart von CAD-Plasma
- Abbildung 23: Auswirkung von IVIgG und IVIgM auf die Erythrozyten-DC-
Interaktion in Gegenwart von CAD-Plasma

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 01: Probenübersicht für die Genchip-Analytik

Tabelle 02: Hybridisierungsplan der Microarrays

Tabelle 03: Ergebnisse der Genexpressionsprofile

Tabelle 04: Durch Normalplasma regulierte Gene bei der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion

Tabelle 05: Durch IVIgG regulierte Gene bei der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion

Tabelle 06: Durch IVIgM regulierte Gene bei der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion

Tabelle 07: Schnittmengen der durch Plasma, IVIgG und IVIgM regulierten Gene an Endothelzellen

Tabelle 08: Gene, die an Endothelzellen spezifisch durch IVIgG oder IVIgM reguliert werden

Tabelle 09: Durch Plasma regulierte Gene bei der Erythrozyten-Monozyten-Interaktion

Tabelle 10: Durch IVIgG regulierte Gene bei der Erythrozyten-Monozyten-Interaktion

Tabelle 11: Durch IVIgM regulierte Gene bei der Erythrozyten-Monozyten-Interaktion

Tabelle 12: Schnittmengen der durch Plasma, IVIgG und IVIgM regulierten Gene an Monozyten

Tabelle 13: Gene, die an Monozyten spezifisch durch IVIgG oder IVIgM reguliert werden

Tabelle 14: 20 am signifikantesten durch IVIgG und IVIgM unterschiedlich regulierte Gene in Endothelzellen

Tabelle 15: Summierung der durch IVIgG und IVIgM am signifikantesten unterschiedlich regulierten Gene auf die immunologischen Funktionsgruppen

Tabelle 16: 20 am signifikantesten unterschiedlich regulierte Gene durch IVIgG und IVIgM in Monozyten

Tabelle 17: Summierung der durch IVIgG und IVIgM am signifikantesten unterschiedlich regulierten Gene auf die immunologischen Funktionsgruppen

Tabelle 18: 20 Gene, die im Vergleich IVIgG vs. IVIgM die signifikantesten Unterschiede bezüglich der Genregulation aufweisen, aufgeteilt nach immunologischer Funktion

8 Literaturverzeichnis

1. Adib, M., et al., *IgG autoantibody activity in normal mouse serum is controlled by IgM*. J Immunol, 1990. **145**(11): p. 3807-13.
2. Ärztekammer, A.d.d., *Humane Immunglobuline*, in *Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten*. 2003, Deutscher Ärzte-Verlag: Köln. p. 215-240 Kap. 14.
3. Austrup, F., et al., *P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues*. Nature, 1997. **385**(6611): p. 81-3.
4. Baba, R., A. Shibata, and M. Tsurusawa, *Single high-dose intravenous immunoglobulin therapy for kawasaki disease increases plasma viscosity*. Circ J, 2005. **69**(8): p. 962-4.
5. Bayry, J., et al., *Inhibition of maturation and function of dendritic cells by intravenous immunoglobulin*. Blood, 2003. **101**(2): p. 758-65.
6. Bayry, J., et al., *Modulation of dendritic cell maturation and function by B lymphocytes*. J Immunol, 2005. **175**(1): p. 15-20.
7. Boes, M., et al., *Enhanced B-1 cell development, but impaired IgG antibody responses in mice deficient in secreted IgM*. J Immunol, 1998. **160**(10): p. 4776-87.
8. Boes, M., et al., *A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection*. J Exp Med, 1998. **188**(12): p. 2381-6.

9. Boes, M., et al., *Accelerated development of IgG autoantibodies and autoimmune disease in the absence of secreted IgM*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(3): p. 1184-9.
10. Bourin, M.C. and U. Lindahl, *Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation*. Biochem J, 1993. **289 (Pt 2)**: p. 313-30.
11. Broze, G.J., Jr., *Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation*. Annu Rev Med, 1995. **46**: p. 103-12.
12. Choi, J., et al., *T lymphocyte-endothelial cell interactions*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 683-709.
13. Davoust, J. and J. Banchereau, *Naked antigen-presenting molecules on dendritic cells*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(3): p. E46-8.
14. Ehrenstein, M.R., H.T. Cook, and M.S. Neuberger, *Deficiency in serum immunoglobulin (Ig)M predisposes to development of IgG autoantibodies*. J Exp Med, 2000. **191**(7): p. 1253-8.
15. Ehrenstein, M.R., et al., *Targeted gene disruption reveals a role for natural secretory IgM in the maturation of the primary immune response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(17): p. 10089-93.
16. Esmon, C.T., *Thrombomodulin as a model of molecular mechanisms that modulate protease specificity and function at the vessel surface*. Faseb J, 1995. **9**(10): p. 946-55.
17. Gafencu, A., et al., *Investigation of IgG receptors expressed on the surface of human placental endothelial cells*. Placenta, 2003. **24**(6): p. 664-76.
18. Gerstmayer, B. and A. Bosio, *Untersuchung des Einflusses von Erythrozyten und unterschiedlichen Blutplasmen auf die Genexpression von Monozyten und Endothelzellen mittels PIQORTM Immunology Microarrays*. 2004, Memorec Biotec GmbH. p. 1-33.
19. Guery, J.C. and L. Adorini, *Dendritic cells are the most efficient in presenting endogenous naturally processed self-epitopes to class II-restricted T cells*. J Immunol, 1995. **154**(2): p. 536-44.

20. Halliday, G.M. and H.K. Muller, *Langerhans cell presentation of sheep red blood cells induces antibody production*. Immunol Cell Biol, 1987. **65** (Pt 1): p. 71-6.
21. Hart, D.N., *Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response*. Blood, 1997. **90**(9): p. 3245-87.
22. Hebbel, R.P., et al., *Abnormal adherence of sickle erythrocytes to cultured vascular endothelium: possible mechanism for microvascular occlusion in sickle cell disease*. J Clin Invest, 1980. **65**(1): p. 154-60.
23. Herold, G., *Hämatologie*, in *Innere Medizin*. 2006, Gerd Herold: Köln. p. 43, Kap.1.
24. Hochmuth, R.M., et al., *Surface adhesion, deformation and detachment at low shear of red cells and white cells*. Trans Am Soc Artif Intern Organs, 1972. **18**(0): p. 325-34.
25. Hurez, V., S.V. Kaveri, and M.D. Kazatchkine, *Expression and control of the natural autoreactive IgG repertoire in normal human serum*. Eur J Immunol, 1993. **23**(4): p. 783-9.
26. Hurez, V., et al., *Pooled normal human polyspecific IgM contains neutralizing anti-idiotypes to IgG autoantibodies of autoimmune patients and protects from experimental autoimmune disease*. Blood, 1997. **90**(10): p. 4004-13.
27. Imbach, P., et al., *High-dose intravenous gammaglobulin for idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood*. Lancet, 1981. **1**(8232): p. 1228-31.
28. Janeway, C.A., *Die humorale Immunantwort*, in *Immunologie*. 2002, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg. p. 369-370, Kap.9.
29. Janeway, C.A., *Die T-Zell-vermittelte Immunität*, in *Immunologie*. 2002, Spektrum Akademischer Verlag GmbH: Heidelberg. p. 319-321, Kap.8.
30. Kay, M.M., *The IgG autoantibody binding determinant appearing on senescent membranes resides on a 62000 MW peptide*. Acta Biol Med Ger, 1981. **40**(4-5): p. 385-91.
31. Kay, M.M., *Isolation of the phagocytosis-inducing IgG-binding antigen on senescent somatic cells*. Nature, 1981. **289**(5797): p. 491-4.

32. Kay, M.M., *Mechanism of removal of senescent cells by human macrophages in situ*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3521-5.
33. Kazatchkine, M.D. and S.V. Kaveri, *Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin*. N Engl J Med, 2001. **345**(10): p. 747-55.
34. Khansari, N. and H.H. Fudenberg, *Phagocytosis of senescent erythrocytes by autologous monocytes: requirement of membrane-specific autologous IgG for immune elimination of aging red blood cells*. Cell Immunol, 1983. **78**(1): p. 114-21.
35. Krysko, D.V., K. D'Herde, and P. Vandenabeele, *Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences*. Apoptosis, 2006. **11**(10): p. 1709-26.
36. Löffler, G. and P.E. Petrides, *Immunsystem*, in *Biochemie und Pathobiochemie*. 2003, Springer Medizin Verlag: Heidelberg. p. 1124-1125.
37. Ludewig, B., et al., *Role of dendritic cells in the induction and maintenance of autoimmune diseases*. Immunol Rev, 1999. **169**: p. 45-54.
38. Martin, N.B., A. Jamieson, and D.P. Tuffin, *The effect of interleukin-4 on tumour necrosis factor-alpha induced expression of tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 in human umbilical vein endothelial cells*. Thromb Haemost, 1993. **70**(6): p. 1037-42.
39. Mohandas, N. and E. Evans, *Adherence of sickle erythrocytes to vascular endothelial cells: requirement for both cell membrane changes and plasma factors*. Blood, 1984. **64**(1): p. 282-7.
40. Naldini, A. and F. Carraro, *Role of inflammatory mediators in angiogenesis*. Curr Drug Targets Inflamm Allergy, 2005. **4**(1): p. 3-8.
41. Ochsenbein, A.F., et al., *Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies*. Science, 1999. **286**(5447): p. 2156-9.
42. Pober, J.S. and R.S. Cotran, *The role of endothelial cells in inflammation*. Transplantation, 1990. **50**(4): p. 537-44.

43. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada, *The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide*. Br J Pharmacol, 1987. **92**(3): p. 639-46.
44. Robert, C., et al., *Interaction of dendritic cells with skin endothelium: A new perspective on immunosurveillance*. J Exp Med, 1999. **189**(4): p. 627-36.
45. Rothermel, A.L., et al., *Endothelial cells present antigens in vivo*. BMC Immunol, 2004. **5**: p. 5.
46. Santambrogio, L., et al., *Extracellular antigen processing and presentation by immature dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(26): p. 15056-61.
47. Santambrogio, L., et al., *Abundant empty class II MHC molecules on the surface of immature dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(26): p. 15050-5.
48. Savinov, A.Y., et al., *Presentation of antigen by endothelial cells and chemoattraction are required for homing of insulin-specific CD8+ T cells*. J Exp Med, 2003. **197**(5): p. 643-56.
49. Schakel, K., et al., *A novel dendritic cell population in human blood: one-step immunomagnetic isolation by a specific mAb (M-DC8) and in vitro priming of cytotoxic T lymphocytes*. Eur J Immunol, 1998. **28**(12): p. 4084-93.
50. Schwender, H., *Identifying differentially expressed genes with siggenes*. 2006. p. 1-15.
51. Smith, B.D. and P.L. La Celle, *Erythrocyte-endothelial cell adherence in senescence and in hemolytic disorders*. Biomed Biochim Acta, 1987. **46**(2-3): p. S93-7.
52. Smith, B.D. and P.L. La Celle, *Erythrocyte-endothelial cell adherence in sickle cell disorders*. Blood, 1986. **68**(5): p. 1050-4.
53. Stahl, D., *Warm Autoimmune Hemolytic Anemia: A Clinical Model to Study Mechanisms of Immunoregulation*. Transfus Med Hemother, 2006. **33**: p. 135-143.

54. Stahl, D. and W. Sibrowski, *Autoimmunhämolytische Anämie vom Wärmetyp: Von der transfusionsmedizinischen Diagnostik zu Antikörper-Repertoires*. J Lab Med, 2002. **26**(7/8): p. 389-398.
55. Wahn, V., *Immunmodulation mit Immunglobulinen: Mechanismen*, in *Klinischer Einsatz von intravenösen Immunglobulinen*. 2003, UNI-MED Verlag AG: Bremen. p. 73-82 Kap.7.
56. Wahn, V., *Klinischer Einsatz von intravenösen Immunglobulinen*. Vol. 2. 2003, Bremen: UNI-MED Verlag AG. p. 45-154.
57. Wykes, M. and G. MacPherson, *Dendritic cell-B-cell interaction: dendritic cells provide B cells with CD40-independent proliferation signals and CD40-dependent survival signals*. Immunology, 2000. **100**(1): p. 1-3.

9 Danksagung

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Für das Thema meiner Doktorarbeit und die Möglichkeit diese Arbeit im Institutes für Transfusionsmedizin durchzuführen bedanke ich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Sibrowski.

Frau Prim. Prof. Dr. Dorothea Stahl danke ich aus tiefstem Herzen für ihre unermüdliche Unterstützung während der gesamten Entwicklungszeit, für die vielen Anregungen und ihr stets offenes Ohr für alle angefallenen Probleme.

Frau Nani Osada danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Arbeit.

Bei Katharina Mahncke sage ich dank für die gute Zusammenarbeit und die moralische Unterstützung während des gesamten Zeitraums.

Zum Schluss danke ich noch ganz besonders meinen Eltern, die mich in jeder Lebenslage unterstützt haben und auf die ich mich immer verlassen konnte.

10 Lebenslauf

Name: Rautmann, Rietje

Geburtsort: Hannover

Geburtsdatum: 05.09.1980

Eltern: Dr. Klaus Rautmann
Landschaftsarchitekt
Maritta Zehnich-Rautmann
Berufschullehrerin

Schullaufbahn: Gemeinschaftsgrundschule der Stadt Dorsten/Pestalozzischule
Herbst 1987 - Sommer 1990
Grundschule an der Augsburgersstraße, Bremen
Herbst 1990 - Sommer 1991
Gesamtschule Bremen West, Bremen
Herbst 1991 - Sommer 1993
Gymnasium an der Herman-Böse-Straße, Bremen
Herbst 1993 - Sommer 1997
Yale High School, Yale, Michigan, USA
Herbst 1997 - Sommer 1998
Gymnasium an der Herman-Böse-Straße, Bremen
Herbst 1998 - Sommer 2000
Abitur Juni 2000

Studium: Westfälische-Wilhelms-Universität Münster
Fachbereich Zahnmedizin
01. - 11. Semester
Immatrikulation im Wintersemester 2000/2001
Naturwissenschaftliche Vorprüfung September 2001
Zahnärztliche Vorprüfung März 2003
Zahnärztliche Prüfung Juli 2006
Approbation zur Zahnärztin Juli 2006

Arbeit: Assistenz Zahnärztin, Bad Nauheim
Januar 2007

Bad Nauheim, den 28.05.2007

11 Anhang

Ergebnisprotokoll von Memorec Biotec GmbH

Endbericht
für das
**INSTITUT FÜR TRANSFUSIONSMEDIZIN UND
TRANSPLANTATIONSIMMUNOLOGIE DER UNIVERSITÄT ZU
MÜNSTER**

**Untersuchung des Einflusses von Erythrozyten und
unterschiedlichen Blutplasmen auf die Genexpression
von Monozyten oder Endothelzellen mittels
PIQOR™ Immunology Microarrays**

Memorec Biotec GmbH

07.05.2004

Dr. Bernhard Gerstmayer
Manager Genomics Services

Dr. Andreas Bosio
Head of R&D Unit Genomics

Projekttitle: Untersuchung des Einflusses von Erythrozyten und unterschiedlichen Blutplasmen auf die Genexpression von Monozyten oder Endothelzellen mittels PIQOR™ Immunology Microarrays

Kunde: Universität zu Münster

Projektleiter: OÄ Dr. med. Dorothea Stahl

Kundennummer: 127

Auftragsnummern: 501; 506

Probe: Zellpellets aus Endothelzellen mit Erythrozyten, sowie Monozyten mit Erythrozyten aus unterschiedlichen in vitro Experimenten

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	4
I.1	Projektbeschreibung	4
I.2	PIQOR™ Microarrays	5
II	Ergebnisse	5
II.1	Herstellung themenspezifischer PIQOR™ Microarrays	5
II.2	Präparation der RNAs	6
II.3	Amplifikation der <i>messenger</i> RNA	8
II.4	Hybridisierungen der PIQOR™ Microarrays	11
II.5	Erstellung der Expressionsprofile	12
II.6	Zusammenfassung detektierbarer und differentiell exprimierter Gene	16
II.7	Analyse des Einflusses unterschiedlich lang gelagerter Erythrozyten auf Monozyten oder Endothelzellkulturen	18
II.8	Analyse des Einflusses unterschiedlicher Blutplasmen auf Monozyten oder Endothelzellkulturen in Gegenwart von Erythrozyten	22
III	Zusammenfassung und Ausblick	27
IV	Methoden	28
IV.1	mRNA amplification protocol	28
IV.2	Labelling reaction	30
IV.3	Sample clean-up	31
IV.4	PIQOR™ Microarray Pre-treatment	31
IV.5	Pre-Hybridization	31
IV.6	Hybridization	32
IV.7	Washing	32
V	Anhang	33

I Einleitung

I.1 Projektbeschreibung

Ziel des Projektes ist die Analyse der *in vitro*-Expressionsprofile von humanen mikrovaskulären Endothelzellen (EC), sowie Monozyten (M) in Anwesenheit von Erythrozyten (RBC) aus verschiedenen Zellkulturexperimenten mittels PIQOR™ Immunology Microarrays. Die Zellen wurden vom Kunden in unterschiedlichen Bedingungen kultiviert und nach entsprechenden Zeitpunkten geerntet (siehe Tabelle 1). Es wurden 5x10E5 Endothelzellen mit 4x10E9 Erythrozyten und 5x10E6 Monozyten mit 4x10E9 Erythrozyten eingesetzt. Die RNA Extraktion wurde von Memorec mittels PAXgene Blood RNA Kit (PreAnalytiX; QIAgen) durchgeführt.

Tab. 1: Probenübersicht

Probenbezeichnung	Ansatz	Lagertag des RBC Pools
EC_01	EC + RBC + HBS	1 d
EC_02	EC + RBC + Normalplasma	1 d
EC_03	EC + RBC + Normalplasma	21 d
EC_04	EC + RBC + Normalplasma	42 d
EC_05	EC + RBC +Allo-Anti-D	1 d
EC_06	EC + RBC +WAIHA	1 d
EC_07	EC + RBC +CAD	1 d
EC_08	EC + RBC +IVIgG	1 d
EC_09	EC + RBC +IVIgM	1 d
M_01	M + RBC + HBS	1 d
M_02	M + RBC + Normalplasma	1 d
M_03	M + RBC + Normalplasma	21 d
M_04	M + RBC + Normalplasma	42 d
M_05	M + RBC +Allo-Anti-D	1 d
M_06	M + RBC +WAIHA	1 d
M_07	M + RBC +CAD	1 d
M_08	M + RBC +IVIgG	1 d
M_09	M + RBC +IVIgM	1 d

Allo-Anti-D: Alloantikörper-haltiges Plasma

WAIHA: Wärmeautoantikörper-haltiges Plasma (Warm autoimmune hemolytic anemia)

CAD: Kälteautoantikörper-haltiges Plasma

IVIgG: intravenöses Immunglobulin G

IVIgM: intravenöses Immunglobulin M

I.2 PIQOR™ Microarrays

Memorec hat eine Kollektion von cDNA-Fragmenten (Spezies Mensch, Maus, Ratte) speziell zur Herstellung von PIQOR™ Microarrays erstellt. Diese sind dadurch charakterisiert, dass sie einzeln für bestimmte Fragestellungen ausgesucht, kloniert und sequenzverifiziert worden sind. Um eine möglichst hohe Selektivität zu erreichen und falsch positive bzw. falsch negative Ergebnisse aufgrund von Kreuzhybridisierung zu vermeiden, werden nur solche cDNA-Fragmente verwendet, die folgende Kriterien erfüllen:

- Es sind keine repetitiven Elemente (z.B. Alu, B1, MIRs, Mikrosatelliten) enthalten.
- Die Sequenzhomologie zu allen anderen bekannten cDNAs (öffentliche Datenbanken) ist < 85%.
- Die Fragmentlänge beträgt 200 – 400 bp.
- Das ausgewählte Fragment deckt jeweils alle alternativen Spleiß- und Polyadenylierungsvarianten ab.

II Ergebnisse

II.1 Herstellung themenspezifischer PIQOR™ Microarrays

Auf den PIQOR™ Immunology Microarrays sind insgesamt 1076 cDNAs aufgebracht (inklusive 12 Kontrollen: 10 Positiv- und 2 Negativkontrollen). Die Positivkontrollen stellen sechs "house-keeping" Gene und vier DNA-Fragmente aus E.coli (CR's: *control RNAs*) dar. Letztere werden in Form von *in vitro* transkribierter RNA zur Human-RNA gegeben, um den Markierungs- und Hybridisierungsprozess zu kontrollieren. Als Negativkontrollen sind Heringsperma-DNA und Puffer aufgetragen. Von jedem klonierten cDNA-Fragment aus Memorecs cDNA Kollektion wurde eine Amplifikation der Inserts mit Vektor-Primern durchgeführt, die Amplifikate wurden im Agarosegel aufgetrennt und die Länge der Inserts kontrolliert. Die amplifizierten cDNAs wurden anschließend aufgereinigt und auf eine einheitliche Konzentration von ca. 100 ng/µl eingestellt. Gleiche Mengen der PCR-Amplifikate der klonierten cDNA-Fragmente wurden mit einem Dispensiergerät auf die Oberfläche derivatisierter Objektträger aufgetropft. Zur Qualitätskontrolle wurde die DNA der produzierten Charge mit einem fluoreszierenden Farbstoff spezifisch angefärbt. Jede cDNA ist vierfach aufgetragen, so dass insgesamt 4304 Spots je Microarray vorhanden sind. Eine Belegungsliste der Microarrays ist im Anhang, Tabelle A1, beigefügt.

II.2 Präparation der RNAs

In Vorversuchen wurden unterschiedliche RNA Isolierungsmethoden ausgetestet. Hierbei zeigte sich dass eine Aufreinigung der RNA mit Trizol aufgrund des hohen Anteils an Erythrozyten nicht möglich war. Wesentlich bessere Ergebnisse konnten mit dem PAXgene Blood RNA Kit erzielt werden, welcher auch für die RNA Isolierung eingesetzt wurde. Die Zellpellets wurden im gefrorenen Zustand in je 3,5 ml Lösung aus dem *Blood RNA Tube* resuspendiert und anschließend für 2 Stunden bei Raumtemperatur lysiert. Die weitere Vorgehensweise war entsprechend dem *PAXgene Blood RNA Kit Handbook*. Alle RNA Proben wurden danach bezüglich Reinheit, Konzentration und Ausbeute spektrophotometrisch vermessen (Tab. 2).

Tab.2: Reinheit , Konzentration und Ausbeute der RNAs

Sample ID	Konzentration [ng/µl]	Reinheit [260/280]	Ausbeute [µg]
EC_01	4.2	2.23	0.3
EC_02	2.7	1.8	0.2
EC_03	3.5	1.7	0.3
EC_04	4.6	1.8	0.4
EC_05	4.0	2.5	0.3
EC_06	4.1	3.3	0.3
EC_07	7.2	1.6	0.6
EC_08	8.5	2.2	0.7
EC_09	8.3	2.0	0.7
M_01	17.1	1.8	1.4
M_02	16.3	2.1	1.3
M_03	19.5	2.0	1.6
M_04	23.4	1.9	1.9
M_05	27.6	1.8	2.2
M_06	10.4	1.8	0.8
M_07	6.1	2.7	0.5
M_08	5.6	2.0	0.5
M_09	45.4	1.9	3.6

Die Qualität der RNAs wurde mit dem Bioanalyzer 2001 (Agilent) gelelektrophoretisch überprüft (Abb. 1A, Elektropherogramm; Abb. 1B, Elutionsdiagramm)

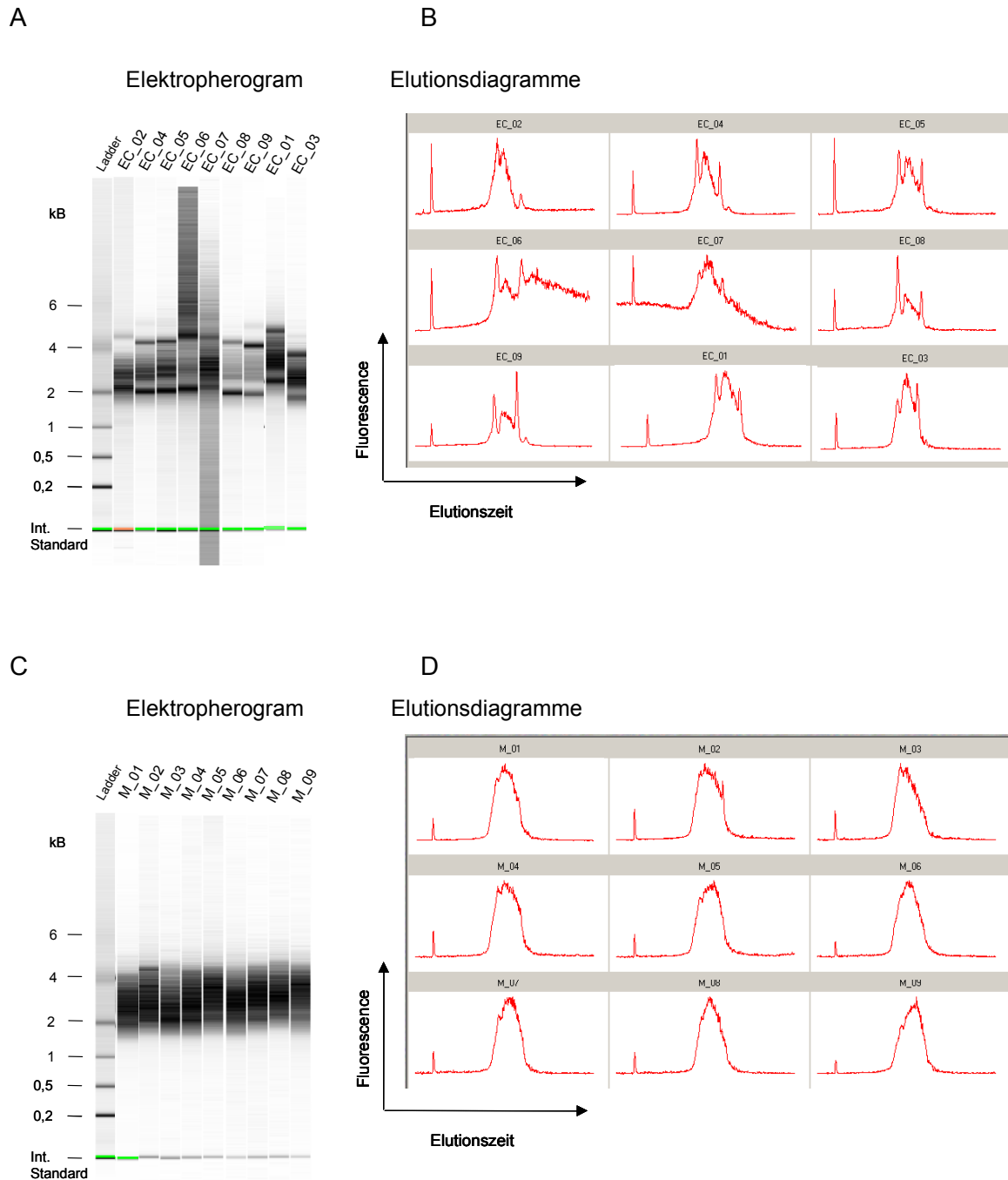


Abb. 1: Elektropherogramme (A und C) sowie Elutionsdiagramme (B und D) der RNAs. A und B stellen die Ergebnisse ausgehend von Monozyten dar. C und D stellen die Ergebnisse ausgehend von Endothelzellen dar. Erwartet würden zwei herausragende Peaks bei ca. 2 kB (18S RNA) und 4 kB (28S RNA), welche die ribosomale RNA repräsentieren. Der jeweils erste Peak (ganz links) repräsentiert einen internen Standard, der zur Quantifizierung der RNA herangezogen werden kann. Eine Zusammenfassung aus mehreren Gelläufen ist gezeigt.

Da die gelieferten Zellpellets einen 1000- bis 10.000-fachen Überschuss an Erythrozyten besaßen, konnte die RNA nur in unreiner Form isoliert werden. Die Verunreinigungen stellen sehr wahrscheinlich zumindest zum Teil gescherte genomische DNA (Schulter zwischen ca. 2 kB und 4 kB) dar, welche die Peaks der ribosomalen RNAs überlagern. Unter Standardbedingungen wird als Qualitätskontrolle der RNA das Verhältnis der Peakflächen der 28S zu 18S RNA bestimmt. Eigene Erfahrungswerte sowie die Angaben vom Hersteller (Agilent Technologies) belegen, dass ein Verhältnis dieser Peakflächen >1.5 - in Verbindung mit der Verteilung der RNA im Elutionsdiagramm - auf eine intakte, nicht degradierte RNA hinweisen. In der hier vorliegenden Studie war eine Qualitätskontrolle auf Ebene der Gesamt-RNA nicht möglich. Um jedoch einen Verlust von Probenmaterial zu vermeiden, wurde auf eine zusätzliche Aufreinigung - beispielsweise über einen nachgeschalteten DNase Verdau - verzichtet. Aufgrund der sehr geringen Probenmenge wurde auf den Pico Kit von Agilent zurückgegriffen, der Probenmengen im Bereich 1-5 ng detektieren kann. Dieses sehr sensitive Detektionssystem reagiert jedoch empfindlich auf geringe Salzmengen in der Probe. So ist beispielsweise in den Proben EC_06 und EC_07 eine Verschiebung der Basislinie im Elutionsdiagramm erkennbar, die sehr wahrscheinlich aufgrund von geringen Salzresten in der Probe herrührt. Diese geringen Reste haben jedoch auf die weiteren Schritte im Rahmen der Amplifikation keine negativen Auswirkungen.

II.3 Amplifikation der *messenger* RNA

Aufgrund der geringen Gesamt-RNA Ausbeuten wurde der mRNA-Anteil der präparierten RNA vor der Hybridisierung amplifiziert. Dies geschah mit einem oligo-dT-Primer, der am 5'-Ende die Sequenz des T7-Promotors trägt. Dieser Schritt stellt gewissermaßen einen weiteren Aufreinigungsschritt der Proben dar. Es wurde zunächst in Vorversuchen untersucht ob aus den unsaubereren Gesamt-RNA Proben genügend große Mengen mit gewünschten Transkriptlängen (ca. 1 kB im Durchschnitt) an amplifizierter antisense RNA (aRNA) erhalten werden kann. Nachdem dies sichergestellt war (Daten nicht gezeigt), wurde nach Rücksprache mit dem Kunden festgelegt, dass im Rahmen dieses Projektes die Beurteilung der RNA Qualität auf Ebene der aRNA und nicht auf Ebene der Gesamt-RNA durchgeführt wird.

Bei einem Großteil der Proben waren die nach der RNA Präparation erhaltenen Mengen unterhalb der üblicherweise im Rahmen des Amplifikationsprotokolls empfohlenen Mindestmenge (1.0 µg Gesamt-RNA). In diesen Fällen wurde entsprechend die maximal mögliche Menge für die Amplifikation der mRNA eingesetzt. Die empfohlene Mindestmenge bedeutet hier jedoch nicht, dass bei Einsatz geringerer Mengen an Gesamt-RNA eine nicht-lineare Amplifikation der Probe die Folge ist. Vielmehr soll diese

Ausgangsmenge sicher stellen, dass nach der Amplifikation genügende Mengen an aRNA vorhanden sind (Minimum 1 µg aRNA). Nach reverser Transkription von 0.2 – 1.0 µg Gesamt-RNA (entspricht ca. 0.004 - 0.02 µg mRNA) und Zweitstrangsynthese wurden die entstandenen cDNAs *in vitro* transkribiert. Die Amplifikationsrate betrug ca. 200- bis 1000-fach. Die Produkte der Amplifikationen wurden spektrophotometrisch analysiert (Tab. 3). Die Gelelektrophorese zeigt, dass alle Ansätze erfolgreich amplifiziert wurden.

Tab. 3: Reinheit, Konzentration und Ausbeute der amplifizierten RNA (aRNA).

Sample ID	Konzentration [ng/µl]	Reinheit [260/280]	Ausbeute [µg]
aRNA EC_01	65.1	2.4	3.9
aRNA EC_02	36.5	2.5	2.2
aRNA EC_03	26.6	2.3	1.6
aRNA EC_04	24.8	2.2	1.5
aRNA EC_05	58.1	2.3	3.5
aRNA EC_06	99.1	2.3	5.9
aRNA EC_07	201.9	2.3	12.1
aRNA EC_08	162.1	2.2	9.7
aRNA EC_09	119.8	2.3	7.2
aRNA M_01	246.0	2.3	14.8
aRNA M_02	324.3	2.3	19.5
aRNA M_03	411.6	2.2	24.7
aRNA M_04	375.7	2.3	22.5
aRNA M_05	188.3	2.3	11.3
aRNA M_06	163.8	2.1	9.8
aRNA M_07	170.1	2.1	10.2
aRNA M_08	121.1	2.3	7.3
aRNA M_09	225.4	2.2	13.5

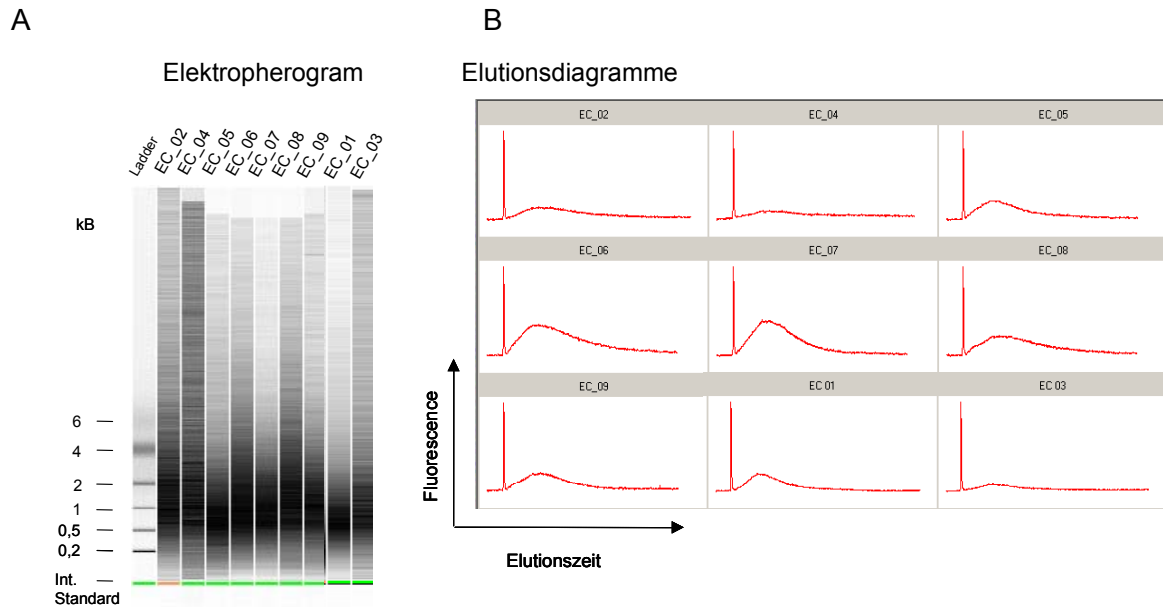


Abb. 2: Elektropherogramme (A) sowie Elutionsdiagramme (B) der amplifizierten RNAs ausgehend von Endothelzellen. Untersucht wurde jeweils 1µl im Bioanalyser (Agilent). Zum Größenvergleich sind die Fragmentlängen eines RNA-Markers (Ladder) in kB angegeben. Die jeweils unterste Bande repräsentiert einen internen Standard. Eine Zusammenfassung aus mehreren Gelläufen ist gezeigt.

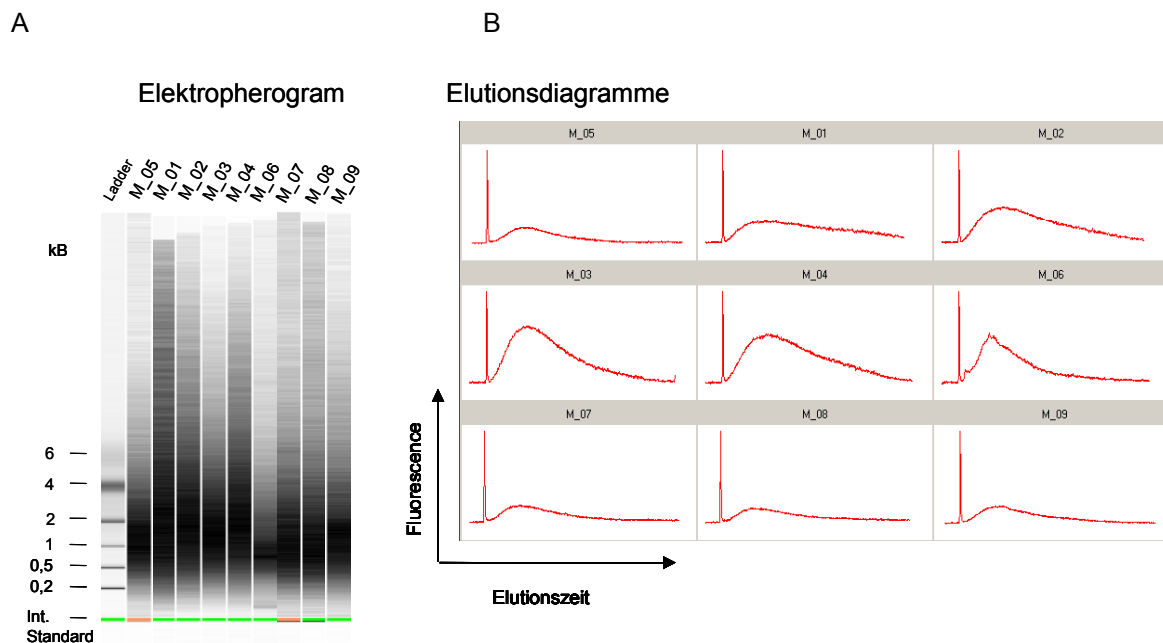


Abb. 3: Elektropherogramme (A) sowie Elutionsdiagramme (B) der amplifizierten RNAs ausgehend von Monozyten. Untersucht wurde jeweils 1µl im Bioanalyser (Agilent). Zum Größenvergleich sind die Fragmentlängen eines RNA-Markers (Ladder) in kB angegeben. Die jeweils unterste Bande

repräsentiert einen internen Standard. Eine Zusammenfassung aus mehreren Gelläufen ist gezeigt.

Alle aRNAs wiesen eine ähnliche Größenverteilung mit einer durchschnittlichen Transkriptlänge von ca. 1 kB auf. Bei Probe M_06 ist die durchschnittliche Transkriptlänge mit 900 bp etwas kürzer. Nach Rücksprache mit dem Kunden wurden alle aRNA Proben weiter prozessiert.

II.4 Hybridisierungen der PIQOR™ Microarrays

Für die Bestimmung der Expressionsprofile wurden jeweils 1 µg aRNA aus den jeweiligen Versuchsgruppen eingesetzt, mit Cy3 bzw. Cy5 markiert und entsprechend des Hybridisierungsplanes (Tab. 4) gemeinsam auf einem PIQOR™ Immunology Microarray hybridisiert. Da bei den Experimenten mit den Endothelzellen im Gegensatz zu den Monozytenexperimenten von der als Kontrolle vorgesehenen Probe EC_02 nicht genügend aRNA zur Durchführung der geplanten 8 Hybridisierungen vorhanden war, wurde eine Pool aus mehreren Proben als Kontrolle hergestellt. Dazu wurden jeweils gleiche Mengen an aRNA von den Proben EC_06, EC_07, EC_08 und EC_09 gepoolt und daraus 1 µg pro Markierungsreaktion eingesetzt. Dieser Ansatz wird im weiteren Verlauf als *Pool EC_06-09* bezeichnet.

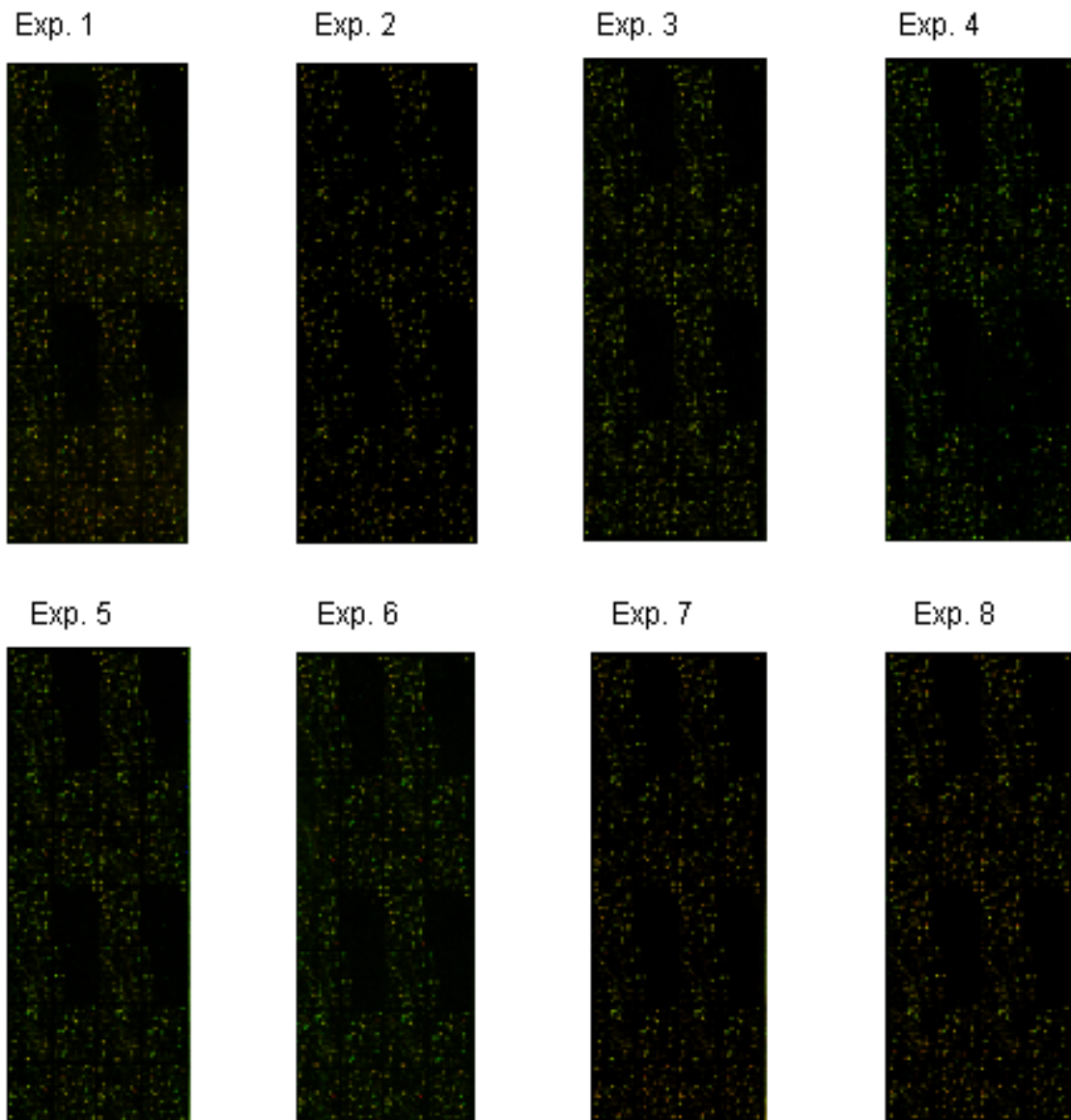
Die Markierung erfolgte durch reverse Transkription der RNA unter Einbau fluoreszenzmarkierter Nukleotide (Cy3-dCTP bzw. Cy5-dCTP). Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die durchgeführten Hybridisierungen.

Tab. 4: Zusammenfassung der Hybridisierungen auf den 17 Microarrays.

Exp./Hybridisierung	Cy5-Markierung	Cy3-Markierung	Microarray Nr.
1	M_01	M_02	000305(041)
2	M_03	M_02	000305(042)
3	M_04	M_02	000305(043)
4	M_05	M_02	000305(044)
5	M_06	M_02	000305(045)
6	M_07	M_02	000305(046)
7	M_08	M_02	000305(047)
8	M_09	M_02	000305(048)
9	EC_01	Pool EC_06-09	000305(049)
10	EC_02	Pool EC_06-09	000305(050)
11	EC_03	Pool EC_06-09	000305(051)
12	EC_04	Pool EC_06-09	000305(052)
13	EC_05	Pool EC_06-09	000305(053)
14	EC_06	Pool EC_06-09	000305(054)
15	EC_07	Pool EC_06-09	000305(055)
16	EC_08	Pool EC_06-09	000305(056)
17	EC_09	Pool EC_06-09	000305(057)

II.5 Erstellung der Expressionsprofile

Die Fluoreszenzsignale der hybridisierten Microarrays wurden mit einem Laser-Scanning-Gerät (ScanArray Lite, Packard Bioscience.) eingelesen. Die für beide Fluoreszenzmarkierungen erhaltenen Bilder wurden für die weitergehende Analyse digital übereinander gelegt ("Overlay"). In Abbildung 3 sind zur visuellen Qualitätskontrolle die Overlays der 17 Experimente dargestellt.



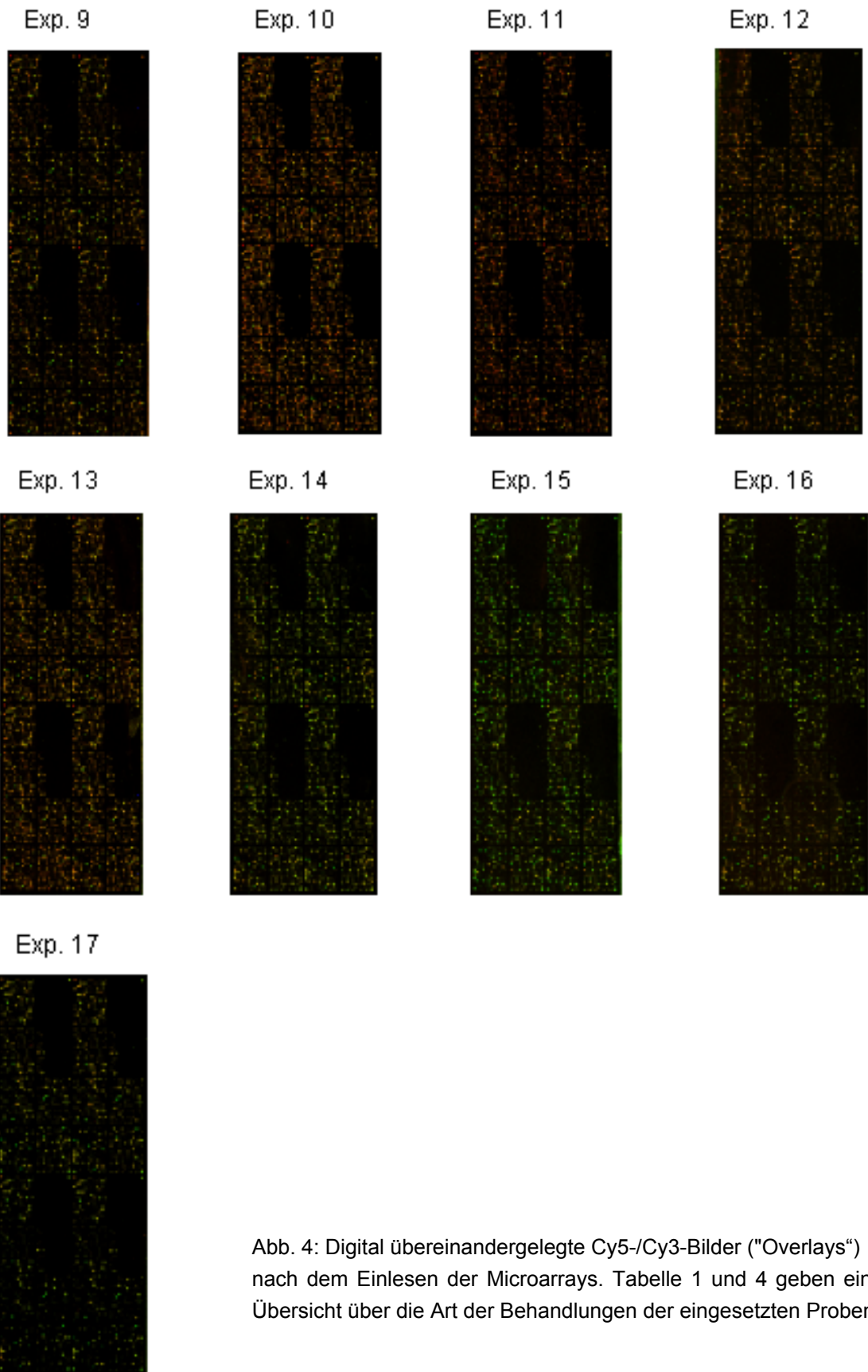


Abb. 4: Digital übereinandergelegte Cy5-/Cy3-Bilder ("Overlays") nach dem Einlesen der Microarrays. Tabelle 1 und 4 geben eine Übersicht über die Art der Behandlungen der eingesetzten Proben.

In den dargestellten Overlays bedeutet die Farbe Rot, dass die Cy5-Fluoreszenz eine höhere Intensität als die Cy3-Fluoreszenz hat. Das entsprechende Gen lag damit im Versuchsansatz höher exprimiert vor als bei der Kontrolle. Grün drückt umgekehrt aus, dass die Cy3-Fluoreszenz stärker ist als die Cy5-Fluoreszenz und das Gen somit im Kontrollansatz stärker exprimiert war. Gelbe Signale treten auf, wenn beide Fluoreszenzen die gleiche Intensität aufweisen und das entsprechende Gen in beiden Ansätzen gleich stark exprimiert wurde.

Zur Erstellung der Expressionsprofile wurden für die hybridisierten Microarrays zunächst die Signal- und Hintergrund-Intensitäten für Cy3 und Cy5 mit Hilfe der ImaGeneTM Software 5.1 (BioDiscovery) bestimmt. Die Hintergrundwerte wurden von den Signalintensitäten subtrahiert und der Quotient aus Cy5/Cy3-Signal berechnet. Die Werte wurden über den Median aller Signalquotienten normiert und anschließend wurde der Mittelwert der 4-fach Replikate berechnet. Die Microarrays wurden visuell kontrolliert, um Artefakte auszuschließen. Abbildung 5 zeigt die Punktdiagramme der 17 Hybridisierungsexperimente. Punkte, die außerhalb der Bereiche liegen, die durch die gestrichelten Diagonalen eingegrenzt werden, weisen eine 2-fach, 5-fach bzw. 10-fach differentielle Signalintensität auf. An diesen Punktdiagrammen ist der dynamische Bereich der gemessenen Signalintensitäten abzulesen, der ca. drei Zehnerpotenzen beträgt.

Bei den folgenden Auswertungen wurden Signalquotienten (Cy5/Cy3) nur dann aufgeführt, wenn die gemessene Intensität eines Fluoreszenzfarbstoffes (Cy5 oder Cy3) mindestens 2-fach über dem Mittelwert des Hintergrundes aller validen Spots („unflagged“) lag. Gene, die dieses Kriterium erfüllen, werden im folgenden als „detektiert“ bezeichnet. Auf diese Weise werden sehr schwache Signalwerte, die sich nur unwesentlich vom Hintergrund abheben und bei geringen Hintergrundschwankungen häufig falsch positive Ergebnisse liefern, ausgeschlossen.

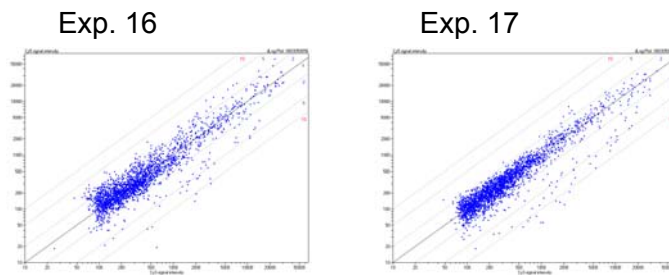


Abb. 5: Signalintensitäten der Spots in den Experimenten 1-17. Die Signalintensitäten der jeweiligen cDNA (als Punkt erkennbar) ist doppellogarithmisch dargestellt. Abszisse: Cy3-Signalintensität, Ordinate: Cy5-Signalintensität. Die gestrichelten Diagonalen definieren die Bereiche x-fach differentieller Signalintensitäten.

II.6 Zusammenfassung detektierbarer und differentiell exprimierter Gene

Eine Zusammenfassung der 17 Experimente ist in Tabelle 5 und 6 dargestellt.

Tab. 5: Deskriptive Statistik der differentiellen Genexpression (Exp. 1-8)

Anzahl cDNAs	Exp.1_3050041	Exp.2_3050042	Exp.3_3050043	Exp.4_3050044
gesamt	1070	1070	1070	1070
detektiert*	487	560	426	565
≥ ±2-fach differentiell	54	7	4	60
≥ ±5-fach differentiell	2	0	0	1
max. diff. Expression	0.11	2.8	0.42	0.2
Anzahl cDNAs	Exp.5_3050045	Exp.6_3050046	Exp.7_3050047	Exp.8_3050048
gesamt	1070	1070	1070	1070
detektiert*	520	498	511	543
≥ ±2-fach differentiell	66	82	59	42
≥ ±5-fach differentiell	5	14	2	1
max. diff. Expression	0.17	0.06	6.2	0.17

* bei Cy3 und/oder Cy5 mind. 2-fach höhere Signalintensität als die Negativkontrollen

Von den insgesamt 1076 cDNAs, abzüglich der vier gespotteten CR's und der zwei Negativ-Kontrollen Salz und Heringssperma-DNA, wurden 630 Transkripte in mindestens einem der 8 Experimente mit Monozyten detektiert. In Experiment 4 wurden mit 565 cDNAs die meisten Gene detektiert. Die größte Anzahl an differentiell exprimierten Genen

(82) wurde in Exp. 6 gefunden. Die stärkste differentielle Regulation (0.06-fach) findet sich ebenso in Experiment 6. Die Signalquotienten aller Gene sind im Anhang aufgelistet (Tab. A2).

Tab. 6: Statistik der differentiellen Genexpression (Exp. 9-17)

Anzahl cDNAs	Exp.9_3050049	Exp.10_3050050	Exp.11_3050051	Exp.12_3050052	Exp.13_3050053
gesamt	1070	1070	1070	1070	1070
detektiert*	766	884	950	907	767
≥ ±2-fach differentiell	46	35	38	26	24
≥ ±5-fach differentiell	6	3	3	3	5
max. diff. Expression	0.06	0.08	0.07	0.07	0.06
Anzahl cDNAs	Exp.14_3050054	Exp.15_3050055	Exp.16_3050056	Exp.17_3050057	
gesamt	1070	1070	1070	1070	
detektiert*	855	678	634	754	
≥ ±2-fach differentiell	31	78	37	20	
≥ ±5-fach differentiell	3	4	4	9	
max. diff. Expression	0.08	0.14	0.10	0.07	

Bei den Experimenten mit Endothelzellen wurden von den insgesamt 1076 cDNAs, abzüglich der vier gespotteten CR's und der zwei Negativ-Kontrollen Salz und Heringssperma-DNA, wurden 974 Transkripte in mindestens einem der 9 Experimente mit detektiert. In Experiment 11 wurden mit 950 cDNAs die meisten Gene detektiert. Die größte Anzahl an differentiell exprimierten Genen (78) wurde in Exp. 15 gefunden. Die stärkste differentielle Regulation (0.06-fach) findet sich in den Experimenten 9 und 13. Die Signalquotienten aller Gene sind ebenso im Anhang aufgelistet (Tab. A3).

Weiter führende Informationen zu den biologischen Funktionen der entsprechenden Genprodukte sind mit Hilfe des PIQOR™-Navigator (siehe mitgelieferte CD) zu erhalten. Die Software erlaubt eine schnelle Suche nach den aufgetragenen cDNAs in der Belegungsliste und den direkten Zugang zu geeigneten Datenbankeinträgen.

II.7 Analyse des Einflusses unterschiedlich lang gelagerter Erythrozyten auf Monozyten oder Endothelzellkulturen

In einem ersten Ansatz zur weiteren Auswertung der Ergebnisse wurde der Frage nachgegangen, ob man in den Monozyten-Experimenten Gene identifizieren kann, die als "Markergene" für den Alterungsprozess der Erythrozyten herangezogen werden können (Exp. 2 + 3). Zusätzlich wurde in Exp. 1 der Einfluß von Normalplasma analysiert. Es zeigt sich in den Exp. 2 und 3, dass nur eine sehr geringe Anzahl an Genen differentiell exprimiert (hier: >2-fach, <0.5-fach reguliert) gefunden wurden.

Würde man beispielsweise dieselbe RNA einmal mit Cy3 und einmal mit Cy5 markieren („self-self“ Experiment) so würde man erwarten, dass alle Gene nach Normierung ein Ratio von 1 aufweisen sollten. In der Praxis ist dies aufgrund eines gewissen, experimentell bedingten Rauschens nicht erreichbar. Wir wissen aus einer Vielzahl eigener Validierungsstudien, dass in einem typischen „self-self“ Experiment keines der gemessenen Gene eine größer als 2-fache Induktion oder eine kleiner als 0.5 fache Repression aufweist. Demzufolge ist unsere Empfehlung für Einzel-Experimente (nicht bei mehrfachen biologischen Wiederholungen!) bei denen 2 unterschiedliche Zustände miteinander verglichen werden, dass zunächst auf Genregulationen die >2-fach bzw. <0.5-fach näher eingegangen werden sollte. Bei mehrfachen biologischen Wiederholungen von Experimenten unter Anwendung statistischer Methoden gelingt es darüber hinaus aber auch, signifikante Genregulationen die deutlich unter diesem Schwellenwert >2-fach/<0.5-fach liegen, zu identifizieren.

Vergleicht man nun die wenigen regulierten Gene der Exp. 2 und 3 der 21 bzw. 42 Tage gelagerten RBCs jeweils gegen die 1 Tag gelagerten RBCs so stellt man neben den wenig stark ausgeprägten Regulationen auch keine Gemeinsamkeiten innerhalb dieser Gengruppen fest. Dies weist sehr stark darauf hin, dass diese Art der Inkubation von Monozyten mit den unterschiedlich lang gelagerten RBC Präparaten keine Aufschlüsse über die Alterung der RBCs ergibt. Möglicherweise könnte eine längere Dauer der Inkubation in diesem Fall vorteilhafter sein.

Wesentlich interessanter gestaltet sich der Vergleich aus Exp. 1 bei dem in der Gegenwart bzw. Abwesenheit von Plasma die Monozyten/RBCs co-inkubiert wurden. Hier findet man eine Reihe von stark differentiell regulierten Genen. Einige dieser Gene sind in Tab. 7 dargestellt (siehe auch Anhang Tab. A2).

Die aufgeführten Gene müssen in mindestens einem Kanal eine Signalintensität aufweisen, welche mindestens 2-fach über dem Mittelwert der Signalintensitäten des Backgrounds liegen. SD bezeichnet die Standardabweichung der Mittelwerte der Expressionsquotienten von 4 Spots. Angegeben sind die berechneten Cy5/Cy3 Ratios.

Tab.7: >3 sowie <1/3-fache Regulationen aus Exp. 1

Gene name	Ratio/SD
CCL2_HUMAN: (SCYA2 OR MCP1) SMALL INDUCIBLE CYT	0.11 / 21 %
CD52: (CDW52 OR CD52 OR HE5 OR MB7 OR RB7) CAMP	0.13 / 22 %
AIF1: (AIF1 OR IBA1) ALLOGRAFT INFLAMMATORY FACTO	0.22 / 52 %
PAFA: (PLA2G7) PLATELET-ACTIVATING FACTOR ACETYL	0.24 / 9 %
CD33: (CD33) MYELOID CELL SURFACE ANTIGEN CD33 P	0.26 / 46 %
CX3CR1: (CX3CR1 OR GPR13) CX3C CHEMOKINE RECEPT	3.00 / 69 %
LRP1: (LRP1 OR A2MR) LOW-DENSITY LIPOPROTEIN REC	3.06 / 21 %
IL6: (IL6 OR IFNB2 OR IL-6) INTERLEUKIN-6 PRECURSOR	3.11 / 31 %
ILF: (ILF1 OR ILF) INTERLEUKIN ENHANCER-BINDING FAC	3.35 / 41 %
THBD: (THBD OR THRM) THROMBOMODULIN PRECURSOR	4.92 / 18 %

Bei der 2. Reihe an Experimenten kamen anstatt Monozyten Endothelzellen zum Einsatz. Hier wurde im Gegensatz zu den Experimenten mit Monozyten eine Pool-Kontrolle verwendet, gegen welche die verschiedenen Bedingungen (EC + Normalplasma/RBC Tag1 (Exp. 10_3050050), EC + Normalplasma/RBC Tag21 (Exp. 11_3050051), EC + Normalplasma/RBC Tag42 (Exp. 12_3050052)) hybridisiert wurden. Sollte die Alterung der RBCs in diesem Zellsystem zu Änderungen in der Genexpression führen, so würde man ähnlich wie bei den Monozyten erwarten, dass sich mit zunehmender Lagerung diese Änderungen immer deutlicher manifestieren. Mit anderen Worten man würde erwarten, dass sich die beiden älteren Proben EC_03+EC_04 über ihr Gesamt-Genexpressionsprofil ähnlicher verhalten sollten, als die Probe EC_02. Für derartige Untersuchungen sind hierarchische Clusteranalysen geeignet.

Eine hierarchische Clusteranalyse ordnet Gene entsprechend ihrer Ähnlichkeit im Expressionsverhalten (vertikales Clustering) bzw. Versuchsbedingungen entsprechend der Vergleichbarkeit ihrer Regulierungsmuster (horizontales Clustering). Die in Abbildung 5 gezeigte Clusteranalyse (*Average Linkage Clustering*) von obig genannten drei Ansätzen berücksichtigt alle Gene, die in mindestens 60% der Experimente detektierbar gewesen sind (entspricht einer Auswahl von 914 aus 1070 Genen). Bei der graphischen Darstellung in Abb. 5 stellt jede Spalte ein Hybridisierungsexperiment dar, jede Zeile ein Gen. Überexprimierte Gene sind rot dargestellt, solche, die dort suprimiert vorliegen, grün. Eine schwarze Markierung deutet auf eine nicht differentielle Expression hin, eine graue auf eine nicht erfolgte Detektion des entsprechenden Gens. Gene, die ein verwandtes Expressionsmuster unter verschiedenen Bedingungen zeigen, liegen nahe benachbart im Dendrogramm, solche, die sich stark unterscheiden, befinden sich weiter voneinander entfernt.

Um zu untersuchen, ob die verwendeten Zellen oder die zugrundeliegenden Isolierungsmethoden charakteristische Regulierungsmuster zeigen, wurde zusätzlich horizontales Clustering durchgeführt. Wiederum hängt der Abstand zweier PIQOR™ Microarrays im Dendrogramm von der Ähnlichkeit der Expressionsmuster ab. Allgemein

soll jedoch an dieser Stelle angemerkt werden, dass prinzipiell die Unterschiede im Expressionsprofil (aufgrund der verschiedenen RBC-Lagerzeiten untereinander) gering ausgeprägt sind.

In Abbildung 5B ist der gelb umrahmte Bereich aus 5A vergrößert und mit Gennamen dargestellt.

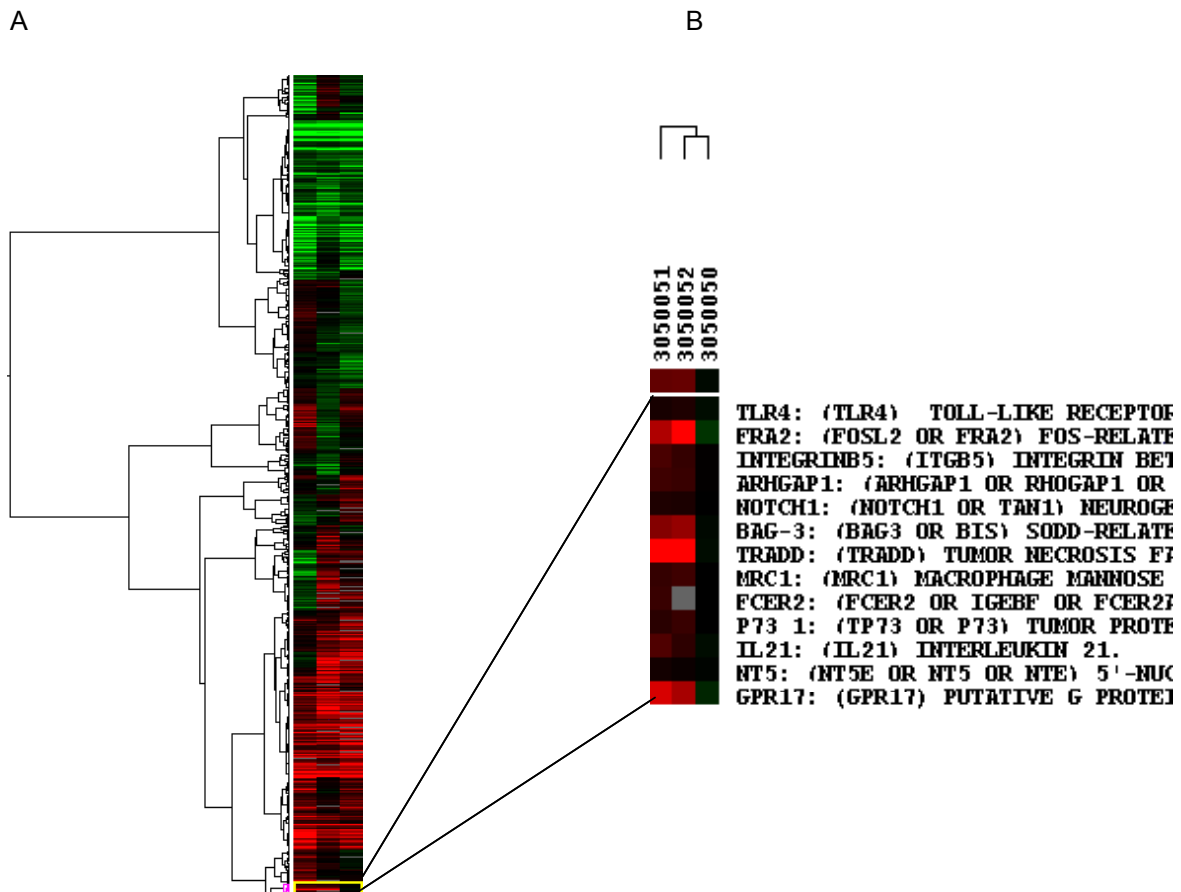


Abb. 5A: Clusteranalyse aller Gene, die in mindestens 60% aller Experimente detektierbar waren. Zwei Hauptcluster entstehen. Zwei Bereiche der Clusteranalyse sind gelb umrandet. Abb. 5B stellt eine Ausschnittvergrößerung aus dem gelb umrandeten Bereich von Abb. 5A dar. Vollständige Gennamen sind dem Anhang zu entnehmen.

Ähnliche Dendrogramme wurden in dieser Form auch wieder gefunden, wenn nur die Gene berücksichtigt wurden, die in 30% oder 100% der Experimente detektierbar waren. Es zeigt sich, dass unter allen Bedingungen eine größere Ähnlichkeit im Expressionsprofil zwischen Exp. 10_3050050 und Exp. 12_3050052 im Vergleich zu Exp. 11_3050051 besteht, erkennbar an den geringeren Abständen im Dendrogramm. Dies stellt einen weiteren Hinweis dafür dar, dass es keinen klaren, linearen Trend (1 Tag vs. 21 Tage vs. 42 Tage Lagerdauer) hin zu einer Veränderung einzelner Gene/Gengruppen gibt.

In Abb. 5B sind 3 Gene FRA2, TRADD und GPR17 aufgeführt, die sowohl nach 21 als auch nach 42 Tagen nicht aber nach einem Tag Lagerzeit induziert gefunden werden. Diese Gene stellen demzufolge mögliche Markergene für den Alterungsprozess dar. Es soll jedoch an dieser Stelle nochmals darauf hingewiesen werden, dass es sich nur um relativ geringfügige Induktionen (Größenordnung 2-fach reguliert) handelt. Um diese Genregulationen abzusichern, müssten die Ergebnisse durch biologische Wiederholungen bestätigt werden.

Um den Einfluß des Blutplasmas auf ECs zu untersuchen wurde wie folgt verfahren: Hier bestand nicht die Möglichkeit einen direkten Vergleich - analog zu M_1 vs. M_2 entsprechend hier also EC_1 vs. EC_2 - auf einem Microarray durchzuführen. Aufgrund der Verwendung einer gemeinsamen Pool-Kontrolle (Cy3) in den Exp. 9 und 10 (sowie allen anderen EC Experimenten) können dennoch gemäß folgender Formel die Genregulationen miteinander verglichen werden.

$$\frac{\left. \begin{array}{l} \text{EC}_1 \text{ (Cy5 SI_Gen x)} \\ \text{Pool_ (Cy3 SI_Gen x)} \end{array} \right\} \text{R1}}{\left. \begin{array}{l} \text{EC}_2 \text{ Cy5 SI_Gen x)} \\ \text{Pool_ (Cy3 SI_Gen x)} \end{array} \right\} \text{R2}} = \frac{\text{EC}_1 \text{ (Cy5 SI_Gen x)}}{\text{EC}_2 \text{ (Cy5 SI_Gen x)}} \text{R3}$$

R= Ratio; SI= Signalintensität

In Tab. 8 sind die am stärksten nach obiger Formel berechneten differentiell exprimierten Gene aufgeführt.

Tab. 8: >3 sowie <1/3-fache Regulationen aus Exp. 9 /Exp. 10

Gene name	Exp.9_3050049	Exp.10_3050050	Ratio 49/50
TNFC: (LTB OR TNFC OR TNFSF3) LYMPHOCYTES	0.1	0.89	0.11
GRO1_HUMAN: (CXCL1 OR SCYB1 OR GRO1) GRANULOCYTE	0.34	1.93	0.18
TNFRSF1B: (TNFRSF1B OR TNFR2 OR TNFR1) TUMOR	0.39	1.65	0.24
CCL2_HUMAN: (SCYA2 OR MCP1) SMALL CELL LUNG	0.17	0.56	0.30
PCNA: (PCNA) PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN	0.38	1.17	0.32
OPN: (SPP1 OR OPN) OSTEOPOINTIN RECEPTOR	1.88	0.6	3.13
GPR17: (GPR17) PUTATIVE G PROTEIN COUPLED	3.27	0.91	3.59

Interessanterweise wurden im Monozyten- sowie auch im Endothelzellkultursystem CCL2 als eines durch Normalplasma mit am stärksten responsivsten Gene gefunden.

II.8 Analyse des Einflusses unterschiedlicher Blutplasmen auf Monozyten oder Endothelzellkulturen in Gegenwart von Erythrozyten

Im Rahmen einer zweiten Experimentserie wurde der Frage nachgegangen, inwieweit sich unterschiedliche Spenderplasmen verschiedener Krankheitsbilder (bzw. Antikörperzusammensetzungen; siehe Tab. 1) sich auf die Genexpression der jeweiligen Monozyten (Exp. 4-8) oder Endothelzellen (Exp. 13-17) in der Gegenwart von Erythrozyten auswirken.

Für diesen Zweck wurde jeweils über alle 5 Experimente für jedes Gen die Varianz ermittelt. Gene, die sich aufgrund unterschiedlicher Plasmabehandlungen stark unterscheiden, sollten eine höhere Varianz aufweisen. Dabei wurden Fehlstellen als 0 gewertet, weil ansonsten Gene mit wenigen Messwerten dazu tendieren, höhere Varianzen zu zeigen. Daher erscheinen die Gene am zuverlässigsten, welche in allen Experimenten Werte aufweisen. Damit es bei der Varianzbildung zu keiner Verzerrung bei reprimierten Genen im Vergleich zu induzierten Genen kommt, wurden alle Ratio Werte zur Basis 2 logarithmiert (Beispiel: ein Ratio von 0.5 entspricht nach Logarithmierung -1 ; Analog ist der Betrag eines Ratios von 2 nach Logarithmierung 1).

Experimente mit Monozyten:

Im folgenden sind nun die Top 20 Gene aufgeführt, welche die größten Varianzen innerhalb der Exp. 4-8 (entspricht 3050044 – 3050048), 5-8, 6-8 bzw. Ratiounterschiede zwischen 7 vs. 8 aufweisen. Rote Zellen weisen auf die Induktion eines Genes hin, grüne entsprechend auf die Repression eines Genes jeweils im Vergleich zur Kontrolle.

Tab. 9: Top 20 varianzselektierte Gene der Experimente 4-8

GeneID	NAME	3050044	3050045	3050046	3050047	3050048	Varianz 44-48
328	IL1R2	-1.29	1.51	2.41	-1.47	1.00	2.39
25947	IFITM1_HUMAN	-2.18	0.60		1.41		1.42
4487	CCL20	1.98	2.20	3.36	0.49	0.25	1.33
518	CD3D	-1.60	0.34	-1.18	0.82	-2.18	1.33
249	TNFC	-1.51	-0.32	-1.84	1.14	-1.69	1.27
391	CD52	-2.18	-2.40	-4.06	-0.92	-1.36	1.17
444	CD86	-0.32	-0.97	-2.84	-0.94	0.19	1.05
3593	HSPA6-HSPA7	0.58	-0.23	0.92	1.06	-1.69	1.02
2195	PLCG2	-1.03	-1.64	-2.84	-0.47		0.97
1935	LCK	-1.40	0.29	-0.81	1.29	-1.00	0.96
2560	MMP18	-1.00	0.54	0.71	-1.64	-1.32	0.95
2517	OPN	0.08	-1.43	-2.25	-0.51	0.31	0.92
573	CD9	-0.51	-2.12	-2.47	-0.64	-0.06	0.91
2108	INHBA	1.04	-1.84	-1.00	-0.60	-0.17	0.90
1928	ITK		0.99		2.35		0.85
1244	NBS1	1.26	-0.45	2.07		0.28	0.83
11704	CD44_EX13-15_HU	-0.54	-2.32	-1.64	-1.00	0.33	0.83
2011	CCR1	-1.47	-2.00	-2.40	-2.18	0.11	0.82
12106	SLAM	-1.84	-0.23	0.93	-0.42		0.79
12713	CD44_EX9-11_HUN	-0.15	-2.32	-1.43	-0.79	0.12	0.79

Tab. 10: Top 20 varianzselektierte Gene der Experimente 5-8

GeneID	NAME	3050045	3050046	3050047	3050048	Varianz 45-48
328	IL1R2	1.51	2.41	-1.47	1.00	2.07
4487	CCL20	2.20	3.36	0.49	0.25	1.63
391	CD52	-2.40	-4.06	-0.92	-1.36	1.46
249	TNFC	-0.32	-1.84	1.14	-1.69	1.45
518	CD3D	0.34	-1.18	0.82	-2.18	1.44
3593	HSPA6-HSPA	-0.23	0.92	1.06	-1.69	1.22
2195	PLCG2	-1.64	-2.84	-0.47		1.21
444	CD86	-0.97	-2.84	-0.94	0.19	1.18
2560	MMP18	0.54	0.71	-1.64	-1.32	1.13
2011	CCR1	-2.00	-2.40	-2.18	0.11	1.02
573	CD9	-2.12	-2.47	-0.64	-0.06	1.00
11704	CD44_EX13-1	-2.32	-1.64	-1.00	0.33	0.96
1928	ITK	0.99		2.35		0.93
2517	OPN	-1.43	-2.25	-0.51	0.31	0.93
1244	NBS1	-0.45	2.07		0.28	0.92
501	PECAM1	-2.18		-1.18	0.06	0.86
1935	LCK	0.29	-0.81	1.29	-1.00	0.85
540	CD45_EX29-3	-1.25	-2.47	0.10	-0.94	0.84
5514	LKHA	-1.89	-2.25	-0.20	-0.34	0.83

Tab. 11: Top 20 varianzselektierte Gene der Experimente 6-8

GeneID	NAME	3050046	3050047	3050048	Varianz 46-48
328	IL1R2	2.41	-1.47	1.00	2.57
4487	CCL20	3.36	0.49	0.25	2.00
391	CD52	-4.06	-0.92	-1.36	1.93
249	TNFC	-1.84	1.14	-1.69	1.87
3593	HSPA6-HSPA	0.92	1.06	-1.69	1.60
518	CD3D	-1.18	0.82	-2.18	1.56
444	CD86	-2.84	-0.94	0.19	1.56
2195	PLCG2	-2.84	-0.47		1.54
2011	CCR1	-2.40	-2.18	0.11	1.29
1928	ITK		2.35		1.23
2517	OPN	-2.25	-0.51	0.31	1.14
540	CD45_EX29-3	-2.47	0.10	-0.94	1.12
2560	MMP18	0.71	-1.64	-1.32	1.09
475	ITGB2	-3.06	-1.09	-0.67	1.09
1935	LCK	-0.81	1.29	-1.00	1.07
573	CD9	-2.47	-0.64	-0.06	1.06
418	CD69	-1.03	0.83	-1.56	1.05
4257	TCF4	-2.12			1.00
3580	HSP105	0.97	0.28	-1.36	0.95
2340	PAI2	1.20	-1.00	-0.51	0.89

Beim Vergleich der Ratios zweier Experimente können direkt die beiden Ratio-Werte gemäß der Formel auf S. 21 berechnet werden (keine Varianzbestimmung!). Exemplarisch ist dies für die beiden Exp. 7 und 8 in Tab. 12 dargestellt. In der letzten Spalte sind die Ratios der am stärksten reguliert gefundenen Gene dargestellt.

Tab. 12: >3 sowie <1/3-fache Regulationen aus Exp. 7_3050047 /Exp. 8_3050048.

GeneID	NAME	3050047	3050048	Ratio 47/48
518	CD3D	1.77	0.22	8.05
249	TNFC	2.2	0.31	7.10
3593	HSPA6-HSPA	2.08	0.31	6.71
418	CD69	1.78	0.34	5.24
1935	LCK	2.44	0.5	4.88
405	SELL	2	0.6	3.33
3580	HSP105	1.21	0.39	3.10
4715	SERPINH1-S	1.49	0.49	3.04
664	C3AR1	0.34	1.11	0.31
2011	CCR1	0.22	1.08	0.20
328	IL1R2	0.36	2	0.18

Zusammenfassend lässt sich für die Experimente mit Monozyten feststellen, dass sich einige Gene identifizieren lassen, die nur unter bestimmten Bedingungen induziert bzw. reprimiert gefunden werden. So findet man beispielsweise IL1R2 (CD121) nur bei Exp. 4 und 7 reprimiert, bei den Exp. 5, 6 und 8 jedoch induziert. CCL20 dagegen stellt ein Chemokin dar, dass offensichtlich nur in den Exp. 4, 5 und 6 sehr deutlich induziert gefunden wird, nicht aber in den Exp. 7 und 8 bei denen jeweils IVIgGs bzw. IVIgMs appliziert wurden. Auf diese Weise lassen sich für die individuellen Behandlungen einige weitere potentielle Markergene ableiten.

Experimente mit Endothelzellen:

Im folgenden sind nun die Top 20 Gene aufgeführt, welche die größten Varianzen zwischen den Exp. 13-17 (entspricht 3050053 – 3050057), 14-17, 15-17 bzw. Ratiounterschiede zwischen 16 vs. 17 aufweisen.

Tab. 13: Top 20 varianzselektierte Gene der Experimente 13-17

GeneID	NAME	3050053	3050054	3050055	3050056	3050057	Varianz 53-57
4707	GM-CSF	-4.06	-3.64	1.43	-3.32	-3.32	4.10
403	SELE	-3.32	-2.40	1.93	-2.18	-3.64	4.01
249	TNFC	-2.00	-1.56	1.43	-1.94	-3.84	2.89
4487	CCL20	-2.74	-2.84	1.45	-2.40	-2.74	2.75
18	IL8_HUMAN	-2.40	-2.06	1.20	-2.56	-2.84	2.21
2487	MMP10	-1.40	-1.79	0.77	-2.94	-3.47	2.18
2559	MMP17	-0.17	0.26	-2.56	1.88	0.34	2.06
7529	BNIP3L	-1.64	1.59	-0.45	-2.18	-2.06	1.99
2338	PAI1	0.11	-0.01	1.57	-1.79	-2.18	1.87
4467	CCL2_HUMA	-1.89	-1.00	1.33	-1.51	-2.74	1.87
6216	SOD2	-2.32	-2.12	1.14	-2.18	-2.40	1.85
169	PCNA	-1.79	0.15	-2.84	-0.14	0.58	1.68
332	IL3RA	-0.03	-1.09	1.64	-1.69	-1.69	1.59
563	ICAM1	-1.74	-0.94	1.48	-1.03	-1.51	1.33
4257	TCF4	-0.89	0.53	-2.47	0.69	-0.40	1.30
3593	HSPA6-HSPA	-0.76	-0.07	0.36	0.77	-2.47	1.30
2098	AC15	-1.06	0.11	-2.64	-0.17	0.48	1.24
2561	MMP1_HUMA	-0.29	-0.69	1.29	-1.60	-1.79	1.21
2477	MAGP1	-0.27	0.15	-2.00	1.20	0.38	1.12
99	TRAIL	-0.71	-0.23	-2.25	0.87	0.00	1.06

Tab. 14: Top 20 varianzselektierte Gene der Experimente 14-17

NAME	3050054	3050055	3050056	3050057	Varianz 54-57
GM-CSF	-3.64	1.43	-3.32	-3.32	4.44
SELE	-2.40	1.93	-2.18	-3.64	4.40
TNFC	-1.56	1.43	-1.94	-3.84	3.56
CCL20	-2.84	1.45	-2.40	-2.74	3.19
MMP10	-1.79	0.77	-2.94	-3.47	2.68
IL8_HUMAN	-2.06	1.20	-2.56	-2.84	2.62
MMP17	0.26	-2.56	1.88	0.34	2.57
BNIP3L	1.59	-0.45	-2.18	-2.06	2.33
PAI1	-0.01	1.57	-1.79	-2.18	2.24
CCL2_HUMA	-1.00	1.33	-1.51	-2.74	2.17
SOD2	-2.12	1.14	-2.18	-2.40	2.14
IL3RA	-1.09	1.64	-1.69	-1.69	1.90
PCNA	0.15	-2.84	-0.14	0.58	1.79
HSPA6-HSPA	-0.07	0.36	0.77	-2.47	1.59
TCF4	0.53	-2.47	0.69	-0.40	1.58
AC15	0.11	-2.64	-0.17	0.48	1.50
MMP1_HUMA	-0.69	1.29	-1.60	-1.79	1.48
MAGP1	0.15	-2.00	1.20	0.38	1.40
ICAM1	-0.94	1.48	-1.03	-1.51	1.36
TRAIL	-0.23	-2.25	0.87	0.00	1.31

Tab.15: Top 20 varianzselektierte Gene der Experimente 15-17

GeneID	NAME	3050055	3050056	3050057	Varianz 55-57
403	SELE	1.93	-2.18	-3.64	5.56
4707	GM-CSF	1.43	-3.32	-3.32	5.01
249	TNFC	1.43	-1.94	-3.84	4.74
4487	CCL20	1.45	-2.40	-2.74	3.60
2487	MMP10	0.77	-2.94	-3.47	3.57
18	IL8_HUMAN	1.20	-2.56	-2.84	3.39
2559	MMP17	-2.56	1.88	0.34	3.39
4467	CCL2_HUMA	1.33	-1.51	-2.74	2.90
2338	PAI1	1.57	-1.79	-2.18	2.83
6216	SOD2	1.14	-2.18	-2.40	2.62
332	IL3RA	1.64	-1.69	-1.69	2.47
169	PCNA	-2.84	-0.14	0.58	2.17
3593	HSPA6-HSP	0.36	0.77	-2.47	2.08
2561	MMP1_HUMA	1.29	-1.60	-1.79	1.98
2477	MAGP1	-2.00	1.20	0.38	1.84
2098	AC15	-2.64	-0.17	0.48	1.81
99	TRAIL	-2.25	0.87	0.00	1.73
563	ICAM1	1.48	-1.03	-1.51	1.72
4257	TCF4	-2.47	0.69	-0.40	1.72
2185	LAP18	-2.18	0.71	0.32	1.65

Tab.16: Top 20 Gene der Experimente 16 vs. 17, die zwischen den beiden Versuchen am deutlichsten differentiell reguliert vorliegen. Es sei hier nochmals darauf hingewiesen, dass bei den Direktvergleichen analog zu Tab. 12 verfahren wurde.

Tab. 16: >3 sowie <1/3-fache Regulationen aus Exp. 16_3050056 /Exp. 17_3050057.

GeneID	NAME	3050056	3050057	Ratio 56/57
3593	HSPA6-HSP	1.71	0.18	9.50
249	TNFC	0.26	0.07	3.71
17692	SERPINB1	2.3	0.77	2.99
2559	MMP17	3.69	1.27	2.91
1978	SOS1	0.44	1.53	0.29

Im Rahmen der Endothelzellexperimente zeigt sich, dass insbesondere bei Exp. 15 (Behandlung mit Kälteantikörper-haltigem Plasma) für eine Reihe von Genen eine sehr unterschiedliche Regulation im Vergleich zu den anderen 4 Plasmabehandlungen erkennbar ist. Da die aRNA dieser Probe auch Teil des Referenz-Pools ist, heben sich hier die Unterschiede zwischen den Experimenten 13, 14, 16 und 17 deutlich geringer voneinander ab als dies bei einer Varianzanalyse in den Tab. 11-13 zu erkennen ist. Hier zeigen zum Großteil diejenigen Gene eine hohe Varianz, die sich durch große Unterschiede von Exp. 15 vs. der anderen Experimente auszeichnen.

Es lassen sich aber neben einigen in Exp. 15 sehr stark exprimierten Genen wie beispielsweise GM-CSF, TNFC, SELE, CCL2_HUMAN, CCL20, MMP10 auch für andere Experimente Gene identifizieren, die für diese Behandlung möglicherweise charakteristisch sind. So finden sich beispielsweise für Exp. 14 (WAIHA) die Gene BNIP3L (BCL2/ADENOVIRUS E1B 19-KDA PROTEIN INTERACTING PROTEIN 3A) sowie ein weiteres verwandtes aber nicht kreuzhybridisierendes Gen BNIP3 (BCL2/ADENOVIRUS E1B 19-KDA PROTEIN-INTERACTING PROTEIN 3) welche - neben anderen (z.B. CXCL4) - ausschließlich dort deutlich induziert gefunden werden und demzufolge ebenso mögliche Markergene darstellen. Ein potentielles Markergen für Exp. 16 (IVIgG) stellt MMP17 dar, welches ausschließlich dort induziert gefunden wurde.

III Zusammenfassung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass die hier eingesetzten Zellkultursysteme und die verwendete Konfiguration des PIQORTM Immunology Microarrays geeignet ist, um Kandidatengene zu ermitteln, die die verschiedenen Behandlungen voneinander unterscheiden können. Es hat sich aber auch gezeigt, dass die Alterung der RBCs in den verwendeten *in vitro* Systemen nur sehr schwer nachweisbar ist oder alternativ tatsächlich nur zu sehr geringen, nicht messbaren Veränderungen der RBCs bzw. den damit co-inkubierten Zellen führt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Experimentserie für die unterschiedlichen Plasmen eine Reihe von interessanten Genregulationen erkennen läßt. Es soll an dieser Stelle jedoch nochmals ausdrücklich darauf hingewiesen werden, dass jedes Experiment für sich gestellt ein Einzelexperiment darstellt. Erst eine biologische Wiederholung der Experimente mit einem neuen „Batch“ an Monozyten bzw. Endothelzellen wird darüber Aufschluß geben können, inwieweit die hier gefundenen Gene tatsächlich Markergene darstellen, oder ob dies möglicherweise auch zu einem Großteil spenderabhängige Phänomene sind.

Für eine tiefergehende Analyse der durchgeführten Experimente sowie die Planung weiterer Projekte steht Memorec gerne als Ansprechpartner zur Verfügung.

IV Methoden

(Auszüge aus dem PIQOR™ Microarray-Hybridisierungsprotokoll in englischer Sprache)

IV.1 mRNA amplification protocol

IV.1.1 First strand synthesis

1. Combine the following in a 1.5 ml RNase free microcentrifuge tube:
 - 4 μ l 5 x First Strand Buffer (Gibco)
 - 2 μ l 0.1 M DTT (Gibco)
 - 1 μ l 100 μ M T7-(T)24 primer
 - 1 μ l 10 mM dNTPs
2. Add 10 μ l total RNA (we recommend using 2 μ g total RNA as starting material for amplification)
3. Mix (quick spin if needed)
4. Incubate at 65 °C for 5 min
5. Place the tube at 42 °C for 2 min
6. Add 2 μ l SSII RT (400 U) (Gibco)
MAKE SURE enzyme is well mixed into the reaction
7. Incubate at 42 °C for 1 hour and put on ice

IV.1.2 Second strand synthesis

1. Ice all reagents and 1st strand tubes
2. Add to 1st strand tubes:
 - 91.3 μ l DEPC H₂O
 - 30 μ l 5 x Second Strand Buffer (Gibco)
 - 4 μ l DNA Polymerase I (40 U) (Gibco)
 - 3 μ l 10 mM dNTPs
 - 1 μ l *E.coli* DNA Ligase (10 U) (Gibco)
 - 0.7 μ l RNase H (2 U) (Gibco)
3. Mix (quick spin)
4. Incubate at 16 °C for 2 hours
5. Optionally: store at -20 °C

IV.1.3 Clean-up of ds-cDNA

(see QIAquick® Spin Handbook)

1. Add 750 μ l of Buffer PB to 2nd strand tube
2. Place a QIAquick spin column in a 2 ml collection tube
3. Apply the sample to the QIAquick column
4. Centrifuge for 1 min
5. Discard flow through and place the QIAquick column back into the same tube
6. Add 0.75 ml Buffer PE to the QIAquick column
7. Centrifuge for 1 min
8. Discard flow through and place the QIAquick column back into the same tube
9. Centrifuge for an additional 1 min at maximum speed
10. Place QIAquick Spin column in a clean 1.5-ml tube
11. To elute ds-cDNA, add 30 μ l RNase-free H₂O to the center of the QIAquick membrane
12. Incubate 1 min at RT
13. Centrifuge at maximum speed for 1 min
14. Concentrate to 8 μ l

IV.1.4 aRNA synthesis: T7 *in vitro* transcription

1. Thaw and room temperature all reagents (Ambion)

Note: Spermidine in the transcription buffer can lead to precipitation of the template DNA if the reaction is assembled on ice.

2. Make NTP mix (per tube):
 - 2 μ l ATP solution (75 mM)
 - 2 μ l GTP solution (75 mM)
 - 2 μ l CTP solution (75 mM)
 - 2 μ l UTP solution (75 mM)
 - 2 μ l 10 x Reaction Buffer
3. Add to cleaned ds-cDNA tube:
 - 10 μ l NTP mix
 - 2 μ l Enzyme mix (Ambion)
4. Mix gently (spin down)
5. Incubate at 37 °C for 6 hours

Note: Incubate IVT tubes in a constant-temperature water bath or a thermocycler with a heating lid (0.2-ml tube).

IV.1.5 *In Vitro* Transcription Clean-up

(see RNeasy[®] Mini Handbook)

1. Mix into IVT reaction tube:
 - 80 μ l RNase-free H₂O
 - 350 μ l RLT buffer

2. Add 250 µl 100% EtOH
3. Transfer sample to RNeasy spin column
4. Spin for 15 sec at maximum speed
5. Transfer spin column to new collection tube
6. Add 500 µl RPE buffer
7. Spin for 15 sec at maximum speed
8. Transfer spin column to new collection tube
9. Add 500 µl RPE buffer
10. Spin for 2 min at maximum speed
11. Transfer spin column to new collection tube
12. Add 50 µl RNase-free H₂O to membrane of spin column
13. Incubate for 4 min
14. Spin for 1 min at maximum speed
15. Repeat 13-15 using 1st elution as the 2nd elution
16. Take OD (1:50 dilution)
17. Optionally: Store at –20 °C

IV.2 Labelling reaction

1. Combine the following in a 1.5 ml RNase-free microcentrifuge tube:
 - 8 µl 5 x First Strand Buffer
 - 2 µl 10x Hexanucleotide Mix (Roche Diagnostics)
 - 2 µl "low C dNTP" (10 mM dATP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP, 4 mM dCTP)
 - 2 µl FluoroLink™ Cy3/5-dCTP
 - 4 µl 0.1 M DTT
 - 1 µl RNasin (40 U)
2. Add 15 µl of your aRNA (1 µg) and 2 µl each of control RNA 1 and 2
3. Vortex, quick spin
4. Incubate at 65°C for 5 min, bring to 42 °C
5. Add 1 µl (200 u) of SSII enzyme

MAKE SURE enzyme is well mixed into the reaction
6. Incubate at 42°C for 30 min
7. Add 2 µl of SSII enzyme

MAKE SURE enzyme is well mixed into the reaction
8. Incubate at 42°C for 30 min
9. Add 0.5 µl of RNase H
10. Incubate at 37°C for 20 min to hydrolyze RNA

IV.3 Sample clean-up

(see QIAquick® Spin Handbook)

1. Combine Cy3- and Cy5-labelled samples and add 400 µl Buffer PB.
2. Place a QIAquick spin column in a 2 ml collection tube.
3. Apply the sample to the QIAquick column and centrifuge for 30-60 sec.
4. Discard flow-through. Place the QIAquick column back into the same tube.
5. To wash, add 0.75 ml Buffer PE to the QIAquick column and centrifuge for 30-60 sec.
6. Discard flow-through and place the QIAquick column back into the same tube. Centrifuge the column for an additional 1 min at maximum speed.
7. Place QIAquick column in a clean 1.5 ml microfuge tube.
8. To elute DNA, add 30 µl H₂O pH 8 to the centre of the QIAquick membrane, let the column stand for 1 min, and then centrifuge for 1 min.
9. Concentrate in a SpeedVac at 45 °C until volume is ≤ 10µl.
Take care not to dry the sample.
10. Add 10 µl 2 x Hybridization Solution, pre-warmed to 42 °C.
11. Store sample at room temperature in the dark until pre-hybridization is finished.

IV.4 PIQOR™ Microarray Pre-treatment

1. Heat PIQOR™ Microarray at 98 °C in distilled water for 2 min
2. Transfer PIQOR™ Microarray into 96% Ethanol
3. Dry by centrifugation at 500 x g for 3 min
4. Place in a dust free cassette

IV.5 Pre-Hybridization

1. Heat PIQOR™ pre-hybridization solution at 98°C for 2 min, quick spin and cool to 42°C
2. Place PIQOR™ Microarray on the Pattern Slide
3. Apply 20 µl of PIQOR™ pre-hybridization solution to outlined rectangle of PIQOR™ Microarray
4. Place cover slip onto the PIQOR™ Microarray
5. Insert into humidified hybridization cassette (e. g. PIQOR™-HybChamb), seal hybridization cassette and incubate at 62°C for at least 30 min

IV.6 Hybridization

1. Cool hybridization cassette to 25 °C
2. Place the PIQOR™ Microarray on the Pattern Slide
3. Carefully remove cover slip from PIQOR™-Array
4. Apply 20 µl of labeled probe to outlined rectangle of PIQOR™ Microarray
5. Place cover slip onto the PIQOR™ Microarray (do not reuse cover slip of prehybrdization)
6. Insert into humidified hybridization cassette and incubate at 62°C for at least 6 h

IV.7 Washing

1. Remove PIQOR™ Microarray from hybridization cassette (do not let cool down!) and place immediately into wash tray filled with 1 x Wash Buffer 1 for 5 min (room temperature 20 –30 °C)
2. Repeat wash step with fresh 1 x Wash Buffer 1
3. Repeat wash step with 1 x Wash Buffer 2
4. Dry by centrifugation at 500 x g for 3 min
5. Place into a dust-free cassette

V Anhang

Tabelle A1: Belegungsliste der PIQOR™ Microarray

Tabelle A2: Signalquotienten aller cDNAs (Exp. 1-8)

Tabelle A3: Signalquotienten aller cDNAs (Exp.9-17)