

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

Untersuchung zum Einfluss von HLA-Antikörpern
auf die Integrität und Funktion hämatopoetischer Stammzellen in
Stammzelltransplantaten

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Catrin Surholt
aus Münster

2008

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Volker Arolt

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 07.05.2008

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

Referent: Univ.-Prof. Dr. Dr. W. Sibrowski
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. J. Kienast

ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchung zum Einfluss von HLA-Antikörpern auf die Integrität und Funktion hämatopoetischer Stammzellen in Stammzelltransplantaten

Catrin Surholt

Bei nicht vollständig HLA-kompatiblen Stammzelltransplantationen können schwerwiegende Komplikationen wie die Graft-versus-Host-Krankheit oder die Transplantatabstoßung auftreten. Auch von verschiedenen Blutgruppenantikörpern wurde berichtet, dass sie einen Einfluss auf das „Engraftment“ nach allogener Stammzelltransplantation haben. In dieser Studie soll der Einfluss von spezifischen HLA-Antikörpern auf die Integrität und Funktion hämatopoetischer Stammzellen in vitro untersucht werden.

In verschiedenen Versuchen wurden mit HLA-Antikörpern sensibilisierte Stammzellen mit nicht HLA-Antikörper-sensibilisierten Stammzellen verglichen. Dazu wurden in durchflusszytometrischen Crossmatch-Versuchen die HLA-Antikörper auf den Stammzellen nachgewiesen, und in Klonogenitätsassays wurde das Wachstum der Stammzellen vergleichend untersucht. In durchflusszytometrischen Apoptose-Versuchen wurde das Apoptoseverhalten und in Phagozytose-Versuchen durchflusszytometrisch das Phagozytoseverhalten der beiden Stammzellgruppen miteinander verglichen. Mit Versuchen am Optischen Biosensorsystem „IASys“ wurde die Endothelaffinität von HLA-Antikörper-sensibilisierten Stammzellen mit nicht HLA-Antikörper-sensibilisierten Stammzellen verglichen.

Im Crossmatch konnten die HLA-Antikörper auf den Stammzellen nachgewiesen werden. Der Grad der Apoptose der HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen war nach 24 und 36 Stunden signifikant höher als die Apoptoserate der nicht HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen. Die Klonogenität der HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen war vermindert und die Phagozytoserate der HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen erhöht, eine Signifikanz ließ sich in beiden Versuchen jedoch nicht nachweisen. In der Endothelaffinität konnte kein Unterschied nachgewiesen werden.

Die Integrität und Funktion hämatopoetischer Stammzellen werden in vitro durch HLA-Antikörper beeinflusst. Dies zeigt sich in der erhöhten Apoptoserate HLA-AK-sensibilisierter Stammzellen. Auch die erhöhte Phagozytoserate sowie die verminderte Klonogenität HLA-AK-sensibilisierter Stammzellen könnten durch spezifische HLA-Antikörper bedingt sein. Dieser Zusammenhang muss allerdings in Studien mit höheren Fallzahlen überprüft werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 07.05.2008

INHALTSVERZEICHNIS

1.	<u>Einleitung</u>	1
1.1	Stammzelltransplantation (SZT)	1
1.1.1	Einführung	1
1.1.2	Vergleich von hämatopoetischer SZT und Knochenmarktransplantation	1
1.2	Die Rolle der HLA-Moleküle in der SZT	2
1.3	Das HLA-System	3
1.3.1	Aufbau der HLA-Moleküle	3
1.3.2	Funktion der HLA-Moleküle	4
1.4	Transplantationsreaktionen	6
1.4.1	Abstoßungsreaktionen	6
1.4.1.1	Hyperakute Abstoßung	6
1.4.1.2	Akute Abstoßung	7
1.4.1.3	Chronische Abstoßung	7
1.4.2	Graft-versus-Host-Disease (GvHD)	7
1.4.3	Host-versus-Graft-Reaktion (HvG)	8
1.5	Die Rolle verschiedener Blutgruppenantikörper bei der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation	8
1.6	Die Rolle von präformierten HLA-Antikörpern im Empfängerorganismus	10
2.	<u>Fragestellung</u>	12
3.	<u>Material und Methoden</u>	13
3.1	Materialien	13
3.1.1	Geräte	13
3.1.2	Verbrauchsmaterial	13
3.1.3	Reagenzien	14
3.2	Patientenkollektiv	16

3.3	Labortechniken	16
3.3.1	Zellzählung	16
3.3.2	Grundlage der durchflusszytometrischen Diagnostik	16
3.3.3	Durchflusszytometrische Bestimmung der CD34-exprimierenden Zellen	17
3.3.4	Dichtegradientenzentrifugation	17
3.3.5	Crossmatch	19
3.3.6	Apoptose	22
3.3.7	Phagozytose	25
3.3.8	Klonogenitätsassays	30
3.3.9	Zellkultur	31
3.3.10	Optischer Biosensor IAsys	31
3.3.11	Statistik	35
4.	<u>Ergebnisse</u>	36
4.1	Bindung von HLA-Antikörpern an Stammzellen – „Crossmatch“	36
4.2	Klonogenität von Stammzellen	40
4.3	Apoptotisches Verhalten von Stammzellen	42
4.4	Phagozytoseverhalten von Stammzellen	48
4.5	Verhalten der Stammzellen im optischen Biosensorsystem	53
5.	<u>Diskussion</u>	56
5.1	Bindung von HLA-Antikörpern an Stammzellen – „Crossmatch“	57
5.2	Klonogenität von Stammzellen	58
5.3	Apoptotisches Verhalten von Stammzellen	59
5.4	Phagozytoseverhalten von Stammzellen	60
5.5	Verhalten der Stammzellen im optischen Biosensorsystem	61
5.6	Zusammenfassung aller Ergebnisse und Vergleich mit Daten aus der Literatur	62
6.	<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	68

7.	<u>Abbildungsverzeichnis</u>	69
8.	<u>Tabellenverzeichnis</u>	70
9.	<u>Literatur</u>	71
10.	<u>Danksagung</u>	85
11.	<u>Lebenslauf</u>	86

1. Einleitung

1.1 Stammzelltransplantation (SZT)

1.1.1 Einführung

Die Übertragung hämatopoetischer Stammzellen ist ein etabliertes Therapieverfahren in der Behandlung hämatologisch-onkologischer Erkrankungen.

Die Stammzelltransplantation kann zum einen mit autologen und zum anderen mit allogenen Stammzellen bei entsprechender Indikation erfolgen. Bei der autologen SZT werden nach einer Hochdosis-Chemotherapie zuvor gewonnene und kryokonservierte eigene Stammzellen transplantiert. Bei der allogenen SZT handelt es sich um die Übertragung möglichst HLA-identischer Stammzellen von Geschwistern oder auch von Fremd Spendern [75]. Unter bestimmten Kriterien werden auch HLA-differente Stammzellen, zum Beispiel HLA-haploidente Stammzellen, transplantiert. Der Erfolg der Transplantation wird hierbei jedoch stark vom Grad der HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger beeinflusst [72].

Zur allogenen hämatopoetischen SZT werden Stammzellen aus peripherem Blut von gesunden Spendern nach Stimulation mit G-CSF gewonnen und dem Empfänger i.v. appliziert.

Die allogene hämatopoetische SZT ist eine potentiell kurative Therapie für eine Reihe von lebensbedrohlichen hämatologischen Krankheiten. Zu diesen zählen unter anderem die akute und chronische Leukämie, die schwere aplastische Anämie und progressive myelodysplastische Syndrome [51].

1.1.2 Vergleich von hämatopoetischer SZT und Knochenmarktransplantation

Im Vergleich der allogenen hämatopoetischen SZT zur allogenen Knochenmarktransplantation fallen in verschiedenen früheren Studien bei der hämatopoetischen SZT ein schnelleres Engraftment und weniger benötigte Transfusionen nach der Transplantation auf. Die Inzidenz an akuter oder chronischer Graft-versus-Host-Disease war in diesen Studien geringer [9, 37]. Andere Studien

zeigen jedoch, dass entweder nur chronische oder akute wie auch chronische GvHD nach hämatopoetischer SZT häufiger auftreten als nach Knochenmarktransplantation [19]. Das Auftreten und der Schweregrad einer GvHD nach SZT sind insbesondere abhängig von dem Mismatch-Grad zwischen Spender und Empfänger, der GvHD-Prophylaxe durch Immunsuppression, der zugrunde liegenden Krankheit und der Aktivität von reifen immunkompetenten T-Zellen im Transplantat [74]. Im Vergleich zu Knochenmarktransplantaten enthalten Blutstammzelltransplantate eine erhöhte Zahl an T-Zellen, die unter anderem für die erhöhte Rate an GvHD verantwortlich gemacht wird [19].

1.2 Die Rolle der HLA-Moleküle in der Entwicklung der SZT

Die heutige Knochenmark- und Stammzelltransplantation hat sich über einen Zeitraum von mehr als 50 Jahren entwickelt. Die Studien über das HLA-System von Dausset und van Rood [20, 89, 91] spielten eine große Rolle für die Entwicklung der Knochenmarktransplantation und für das Verständnis der Mechanismen von Abstoßungsreaktionen. Diese konnten trotzdem in den sechziger Jahren zunächst nicht beherrscht werden [13], so dass nur Transplantationen zwischen eineiigen Zwillingen erfolgreich waren. In dieser Zeit wurde das HLA-System intensiver erforscht, damals hauptsächlich wegen seiner großen Bedeutung für Nierentransplantationen.

Seit Ende der sechziger Jahre wurde es durch wachsende Kenntnisse über das HLA-System, wie die Einführung der HLA-Typisierung, möglich, HLA-kompatible Familienmitglieder als Spender auszuwählen. Somit konnten Patienten auf lange Zeit von ansonsten tödlichen Krankheiten geheilt werden [89].

Seit den neunziger Jahren ist es durch weitere Fortschritte der Forschung möglich, durch molekulargenetische HLA-Typisierung passende Spender noch genauer zu bestimmen und damit das Risiko für Transplantationsreaktionen weiter zu minimieren [6].

1.3 Das HLA-System

1.3.1 Aufbau der HLA-Moleküle

Auf den kernhaltigen Zellen des menschlichen Organismus befinden sich verschiedene Oberflächenrezeptoren, darunter auch die HLA-Antigene (human leucocyte antigen). Diese Antigene bilden ein für jeden Menschen individuelles Muster an Oberflächenmolekülen. Dieses ist primär für die Erkennung prozessierter Antigene und damit auch für die Abstoßung genetisch unterschiedlicher Gewebe verantwortlich. Es gibt zwei unterschiedliche Klassen von HLA-Molekülen: Die HLA-Klasse-I- und die HLA-Klasse-II-Moleküle. Sie werden zum Teil auf unterschiedlichen Geweben exprimiert. Die HLA-Antigene werden von einer Gruppe von Genen kodiert, die sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 befindet und als Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) bekannt ist [43].

Die Klasse-I-HLA-Moleküle bestehen aus einer schweren α -Kette von ungefähr 43 kDa, die nicht-kovalent mit einer leichten, nicht polymorphen β 2-Mikroglobulin (μ)-Kette verbunden ist (Abb. 1). Die leichte Kette wird auf Chromosom 15 kodiert und hat 12 kDa. Der extrazelluläre Teil der α -Kette besteht aus 90 Aminosäuren, welche die drei Domänen α 1, α 2 und α 3 bilden. Die Domänen α 1 und α 2 bilden dabei die peptidbindende Region der HLA-Moleküle. Diese Region kann Moleküle einer Größe von acht bis neun Aminosäuren Länge fassen. Sie ist die Region des Moleküls mit dem höchsten Polymorphismus und wird somit als hypervariable Region bezeichnet [43, 61].

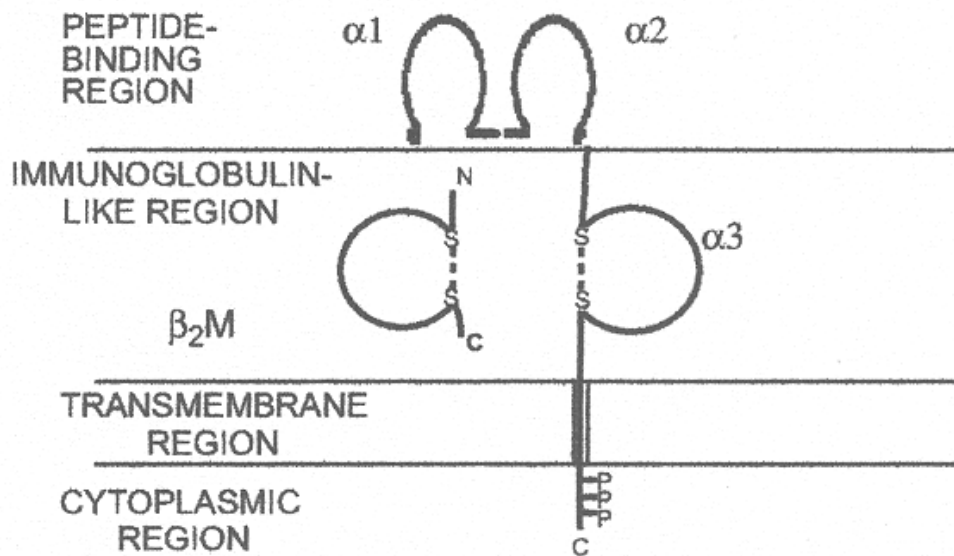


Abb. 1: Aufbau eines Klasse-I-HLA-Moleküls [61]

Die Gene der HLA-Klasse-II kodieren für zwei nicht-kovalent verbundene α - und β -Ketten von ungefähr 34 und 28 kDa. Bei diesen Molekülen wird die Bindungsregion von den N-terminalen Domänen der $\alpha 1$ - und der $\beta 1$ -Kette gebildet. Sie kann Moleküle einer Größe von 13 bis 25 Aminosäuren Länge fassen [61].

1.3.2 Funktion der HLA-Moleküle

Die HLA-Klasse-I-Moleküle HLA-A, -B und -C werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert, somit unter anderem auch auf B- und T-Lymphozyten, dendritischen Zellen, Granulozyten und Thrombozyten [43].

Ihre Hauptfunktion ist die Präsentation von antigenen, hauptsächlich endogenen, intrazellulär synthetisierten und lysierten Peptiden an zytotoxische CD8-Zellen [43, 61].

Die HLA-Klasse-II-Moleküle HLA-DR, -DQ und -DP dagegen werden nur auf antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems wie B-Lymphozyten, Monozyten, dendritischen Zellen und Langerhans-Zellen exprimiert [43]. Ihre Hauptfunktion ist es,

antigene Peptide meist exogenen Ursprungs an CD4-Helferzellen zu präsentieren [43, 61].

Die Aufgabe der HLA-Moleküle ist es, den T-Zellen des Organismus als Erkennungsmoleküle für nicht zum Körper gehörige und somit zu entfernende Substanzen wie Viren und Bakterien zu dienen. Daher spielen sie in der Transplantationsmedizin – und somit auch bei der Stammzelltransplantation – eine große Rolle. Hier ist eine möglichst weitgehende Übereinstimmung von Spender und Empfänger im HLA-Muster notwendig, um Abstoßungsreaktionen zu vermeiden. Da HLA-Moleküle genetisch jedoch sehr polymorph sind, liegt die Chance, einen Menschen mit identischem HLA-Muster zu finden, je nach Haplotyp bei 1 : 20.000 bis zu 1 : mehreren Millionen [22]. Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Verwandte identische HLA-Antigene haben, liegt bei etwa 1 : 5 [29]. Da bei vielen Krankheiten eine allogene Stammzelltransplantation für den Patienten lebensrettend und damit notwendig ist, werden zunehmend auch nur teilkompatible Stammzelltransplantationen durchgeführt, bei denen nicht alle HLA-Merkmale übereinstimmen. In 20 % der Stammzelltransplantationen wird kein voll kompatibler Spender für den Patienten gefunden, so dass auf solche teilkompatiblen Transplantationen ausgewichen werden muss.

Die Diversität im HLA-Muster wird durch die neuere Methode der DNA-Sequenzierung noch besser nachweisbar. Durch diese Methode können nicht nur sogenannte Antigen-Mismatche gefunden werden, bei denen verschiedene Antigene zwischen Spender und Empfänger vorliegen, sondern auch sogenannte Allel-Mismatche. Bei diesen liegen zwar die gleichen HLA-Antigene zwischen Spender und Empfänger vor, sie werden jedoch durch verschiedene Allele kodiert. Mit nur wenigen Ausnahmen sind die Allel-Mismatche durch Aminosäure-Substitutionen in der Bindungsregion der HLA-Moleküle gekennzeichnet. Bei den Antigen-Mismatchen liegen sowohl Aminosäuresubstitutionen in der Bindungsregion als auch in Regionen vor, die wichtig für den Kontakt mit T-Zellen sind [70].

1.4 Transplantationsreaktionen

Bei Transplantationsreaktionen ist zwischen den Abstoßungsreaktionen bei soliden Organtransplantationen, der ihnen entsprechenden Host-versus-Graft-Reaktion bei Knochenmark- oder Stammzelltransplantationen und der Graft-versus-Host-Disease zu unterscheiden.

1.4.1 Abstoßungsreaktionen

Abstoßungsreaktionen treten bei soliden Organtransplantationen auf, es wird unterschieden zwischen der hyperakuten, der akuten und der chronischen Abstoßung.

1.4.1.1 Hyperakute Abstoßung

Die hyperakute Abstoßungskrise nach soliden Organtransplantationen tritt innerhalb von Minuten oder Stunden im Anschluss an eine Transplantation ein. Sie beruht auf präformierten Antikörpern, die durch eine vorangegangene Sensibilisierung induziert wurden. Im Vordergrund stehen Antikörper gegen HLA-Merkmale und Isoagglutinine bei inkompatiblen Hauptblutgruppen. Die alloenen Antikörper binden an ihre korrespondierenden Antigene im Gewebe. Meist binden sie an das Endothel, so dass über die Aktivierung von Komplement zytotoxische Reaktionen mit Zellnekrosen induziert werden. Gleichzeitig werden durch Aktivierung des Gerinnungssystems Mikrothromben gebildet, welche die Kapillaren verschließen und so eine ischämische Nekrose nach sich ziehen [11].

Im Gegensatz zu den beschriebenen Organtransplantationen gibt es bei alloenen Stammzelltransplantationen bisher nur wenig klinische und experimentelle Erfahrungen mit potentiellen Funktionseinschränkungen der Transplantate durch donorspezifische präformierte HLA-Antikörper.

1.4.1.2 Akute Abstoßung

Die akute Abstoßung tritt meist im ersten Jahr nach einer Transplantation auf, sie kann humorale und zelluläre Effektormechanismen aufweisen. Die zelluläre Abstoßung wird in der Regel durch T-Zellen vermittelt. Die humorale Abstoßung erfolgt in Form einer Vaskulitis nach Ablagerung von Antikörpern in der Gefäßwand mit Komplementaktivierung und Aktivierung des Gerinnungssystems [11].

1.4.1.3 Chronische Abstoßung

Die chronische Abstoßung tritt Monate bis Jahre nach einer Transplantation auf. Sie beruht auf einer schleichenden Entzündung, durch die es zu einer Stimulation von Gefäßendothelien und glatten Muskelzellen der Gefäßwand kommt. Dadurch entwickelt sich eine Intimafibrose und -hyalinose und nachfolgend eine Stenosierung des Gefäßlumens mit Minderdurchblutung des Gewebes [11].

1.4.2 Graft-versus-Host-Disease (GvHD)

Als GvHD wird die immunologische Reaktion der mittransplantierten immunkompetenten Zellen des Spenders gegen den Empfänger bezeichnet. Prinzipiell werden bei jeder Transplantation Leukozyten mitübertragen, meist werden sie kurz nach der Transplantation eliminiert. Wird ein Transplantat mit einem hohen Gehalt an immunkompetenten Zellen (wie z.B. allogene Stammzellen) in einen stark immunsupprimierten Empfänger transferiert, so können insbesondere T-Lymphozyten aus dem Transplantat ausgeschwemmt werden und in die lymphatischen Gewebe des Empfängers infiltrieren. Die eingewanderten Lymphozyten werden nun durch das unterschiedliche HLA-Muster der Zellen des Empfängers stimuliert und können prinzipiell alle Organe und Zellen angreifen [77]. Die akute GvHD befällt vor allem die Haut, den Gastrointestinaltrakt und die Leber [12]. Die chronische GvHD tritt 100 Tage oder später nach der Transplantation auf. Neben den bereits erwähnten Systemen

können weitere Organsysteme betroffen sein, z.B. die Speicheldrüsen oder Lungen [12].

Die Gefahr einer GvHD ist besonders bei teilkompatiblen Stammzelltransplantationen groß, wenn also bei der Transplantation ein Mismatch zwischen den HLA-Antigenen des Spenders und des Empfängers in Kauf genommen werden muss [34, 51, 54, 71, 69, 70, 72]. Vermehrt gibt es auch Hinweise darauf, dass sogar Allel-Mismatches von HLA-Klasse-I Molekülen zu einer erhöhten Inzidenz von chronischer GvHD beim Empfänger führen [27, 69, 78]. Aus diesem Grund wird versucht, vollständig HLA-kompatible Spender für den Empfänger zu finden.

1.4.3 Host-versus-Graft-Reaktion (HvG)

Die HvG-Reaktion tritt bei allogenen Knochenmarktransplantationen und bei hämatopoetischen Stammzelltransplantationen auf. Es reagieren durch Strahlen- oder Chemotherapie resistente T-Zellen und NK-Zellen des Empfängers gegen das Transplantat [11].

1.5 Die Rolle verschiedener Blutgruppenantikörper bei der allogenen hämatopoetischen SZT

Von verschiedenen Blutgruppenantikörpern ist bekannt, dass sie die Klonogenität von erythrozytären und megakaryozytären Vorläuferzellen inhibieren können. Somit können sie einen Einfluss auf das Engraftment nach allogener SZT haben [16].

Inkompatibilitäten im ABO-Blutgruppen-System treten in bis zu 40 % der HLA-identischen SZT auf, da die ABO-Blutgruppe unabhängig von den HLA-Antigenen vererbt wird [36, 53, 73]. Je nach Major- und Minor-ABO-Inkompatibilität können verschiedene Komplikationen bei den transplantierten Patienten auftreten. Diesen wird mit Verfahren wie Erythrozyten- und Plasmaverminderung der Transplantate oder mit Plasmaaustausch der Patienten entgegengewirkt [16]. Erker et al. zeigten in Bezug auf die im ersten Monat nach Stammzelltransplantation erforderlichen Transfusionen keinen Unterschied für ABO-, Rhesus- oder Kell-differente Transplantationen.

Deutlich wurde jedoch ein vermindertes Überleben für Patienten, die ein Transplantat mit „minor-mismatch“ oder mit „bidirectional-mismatch“ erhalten hatten gegenüber Patienten, die „ABO-matched“ oder „major ABO-matched“ transplantiert wurden. Außerdem zeigte diese Studie eine verminderte Überlebenschance für Rhesus-inkompatible Stammzelltransplantationen im Vergleich zu Rhesus-kompatiblen Stammzelltransplantationen [23]. Auch Worel et al. konnten eine erhöhte Rate an immunhämatologischen Komplikationen und eine erhöhte Transplantations-assoziierte Mortalität nach nicht-myeloablativen hämatopoetischen Stammzelltransplantationen mit „ABO-mismatch“ nachweisen [96]. Ebenso wurde für Knochenmarktransplantationen in verschiedenen Studien ein negativer Einfluss eines „ABO-mismatches“ auf das Überleben der Patienten gezeigt, besonders zeigte sich dieser Einfluss im „bidirectional mismatch“ [8, 84, 83].

Klinische Daten zum potentiellen Einfluss nicht zum ABO-System gehöriger erythrozytärer oder Thrombozyten-spezifischer Antikörper auf die Hämatopoese und auf das Engraftment allogener Stammzellen sind noch selten. Trotzdem gibt es vermehrt Hinweise darauf, dass auch nicht zum ABO- oder Rhesus-System gehörige erythrozytäre Alloantikörper schwere hämolytische Transfusionsreaktionen im Rahmen von Transplantationen auslösen. Die Inzidenz solcher Hämolysen liegt nach Angaben einer Single-Center-Studie bei ungefähr 1 % [99]. Zu unterscheiden ist bei den durch Alloantikörper ausgelösten Transfusionsreaktionen zwischen der Antikörperbildung nach der Transplantation durch transplantierte Lymphozyten [87], zwischen der Fähigkeit des transplantierten Immunsystems selbst noch Antikörper zu bilden und zwischen eventuell noch vorhandenen immunkompetenten Zellen des Empfängers [90].

Auch die Reaktivierung von Empfänger-HLA-und-erythrozytären-Antikörpern nach allogener SZT wurde beschrieben. Sie ist wahrscheinlich auf die Transplantat-Erkennung durch Antigene des Empfängers zurückzuführen [95].

Vermehrt gibt es Hinweise darauf, dass vorbestehende Anti-Kell-Antikörper des Transplantatempfängers das Wachstum Kell-positiver Burst-forming-Units-Erythrocyte und Colony-forming-Units unterdrücken [40, 82, 92] und dass Kell-Antigene nicht nur auf erythrozytären, sondern auch auf megakaryozytären Vorläuferzellen zu finden sind. Somit können Anti-Kell-Antikörper nicht nur die

Erythropoese sondern auch die Bildung von Thrombozyten unterdrücken und damit das Stammzellengraftment beeinflussen [93]. Auch von anderen Antikörpern, wie zum Beispiel von verschiedenen glycoprotein-spezifischen Thrombozyten-Antikörpern, ist bekannt, dass sie die Hämatopoese inhibitorisch beeinflussen [85].

1.6 Die Rolle von präformierten HLA-Antikörpern im Empfängerorganismus

Über die klinische Relevanz und die experimentellen Wechselwirkungen präformierter HLA-Antikörper in Hinblick auf die Hämatopoese und das Engraftment von Stammzellen nach allogener hämatopoetischer SZT ist noch wenig bekannt.

Es gibt verschiedene Ursachen für präformierte HLA-Antikörper im Empfängerorganismus. Beispiele hierfür sind Schwangerschaft, vorausgegangene Transplantationen, Bluttransfusionen und andere immunologische Ereignisse im Leben des Empfängers [88]. Die Affinität und Klasse der produzierten HLA-Antikörper hängt von verschiedenen Faktoren ab. Zu diesen zählen der Immunisierungsweg, die Persistenz und der Typ der vorhandenen Zellen sowie auch der Immunstatus des Empfängers. Zytotoxische HLA-Antikörper, die bei 15-20 % aller mehrgebärenden Frauen gefunden werden können, sind normalerweise multispezifisch, hochtitrig, von hoher Affinität und aus der IgG-Klasse. Antikörper, die nach Transplantationen auftreten, sind meist ebenfalls IgG-Antikörper. Die Mehrheit der produzierten Antikörper nach Transfusionen sind multispezifische IgM und IgG-Antikörper. 30-50 % der mehrfach mit nicht-leukozytendepletierten Blutkomponenten transfundierten Patienten entwickeln HLA-Antikörper [17, 61]. Diese präformierten Antikörper sind ein wichtiger Risikofaktor für die Funktion und das Überleben von Organtransplantationen [61]. So ist zum Beispiel das Vorhandensein von präformierten HLA-Antikörpern bei Nieren- und Herztransplantationen mit hyperakuten Abstoßungsreaktionen assoziiert. Daher werden vorhandene HLA-Antikörper schon bei Aufnahme auf die Transplantations-Warteliste identifiziert und registriert [58, 61, 68]. Auch über die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation wurde in Studien berichtet, dass Patienten mit donor-spezifischen Antikörpern und somit einem

positiven zytotoxischen Crossmatch eine höhere Inzidenz an Transplantatversagen hatten als Patienten mit einem negativen Crossmatch [3, 51, 61, 67].

Trotz dieser Studien werden bei der Stammzelltransplantation bisher nicht grundsätzlich die beim Patienten potentiell vorhandenen präformierten HLA-Antikörper gegen die Stammzellen des Spenders bestimmt, da deren klinische Relevanz bis dato noch nicht eindeutig beurteilbar ist.

2 Fragestellung

Bei Stammzelltransplantationen werden heutzutage zur Vermeidung von zellulären Abstoßungsreaktionen möglichst HLA-identische allogene Stammzellen ohne Mismatch transplantiert. Bisher werden dabei jedoch nicht grundsätzlich die potentiell vorhandenen HLA-Antikörper des Empfängers gegen die Stammzellen des Spenders bestimmt.

Ziel dieser Arbeit ist es, in vitro mit verschiedenen morphologischen und funktionellen Assays HLA-Antikörper auf Stammzellen nachzuweisen und die Funktion der HLA-Antikörper-sensibilisierten Stammzellen im Vergleich zu nicht HLA-Antikörper-sensibilisierten Stammzellen zu prüfen.

- Im **Crossmatch** soll zunächst überprüft werden, ob HLA-Antikörper aus dem Patientenserum an die Stammzellen binden und sich auf diesen Zielzellen nachweisen lassen.
- In Versuchen zum **Apoptoseverhalten** von Stammzellen soll evaluiert werden, ob und in wie weit die mit HLA-Antikörpern sensibilisierten Stammzellen gegenüber den nicht HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen stärker apoptotisch werden, was ein Hinweis dafür sein könnte, dass dies auch in vivo eine Rolle spielt.
- Außerdem soll geprüft werden, ob und in wie weit die **Phagozytoserate** von HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen gegenüber nicht HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen erhöht ist. Es erscheint möglich, dass antikörpersensibilisierte Stammzellen durch sogenannte „Third-part“-Effektorzellen schneller und stärker phagozytiert werden als nicht AK-sensibilisierte Zellen.
- In **Kurzzeit-Klonogenitätsassays** soll überprüft werden, in wie weit sich die Antikörpersensibilisierung von Stammzellen auf deren Proliferation im Vergleich zu nicht AK-sensibilisierten Stammzellen auswirkt.
- Schließlich wird an einem **optischen Biosensorsystem** untersucht, ob die Antikörpersensibilisierung der Stammzellen deren Affinität zum Gefäßendothel beeinflusst. Dies könnte ein Hinweis auf die möglicherweise durch die HLA-Antikörper behinderte Rückwanderung der Zellen ins Knochenmark sein.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

1. Durchflusszytometer: FACSCalibur, Fa. Becton Dickinson, San José, USA
2. Zellzählgerät: K-1000, Fa. Sysmex, Kobe, Japan
3. Wärmeschrank: Fa. Heraeus instruments, Hanau
4. Werkbank: Clean Bench HERA Safe, Fa. Heraeus Instruments, Hanau
5. VortexGenie2: Fa. Scientific Industries, New York, USA
6. Mikroskop: Wilovert S, Fa. Hund, Wetzlar
7. Zentrifuge Rotanta 96 RC: Fa. Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
8. Zentrifuge Rotanta/RPC: Fa. Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
9. Zentrifuge Immucient II: Fa. DADE Diagnostik GmbH, Unterschleißheim
10. IASys Affinity Sensor: Fa. Thermo Labsystems, Cambridge, UK
11. Sonorex TK 30: Fa. Schalltec GmbH, Mörfelden-Walldorf
12. Feinwaage: MC1 Laboratory LC 2200 S, Fa. Sartorius, Göttingen
13. Pipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl: Fa. Eppendorf, Hamburg
14. Cell Scraper: Falcon, Fa. BD Biosciences, USA
15. Pipet-Boy: Fa. Integra Biosciences, Fernwald
16. pH-Meter 761 Calimatic: Fa. Knick, Berlin

3.1.2 Verbrauchsmaterial

1. sterile Kulturschale: Fa. Nalge Nunc International, Naperville, USA
2. Gewebekulturschalen: Fa. Greiner, Solingen
3. Filter: Millex GP Filter Unit, 0,22 µm, Millipore Express, PES Membrane, Fa. Millipore Corporation Bedford, USA
4. Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl: Fa. Sarstedt, Nümbrecht
5. Cell culture dish, sterile, 35 x 10 mm: Fa. Nalge Nunc International, New York, USA

6. Messröhrchen, BD Falcon, 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube: Fa. BD Biosciences, USA
7. PS-Röhrchen: Fa. Greiner BioOne GmbH, Solingen
8. Pipetten, Advantage Falcon Serological: Fa. Becton Dickinson, USA
9. Pipetten, 10 ml: Fa. Greiner BioOne GmbH, Solingen

3.1.3 Reagenzien

Bestimmung von CD34+-Zellen:

1. D-PBS mit CaCl₂, MgCl₂, REF 14190-094, LOT 3090792: Fa. Invitrogen Life Technologies, California, USA
2. FacsFlow, Cat. No. 342003: Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
3. FacsRinse, Cat. No. 340346: Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
4. FacsClean, Cat. No. 340345: Fa. Becton Dickinson, Heidelberg
5. CD34-PE Antikörper (8G12), Cat. No. 345802: Fa. Becton Dickinson, San Jose, USA
6. CD45-TC-Antikörper, Human CD45, tri-color conjugate, Code No. MHCD 4506: Fa. Caltag laboratories, Burlingame, CA
7. Lyse-Reagenz, PeliLyse buffer A1, aufgelöst in 1:10 Aqua dest., REF M7101.6, LOT 8000057711, Vertrieb Deutschland: Fa. HISS Diagnostics GmbH, Freiburg i.Br.

Klonogenitätsassay:

1. Methylcellulose MethoCult H4433: Fa. Stem Cell Technologies Inc., Vancouver, Kanada
2. RPMI 1640 Medium with L-Glutamine: Fa. GibcoBRL, Painsley, Schottland
3. fetales Kälberserum (FCS) Fetal Bovine Serum bei 56 Grad Celsius für 30 min inaktiviert: Fa. Sigma Chemical Co, St. Louis, USA,
4. L-Glutamine-Penicillin-Streptomycin-Solution with 200 mM L-glutamine, 10000 U penicillin and 10 mg streptomycin in 0,9 % NaCl, LOT 21K2418: Fa. Sigma Chemical Co, St. Louis, USA

Phagozytose-Assay:

1. Human CD14, Code No. MHCD 1404, R-phycoerythrin conjugate: Fa. Caltag laboratories, Burlingame, CA
2. CD34-PerCP (8G12), Code No. 345803: Fa. Becton Dickinson, San Jose, California, USA
3. CellTracker™ Green CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate), Catalog Numer C-7025: Fa. Molecular Probes Europe BV, Leiden, gelöst in DMSO zu einer Konzentration der Stock-Lösung von 10 mM, gelöst in PBS zu einer Arbeitskonzentration von 5 µM

Crossmatch-Assay:

1. Goat F(ab')₂ Anti-Human IgG (Fc sp.), FITC conjugate, Code No. H10101: Fa. Caltag laboratories, Burlingame, CA

Apoptose-Assay:

1. Recombinant human AnnexinV, Code No. AnnexinV01, FITC conjugate: Fa. Caltag laboratories, Burlingame, CA

Versuche am Optischen Biosensor:

1. Natrium-Phosphat-Puffer 10 mM pH 7,7
2. PBS pH 7,4 mit 10 mM Natrium-Phosphat, 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl
3. BS³-Puffer: 0,56 mg/ml in 10 mM Natrium-Phosphat pH 7,7
4. BSA 2%: 2 mg/ml in PBS pH 7,4
5. PBS/T: PBS mit Tween 20, ad 0,05 % (v/v)
6. HBS (Hepes buffered saline) mit 10 mM Hepes pH 7,4, 3,4 mM EDTA und 150 mM NaCl, Aqua dest. auf 200 ml
7. HCl: 10 mM und 1 mM
8. Cleaning Solution: 1 mM NaOH mit 1% SDS und 1% Tween 20
9. Zellkultur: HDMEC-c-Endothelzellen der Firma PromoCell, Heidelberg, aus Endothelial Cell KIT HDMEC-c

10. Zellkulturmedium: Endothelial Cell Growth Medium CV der Firma PromoCell, Heidelberg, aus Endothelial Cell KIT HDMEC-c
11. EDTA-Trypsin-Solution: 0,5%/0,2% in PBS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} , dilute 1:10 with aqua bidest. Cat. No. L2153, Lot. No. 212B, Fa. Biochrom AG, Berlin
12. D-PBS (CaCl_2 , MgCl_2): GIBCO, Fa. Invitrogen Life Technologies, USA

3.2 Patientenkollektiv

Aus frischen bzw. kryokonservierten Aphereseprodukten mit einer Stammzell-Reinheit von 90-95% von gesunden Stammzellspendern wurden Aliquots von ca. 2 ml gewonnen.

Für die Monozytenisolierung wurde frisch abgenommenes Blut von gesunden Blutspendern der Blutgruppe O verwendet.

Das AB-Serum für die Kontrollgruppen wurde von gesunden Blutspendern gewonnen, bei denen zuvor HLA-Antikörper im Serum ausgeschlossen wurden.

Das Serum mit HLA-Antikörpern wurde von Patienten gewonnen, bei denen spezifische HLA-Antikörper mittels Lymphozytotoxizitätstest nachgewiesen worden waren.

Die Seren wurden portioniert und bis zu den Versuchen bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

3.3 Labortechniken

3.3.1 Zellzählung

Zur Bestimmung der Leukozytenzahlen der verschiedenen Proben wurde ein Zellzählgerät Sysmex K-1000 der Firma Sysmex verwendet. Dieses Gerät wurde nach Herstellerangaben gereinigt und kalibriert.

3.3.2 Grundlagen der durchflusszytometrischen Diagnostik

Die Durchflusszytometrie ist eine verbreitete Methode zur Analyse von Zellen in wässriger Suspension. Dabei werden die einzelnen Zellen mit fluoreszenz-markierten Antikörpern beladen und dann im Durchflusszytometer mit verschiedenen Parametern auf der Grundlage ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften untersucht und dargestellt.

Die Durchflusszytometrie wurde bei den Versuchen zum Crossmatch-, Phagozytose- und Apoptoseverhalten der Stammzellen eingesetzt.

3.3.3 Durchflusszytometrische Bestimmung der CD34-exprimierenden Zellen

Um die CD34-exprimierenden Zellen zu bestimmen, wurden die Stammzellaliquots mit 5 µl fluoreszenzmarkierten CD34-PE-Antikörpern und 5 µl fluoreszenzmarkierten CD45-FITC-Antikörpern 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Zuvor wurden bei frischen Produkten die Erythrozyten durch eine zehnmündige Inkubation mit 1 ml Lysereagenz entfernt und die verbliebenen Zellen mit PBS gewaschen.

Auch nach der Inkubation mit CD34-Antikörpern wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen, um nicht gebundene Antikörper aus der Lösung zu entfernen. Danach wurden die Zellen zur Messung mit 400 µl PBS aufgefüllt.

Die Auswertung erfolgte zunächst in einer Darstellung von FSC (Vorwärtsstreulich) auf der X-Achse gegen SSC (Seitwärtsstreulich) auf der Y-Achse. Dabei wurden Nebengeräusche wie zum Beispiel noch vorhandene Erythrozyten durch einen Schwellenwert von ca. 200 ausgegrenzt. In der nächsten Darstellung wurde SSC auf der X-Achse gegen die Intensität von CD45 auf der Y-Achse gemessen. Dadurch konnten die Leukozyten von den anderen Zellen abgegrenzt und im Gate dargestellt werden. Diese gegateten Zellen wurden dann mit CD45 auf der X-Achse gegen CD34 auf der Y-Achse so dargestellt, dass der genaue Anteil der CD34-exprimierenden Zellen an den gesamten Leukozyten dargestellt werden konnte.

3.3.4 Dichtegradientenzentrifugation

Für die Crossmatch-Versuche, die Klonogenitätsassays und die Monozytenisolierung wurde mit einem frischen Zellprodukt bzw. mit frischem heparinisierten Vollblut vor den eigentlichen Versuchen eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt.

Dazu wurde das Produkt bzw. das Blut mit PBS verdünnt, diese Verdünnung wurde auf mehrere Ficoll-Röhrchen, die jeweils 3,2 ml FICOLL enthielten, aufgeteilt und langsam aufgeschichtet. Die verschlossenen Röhrchen wurden zunächst 15 min bei 3000 U/min ohne Bremse zentrifugiert, so dass sich zwischen dem Plasma und der Ficoll-Lösung eine weiße Interphaseschicht aus mononukleären Zellen (MNCs) bildete, wie in Abb. 2 dargestellt.

Die Zellschichten aus MNCs wurden aus der Mitte vorsichtig abpipettiert, in neue Röhrchen gefüllt, mit PBS auf 10 ml aufgefüllt und gewaschen. Dazu wurden die verschlossenen Röhrchen 5 min bei 1200 U/min ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Waschung wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt, die MNCs wurden aufgeschüttelt und erneut mit 10 ml PBS überschichtet und durchmischt. Bei der zweiten Waschung wurde 5 min mit 1200 U/min und starker Bremse zentrifugiert, danach wurde der Überstand wieder abgesaugt und die MNCs je nach Versuch mit PBS oder RPMI aufgefüllt.

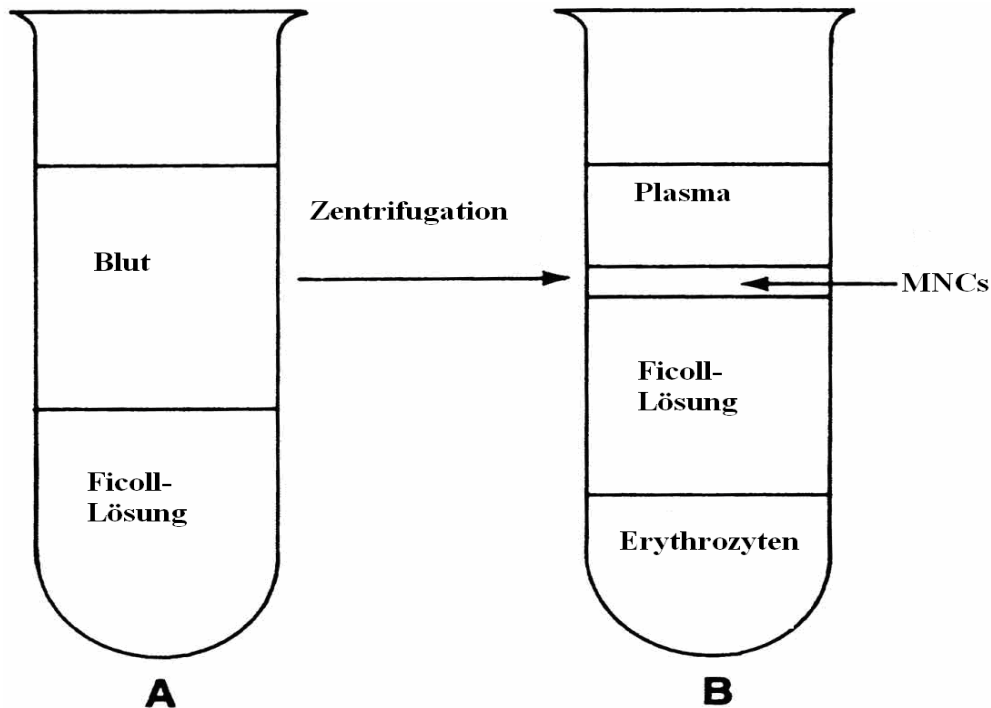


Abb. 2: Schematische Darstellung einer Dichtegradientenzentrifugation

3.3.5 Crossmatch

Das durchflusszytometrische Crossmatch wurde durchgeführt, um die Intensität der Bindung von alloenen, für die HLA-Antigene auf den Stammzellen spezifischen, HLA-Antikörpern zu überprüfen. Dazu wurde zu jedem Versuch mit HLA-Antikörpern eine Negativkontrolle mit AB-Serum mitgeführt. Jeder Versuch wurde dreifach angesetzt.

Zunächst wurden die Zellen aus dem Aliquot eines frischen Aphereseproduktes mittels Dichtegradienten-Trennung aufgereinigt, um mononukleäre Zellen (MNCs) zu isolieren.

Nach dieser Dichtegradienten-Trennung wurden die MNCs mit PBS auf 15×10^3 Zellen pro μl eingestellt. 50 μl Stammzellen wurden jeweils in ein Falconröhrchen pipettiert, dazu wurde je 1 ml Lyseagenz gegeben um die restlichen Erythrozyten zu entfernen. Per Vortexer wurden die Zellen durchmischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Dann wurden die Röhrchen 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Zum Auswaschen des Lyseagenzes wurde je 1 ml PBS zugegeben,

durchmischt, wieder 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert und wieder der Überstand dekantiert.

Nun wurden in jedes Stammzellröhrchen entweder 50 µl Serum mit für die Antigene auf den Stammzellen spezifischen HLA-Antikörpern oder 50 µl AB-Serum zugegeben. Die Zellen wurden mit den Seren durchmischt und die Suspension in den Röhrchen für 30 min bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Danach wurden die Zellen zweimal wie zuvor mit PBS gewaschen.

Nach dem Waschen wurden die fluoreszenzmarkierten Antikörper zugegeben. Dafür wurden je Röhrchen 8 µl CD34-PE und 8 µl Anti-Human-IgG-FITC benutzt und die Suspension durchmischt. Während der Bindung der Antikörper an die Stammzellen wurden die Röhrchen 20 min im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Um die restlichen nicht gebundenen Antikörper aus der Suspension zu entfernen, wurden die Zellen zweimal wie zuvor mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit 400 µl PBS für die Messung am Durchflusszytometer aufgefüllt.

Bei dieser Messung wurden die CD34-positiven Zellen zunächst in einem Dotplot (Punktwolke) gated (Abb. 3b R1) und dann in einem Histogramm dargestellt. In diesem Histogramm wurde die Intensität des Anti-Human-IgG dargestellt, so dass der Mittelwert der Anti-Human-IgG-Bindung der CD34-positiven Zellen abgelesen werden konnte. Es wird davon ausgegangen, dass das Anti-Human-IgG an die HLA-Antikörper auf den Stammzellen bindet, so dass die Anti-Human-IgG-Bindung im Histogramm die Intensität der Bindung von HLA-Antikörpern an Stammzellen repräsentiert.

Als Beispiel ist in Abb. 3 die Auswertung einer mit HLA-Antikörpern sensibilisierten Stammzellpräparation dargestellt.

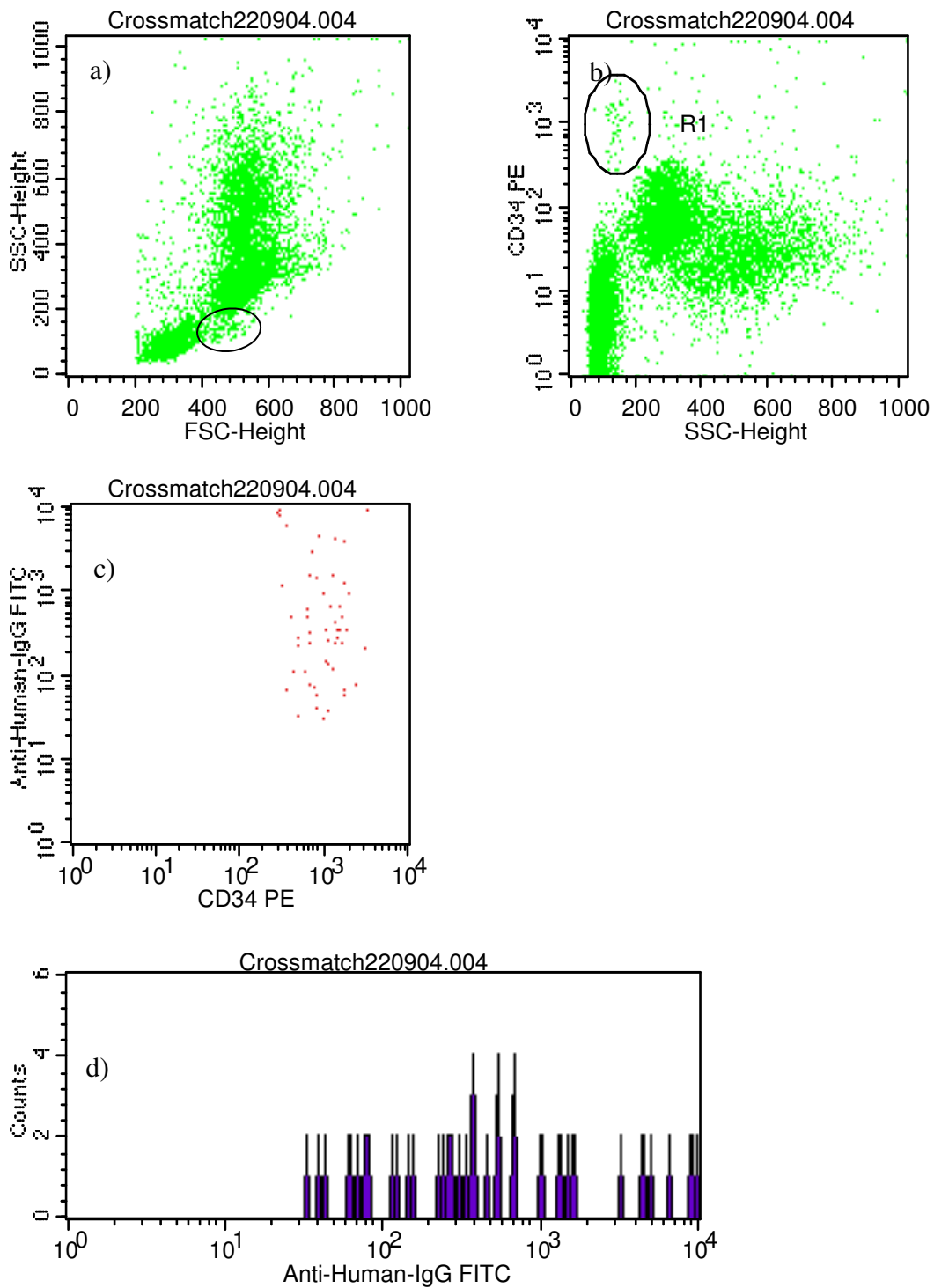


Abb. 3: Beispiel der Auswertung eines Crossmatch-Versuches
 3a und 3b jeweils im Gate dargestellt: Stammzellen
 3c in rot dargestellt: Stammzellen
 3d: Anti-Human-IgG-Bindung der Stammzellen

3.3.6 Apoptose

Für die Messung des Apoptoseverhaltens wurden frische unselektionierte Stammzellprodukte verwendet, die nicht älter als 6 Stunden waren. Zu jedem Versuch mit HLA-Antikörpern wurde auch hier eine Negativkontrolle mit AB-Serum mitgeführt, und jeder Versuch wurde dreifach angesetzt. Die Messungen der Apoptoserate fanden nach 0, 12, 24 und 36 Stunden statt.

Das Produkt wurde zunächst mit PBS auf $15\text{-}20 \times 10^3$ Zellen pro μl eingestellt. Je 50 μl Produkt wurden in ein Falconröhrchen pipettiert, dazu wurde je 1 ml Lysereagenz gegeben, um die Erythrozyten zu entfernen. Die Suspension wurde durchmischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Entfernen der Lysereagenzie wurden die Röhrchen 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Dann wurden die Zellen wie in den zuvor beschriebenen Versuchen noch einmal mit PBS gewaschen.

Im nächsten Schritt wurden je 50 μl Serum mit HLA-Antikörpern bzw. 50 μl AB-Serum ohne HLA-Antikörper zugegeben und die Zellen durchmischt. Die Zellsuspensionen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ für 0 bzw. 12, 24 und 36 Stunden inkubiert.

Nach dieser Inkubationsphase wurden die Zellen zweimal wie zuvor mit PBS gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen.

Im nächsten Schritt wurden die fluoreszenzmarkierten Antikörper zugegeben: In jedes Röhrchen wurden je 5 μl Annexin-FITC, 8 μl CD34-PE und 5 μl CD45-TC pipettiert, durchmischt und 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden die Zellsuspensionen wiederum zweimal mit PBS gewaschen, um nicht gebundene fluoreszenzmarkierte Antikörper zu entfernen.

Annexin V bindet spezifisch an das calciumabhängige Phosphatidylserin. Dieses ist im normalen Zellmilieu an der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran lokalisiert. Bei apoptotischen Zellen jedoch kommt es durch den Verlust der Asymmetrie der Zellmembran vermehrt zur Translokation des Phosphatidylserins auf die Außenseite der Zellmembran wie in Abb. 4 gezeigt.

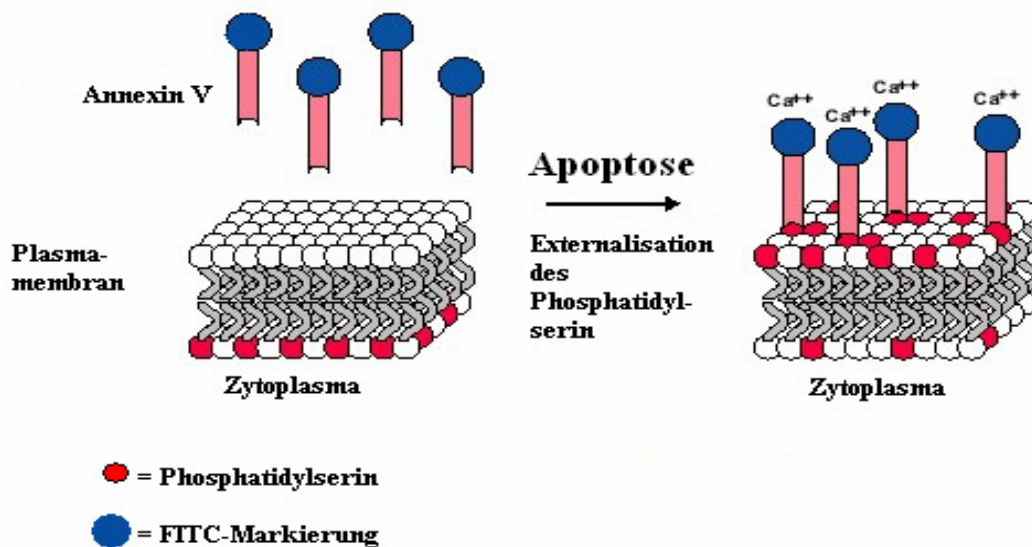


Abb. 4: Mechanismus der Annexinbindung an apoptotischen Zellen [7]

Für die Messung am Durchflusszytometer wurden die Zellen mit je 400 μ l PBS aufgefüllt.

Bei der Messung wurden zunächst in der FSC- gegen SSC-Darstellung durch Einstellung des Schwellenwertes unspezifische Events ausgegrenzt (Abb. 5a). Für die Auswertung wurden die Zellen in der SSC- gegen CD45-Darstellung gezeigt, so dass die Leukozyten erkennbar wurden. Durch ein Backgating wurde sichergestellt, dass es sich bei den Zellen wirklich um Leukozyten handelte.

In der nächsten Darstellung wurden die CD34-positiven Zellen gegen SSC auf der X-Achse dargestellt, und um die CD34-Population wurde ein Gate gesetzt wie in Abb. 5b gezeigt. Es wurde ein Histogramm mit der Statistik der Annexinbindung dieser CD34-Population erstellt (Abb. 5d). Die Intensität der Annexinbindung wurde der Apoptoserate der Stammzellen gleichgesetzt.

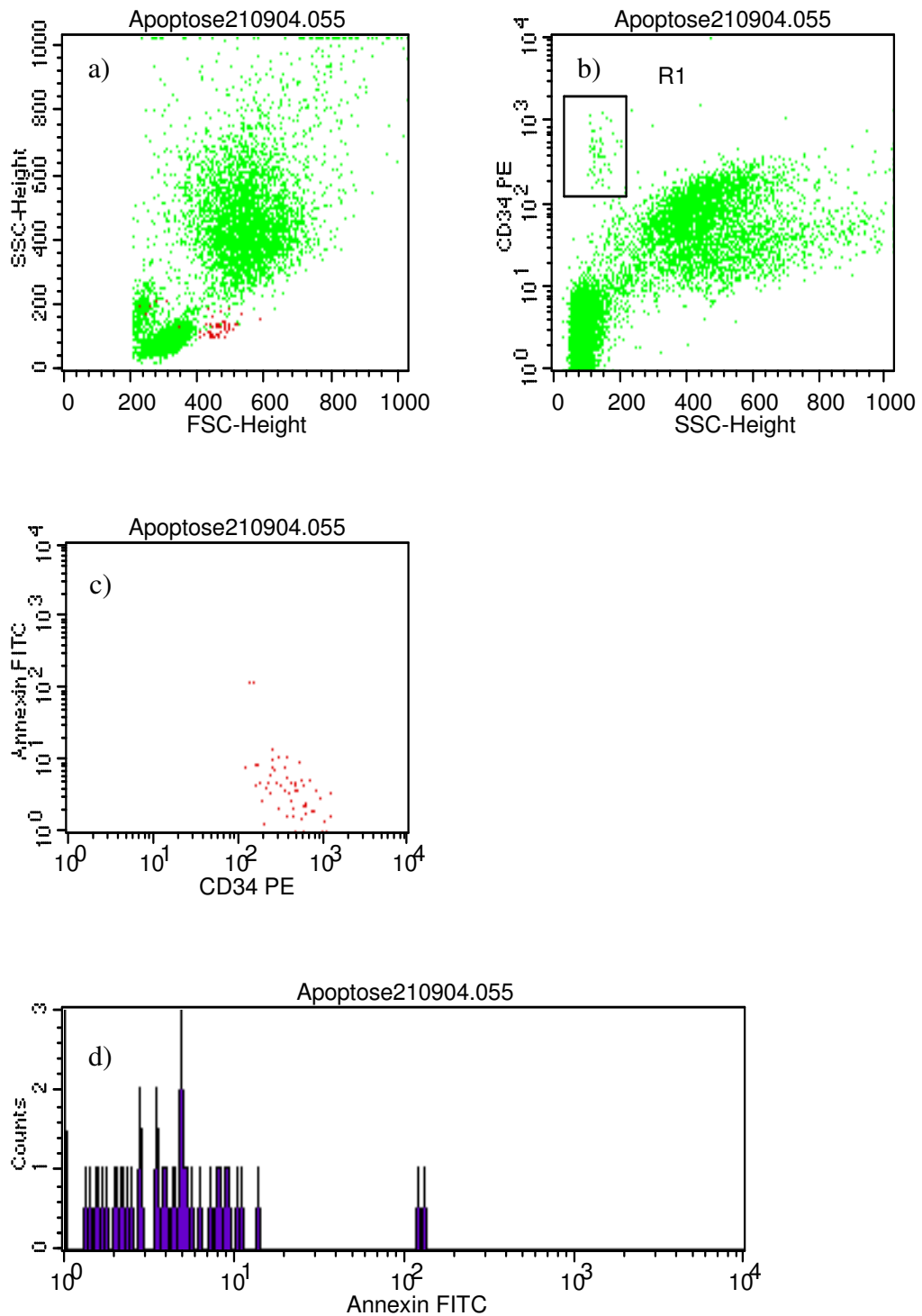


Abb. 5: Beispiel der Auswertung eines Versuchs zum Apoptoseverhalten, dargestellt ist die Auswertung der Kontrollgruppe.

5a und 5c in rot dargestellt: Stammzellen

5b in R1 dargestellt: Stammzellen

5d: Annexin-Fluoreszenz: entspricht der Menge der apoptotischen Stammzellen

3.3.7 Phagozytose

Der Versuch zum Phagozytoseverhalten wurde in ähnlicher Weise durchgeführt, wie von Lim et al. für Thrombozyten beschrieben [42].

Für die Monozytenisolierung wurde zunächst eine Dichtegradienten-Trennung von Spenderblut der Blutgruppe 0 durchgeführt, um die mononukleären Zellen zu isolieren. Die Zellen wurden in RPMI + 5% FCS aufgenommen. Zur Induktion der Adhärenz von Monozyten wurde je 1 ml der Zellsuspension in 8-Well-Kulturschalen gefüllt. Nach Adhärenz der Monozyten für drei Stunden wurden die Vertiefungen der Kulturschale dreimal mit warmem RPMI gewaschen. So wurden die nicht adhärenen Zellen entfernt und ein vorzeitiges Lösen der adhärenen Monozyten verhindert. Die adhärenen Monozyten wurden danach vorsichtig mit einem Cell Scraper abgelöst und mit PBS in Falconröhrchen aufgenommen. Die Röhrchen wurden 10 min bei 1000 U/min zentrifugiert, dann wurden die Zellen in RPMI + 5% FCS aufgenommen.

Die Stammzellen aus dem nach dem Isolex-Verfahren positiv-selektionierten Produkt wurden zunächst mit PBS auf 15.000 Zellen pro μl in 50 μl eingestellt. Die Reinheit des Produktes betrug jeweils zwischen 90 und 95 %. Die Stammzellen wurden mit derselben Menge an Chloromethylfluoresceindiacetat (CMFDA) durchmischt und inkubiert. Das geschah analog wie von Baker et al. für das CMFDA-Labeling von Thrombozyten beschrieben [4].

CMFDA ist ein farbloses nicht-fluoreszierendes Reagenz, das durch Zellmembranen in lebende Zellen diffundiert. Dort reagiert seine Chloromethyl-Gruppe mit Thiolen in einer wahrscheinlich Glutathion-S-Transferase-vermittelten Reaktion, so dass es zu einem Zellwand-impermeablen Reaktionsprodukt transformiert wird. Zusätzlich spalten zytosolische Esterasen die Azetate des CMFDA auf, so dass intrazellulär ein hell fluoreszierendes Produkt entsteht [55].

In der späteren durchflusszytometrischen Messung wird dieses intrazellulär fluoreszierende Produkt vom Durchflusszytometer erkannt, so dass auf diese Weise Stammzellen detektiert werden können, die zuvor von Monozyten phagozytiert wurden. Eine Detektierung durch Zugabe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern ist in diesem Fall nicht möglich, da sich die phagozytierten Stammzellen intrazellulär befinden und somit nicht durch Antikörper sensibilisiert werden können.

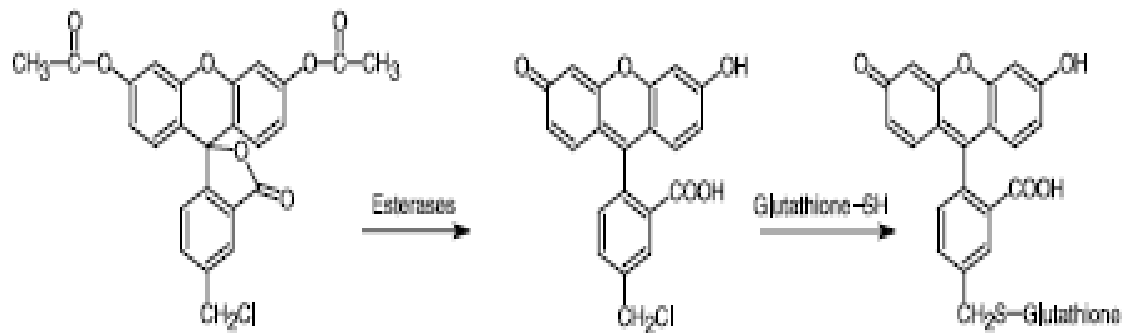


Abb. 6: Darstellung der zwei intrazellulären Reaktionen des CMFDA-Reagenz. Auch wenn der Farbstoff zunächst mit dem intrazellulären Glutathion reagieren könnte, ist das erste Produkt nicht-fluoreszierend bis zur Reaktion mit intrazellulären Esterasen, die hier als erste Reaktion gezeigt ist [55].

Die Inkubation mit CMFDA erfolgte 45 min bei Raumtemperatur, danach wurden die Zellen 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Mit PBS wurden die Zellen bis zum Anfangsvolumen wieder resuspendiert und bei Raumtemperatur 30 min inkubiert, um überschüssigem CMFDA die Diffusion aus den Zellen zu ermöglichen. Die Zellsuspension wurde wieder 5 min bei 1200 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Für die Sensibilisierung der Stammzellen mit HLA-Antikörpern bzw. AB-Serum wurden jeweils im dreifachen Ansatz je Röhrchen 200 µl Serum mit der gleichen Menge an Zellsuspension zunächst durchmischt und dann 60 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden die nicht gebundenen Antikörper durch Zugabe von 1 ml PBS und Zentrifugation bei 1200 U/Min für 5 min entfernt.

Die CMFDA-gelabelten und mit HLA-Antikörpern sensibilisierten Stammzellen wurden in RPMI + 5% FCS aufgenommen.

Die Monozytensuspension wurde im Verhältnis von mindestens 1:1 oder mehr Stammzellen zu den Stammzellen in die Röhrchen gegeben und durchmischt. Auf Grund des stark variierenden Stammzellgehalts der Stammzellprodukte konnte nicht immer die genau gleiche Anzahl an Stammzellen verwendet werden.

Für die Phagozytose wurde die Zellsuspension für 2 Stunden bei 37°C und 5% CO₂

inkubiert. Danach wurden die Röhren bei 1000 U/min für 10 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Die Zellen wurden nochmals mit PBS gewaschen und dann jedes Röhren mit 50 µl PBS resuspendiert.

Nun erfolgte die Zugabe der fluoreszenzmarkierten Antikörper zu den Zellen. In jedes Röhren wurden je 5 µl CD14-PE und CD34-PerCP gegeben, gevortext und für 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Zellen zweimal wie zuvor mit PBS gewaschen.

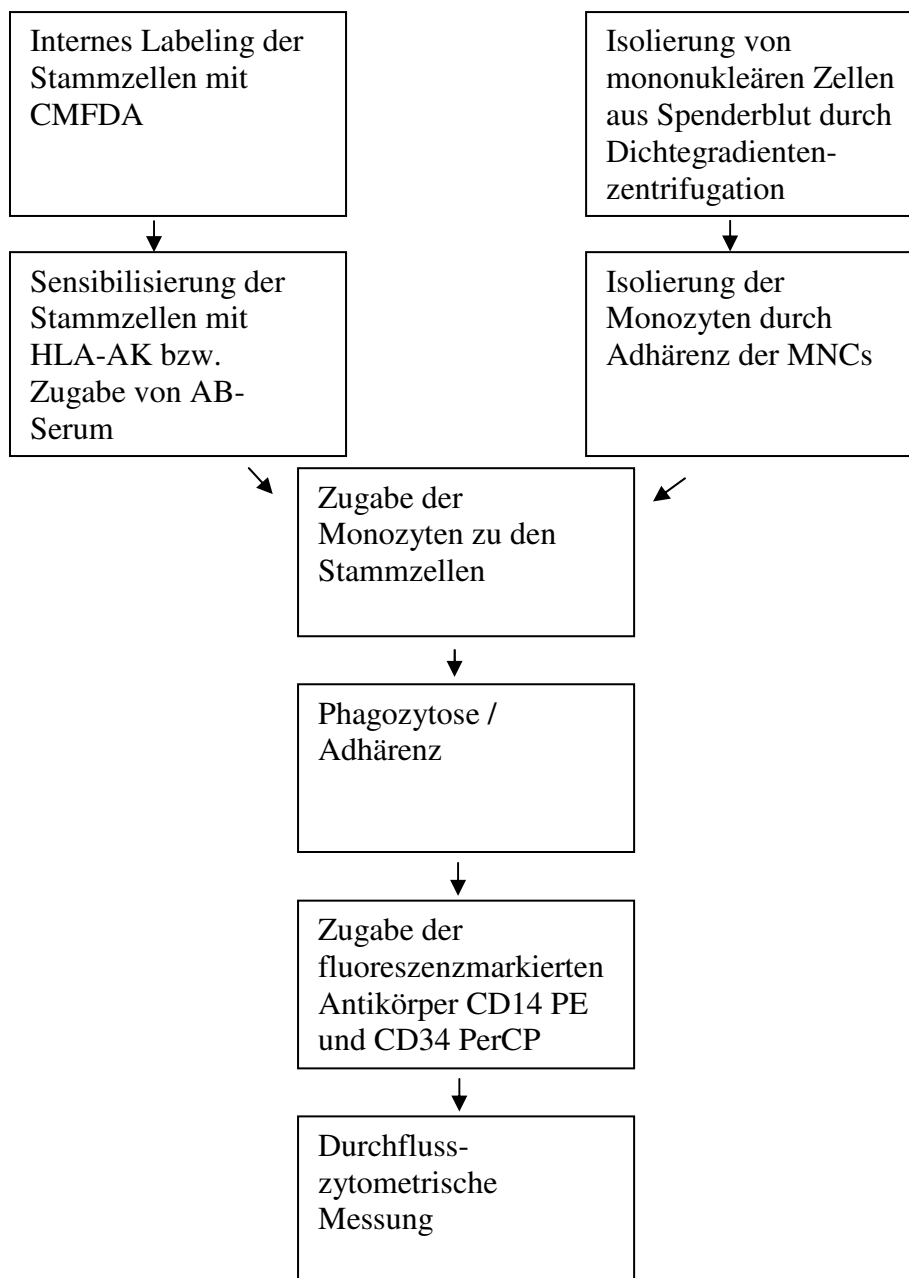


Abb. 7: Fließschema zur Phagozytose und Adhärenz

Für die Messung am Durchflusszytometer wurden die Zellen in 400 µl PBS resuspendiert und durchmischt. Bei der Analyse wurde zunächst ein Gate der CD14-positiven Zellpopulation (Monozyten) erstellt (Abb. 8b). In Histogrammen wurden dann die Intensität der CMFDA-Fluoreszenz und die Intensität der CD34-Fluoreszenz dieser Monozyten dargestellt (Abb. 8c und 8d). Die Höhe der CMFDA-Fluoreszenz zeigt die Menge der phagozytierten Stammzellen, während die Höhe der CD34-Fluoreszenz die Menge der an den Monozyten adhärenen Stammzellen repräsentiert. Als Beispiel ist in Abb. 8 die Auswertung einer mit HLA-Antikörpern inkubierten Stammzelle dargestellt.

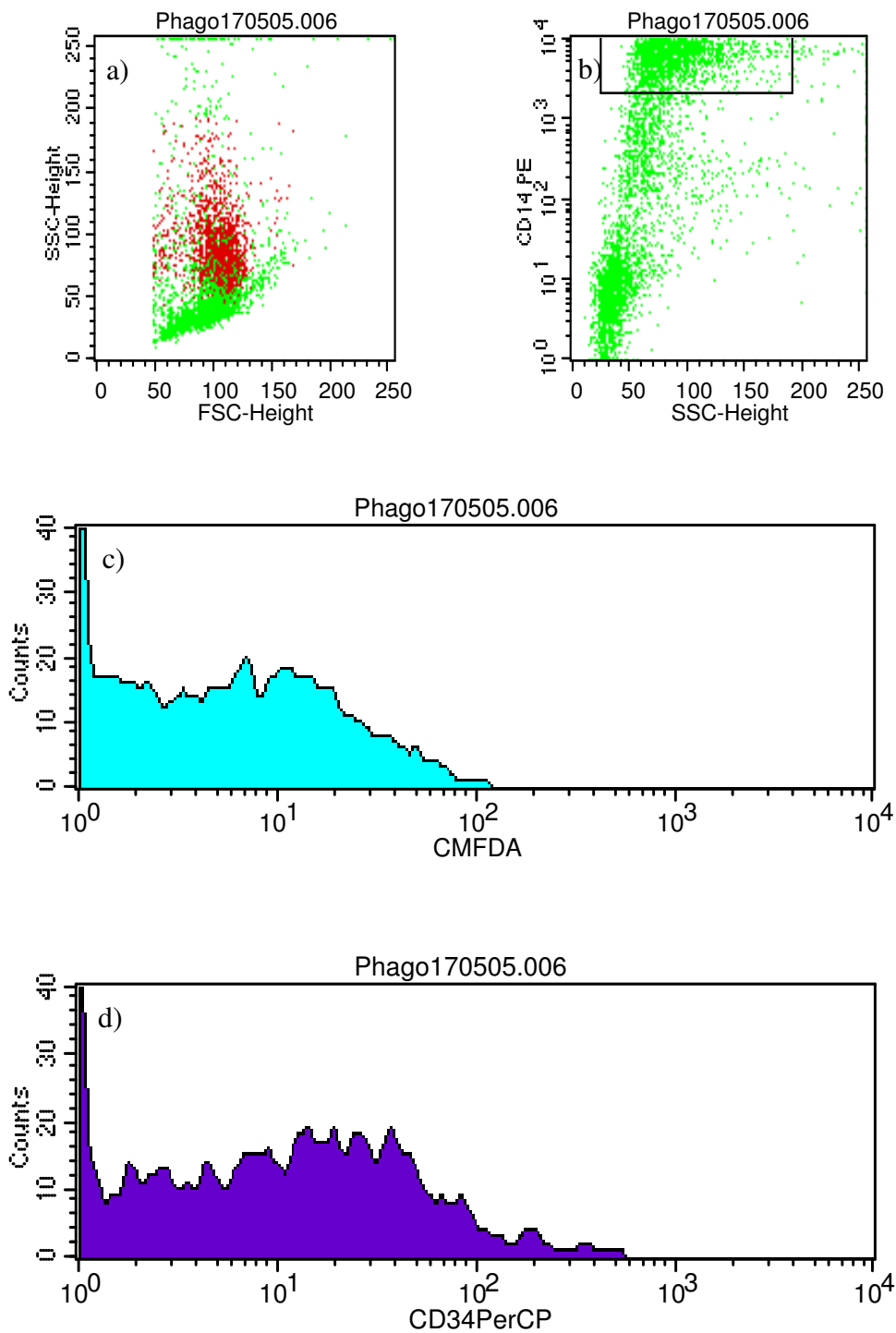


Abb. 8: Beispiel der Auswertung eines Versuchs zur Phagozytose

8a in rot dargestellt: Monozyten

8b im Gate dargestellt: Monozyten

8c: CMFDA-Fluoreszenz: entspricht der Menge phagozytierter Stammzellen

8d: CD34PerCP-Fluoreszenz: entspricht der Menge adhärenter Stammzellen

3.3.8 Klonogenitätsassays

Für das Ansetzen der Klonogenitätsassays wurden isolierte MNCs aus Aphereseprodukten oder kryokonservierte positiv selektionierte Aphereseprodukte verwendet. Die Assays wurden unter sterilen Bedingungen unter der CleanBench durchgeführt. Diese wurde, wie auch alle unter der Bench benutzten Materialien, mit 80%igem Alkohol desinfiziert.

Zunächst wurden je Ansatz 200 µl der Zellen mit derselben Menge AB-Serum bzw. Serum mit HLA-Antikörpern gemischt. Die Zellsuspension wurde 30 min bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert, danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Die Zellen wurden mit RPMI + 10% FCS auf 10-12 x 10³ Zellen pro µl eingestellt. Dabei wurde die Standardanweisung des Instituts für Transfusionsmedizin in einer Modifikation der von Wunder [97] beschriebenen Technik benutzt. Dann wurden 25 x 10³ Zellen in 1 ml Methylcellulose gefüllt, also 75 x 10³ Zellen in 3 ml Methylcellulose. Mit einer sterilen 5-ml-Pipette wurde die Methylcellulose gut durchmischt und es wurden noch 300 µl Penicillin-Streptomycin zugegeben. Zwei Kulturschalen wurden mit je 1 ml des Gemisches gefüllt und das Gemisch durch Schwenken gut verteilt. Eventuell vorhandene Luftblasen wurden mit Hilfe einer sterilen Kanüle zerstoßen. Die Deckel der Kulturschalen wurden verschlossen und die Schalen zusammen mit einer offenen, mit Aqua dest. gefüllten, Schale in eine größere Kulturschale mit geschlossenem Deckel gestellt. Durch das Aqua dest. wurde eine genügend hohe Luftfeuchtigkeit während der folgenden Bebrütungszeit von 14 Tagen gewährleistet. Die Kulturschalen wurden während dieser Zeit bei 37 °C und 5% CO₂ bebrütet.

Bei der mikroskopischen Auswertung nach 14 Tagen wurden die Zellen je nach Wachstum in erythroide Vorstufen (Burst Forming Units, BFU) und myeloide Vorstufen (Colony Forming Units, CFU) eingeteilt. Eine solche BFU bzw. CFU wurde gewertet, wenn mindestens 30 Zellen aus einer einzigen Zelle hervorgegangen waren. Beide Culture-Dishes aus einer Kulturschale wurden vollständig ausgezählt und dann der Mittelwert der BFUs und CFUs aus den beiden Werten gebildet.

3.3.9 Zellkultur

Für die Untersuchungen zur Interaktion zwischen HLA-Antikörper-sensibilisierten Stammzellen und Endothelzellen wurde zunächst eine Zellkultur mit HDMEC-c-Endothelzellen der Firma PromoCell angelegt. Auf diese Weise wurden genügend Zellen für die darauf folgende Küvettenbeladung erhalten. Die Zellen wurden zunächst im Wasserbad aufgetaut und in 10 ml PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen in 1 ml Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche mit 4 ml vorgelegtem Medium gefüllt. Die Flaschen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ aufbewahrt. Nach 24 Stunden wurde der erste Medienwechsel durchgeführt, dann folgte alle 2 Tage ein weiterer Medienwechsel.

Wenn ca. 80 % des Flaschenbodens mit Endothelzellen bedeckt waren, wurden die Zellen zunächst mit je 1 ml PBS pro Flasche bedeckt, die Flasche wurde kurz geschwenkt und das PBS wieder entfernt. Um die Zellen vom Boden zu lösen, wurde 1 ml EDTA-Trypsin hinzugegeben, die Flasche kurz geschwenkt und das EDTA-Trypsin wieder entfernt. Dann wurde die Flasche für 10 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation lösten sich die Zellen vom Flaschenboden und konnten in Medium aufgenommen werden. Je 1 ml Zelllösung wurde nun auf neue Flaschen mit je 4 ml vorgelegtem Medium pipettiert und wie zuvor nach 2 Tagen das Medium gewechselt.

3.3.10 Optischer Biosensor IAsys

Am Optischen Biosensor wurde die Affinität von Stammzellen zu Endothelzellen bestimmt. Dazu wurde zunächst die Versuchsküvette mit Endothelzellen beladen, danach konnte die Affinität von HLA-Antikörper-sensibilisierten Stammzellen im Vergleich zu nicht HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen gemessen werden.

Küvettenbeladung:

Zunächst wurden Aminosilan-Küvetten nach dem Immobilisations-Protokoll aus dem „Methods Guide“ von Thermo Lab Systems mit HDMEC-c-Endothelzellen beladen.

Dazu wurde zu Beginn die Baselinephase mit 3 x 200 µl Natrium-Phosphat-Puffer für 6 Minuten stabilisiert. Nun wurde für 11 Minuten 3 x 200 µl BS³ auf die Küvette pipettiert, so dass das BS³ an die Aminogruppe der Aminosilan-Küvette binden und damit die Oberfläche aktivieren konnte wie in Abb. 9 dargestellt. Das BS³ wurde mit 3 x 200 µl Natrium-Phosphat-Puffer wieder entfernt und in 6 Minuten die Baseline wieder hergestellt. Um die Baseline zu stabilisieren, wurde nochmals 3 x 200 µl Natrium-Phosphat-Puffer für 2 Minuten auf die Küvette gegeben. Nun folgte die Bindung von 1 x 10⁶ HDMEC-c-Endothelzellen an die aktivierte Aminosilanküvette. Dazu wurden die Zellen in 250 µl Natrium-Phosphat-Puffer aufgenommen und auf die Küvette pipettiert, die Bindungszeit betrug 27 Minuten. Nach der Bindung der Zellen wurde die Küvette abermals mit 3 x 200 µl Natrium-Phosphat-Puffer für 3 Minuten gewaschen, danach erfolgte die Bindung von 3 x 200 µl BSA für 15 Minuten. Das BSA reagierte mit den restlichen Ester-Gruppen für unspezifische Proteinbindung auf der Küvette und blockierte so die gebundenen Zellen auf der Oberfläche. Nach dieser Bindung wurde die Küvettenoberfläche mit 3 x 200 µl PBS/Tween für 5 Minuten gewaschen und danach die Baseline mit 3 x 200 µl Natrium-Phosphat-Puffer wieder hergestellt.

HBS wurde als Laufpuffer auf die Küvette gefüllt und diese verschlossen bei 4 °C aufbewahrt.

Das Immobilisierungsprotokoll der HDMEC-c-Zellen ist in Abb. 10 dargestellt.

Zum Zeitpunkt **1** wurden die HDMEC-C-Endothelzellen in Natrium-Phosphat-Puffer auf die Küvette pipettiert. Ein Anstieg der Bindungsintensität ist erkennbar. Zum Zeitpunkt **2** wurde BSA auf die Küvette pipettiert, um die gebundenen Zellen auf der Oberfläche zu blockieren.

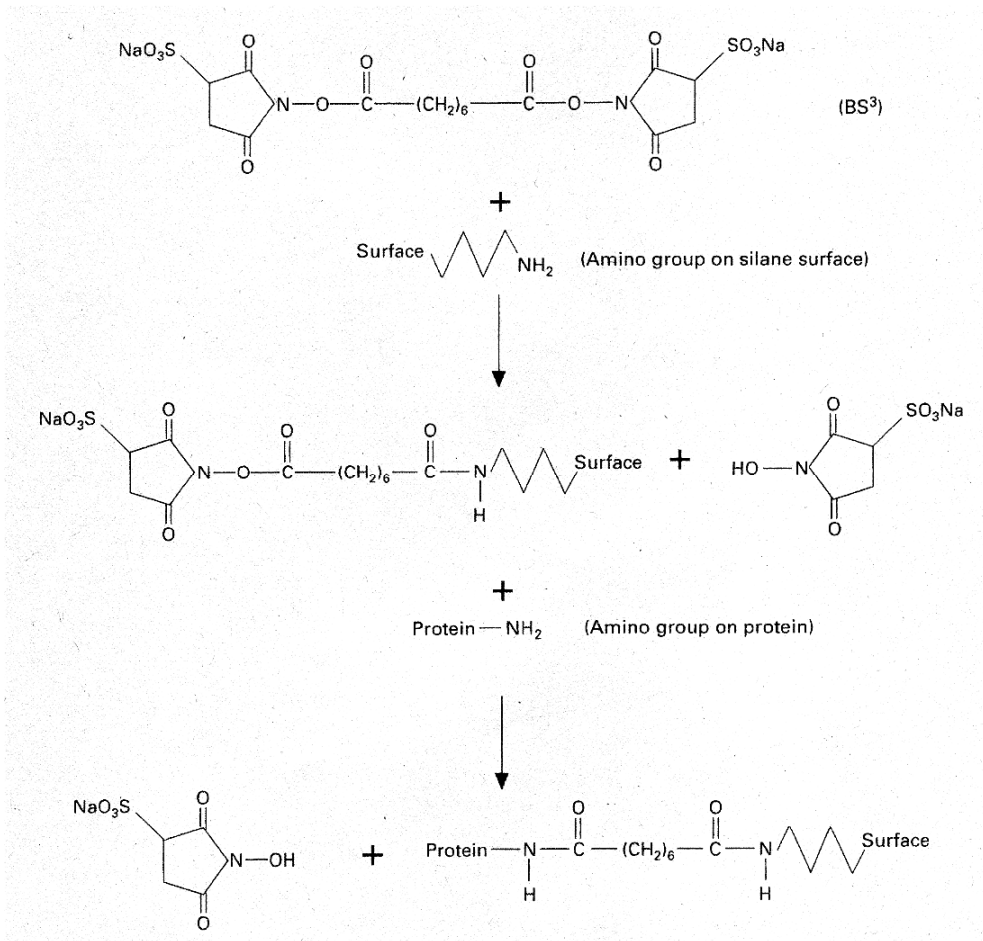


Abb. 9: BS³-Reaktionsschema. Aus: Thermo Lab Systems. Methods Guide, IAsys.

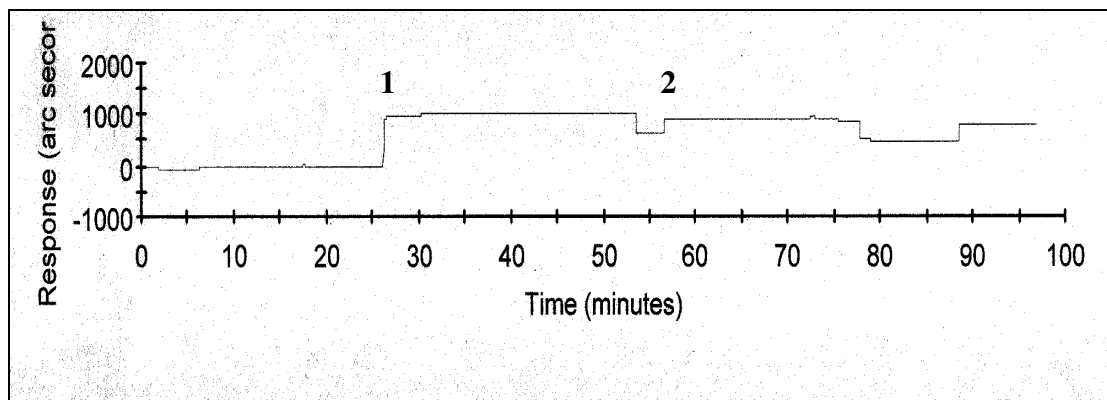


Abb. 10: Immobilisierungsprotokoll von HDMEC-c-Zellen an Aminosilan

Versuche:

Für die Versuche am Optischen Biosensor IAsys wurden 50 µl positiv selektionierte kryokonservierte Blutstammzellen mit einer Reinheit zwischen 90 und 95 % auf 15×10^3 Zellen / µl eingestellt. Die Zellen wurden in 50 µl RPMI + 5% FCS aufgenommen und mit derselben Menge AB-Serum bzw. HLA-Antikörper-Serum für 30 min bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen und bei 1200 U/min zentrifugiert. Dann wurden die Zellen für die Messung mit 200 µl HBS aufgefüllt.

Für die Messung wurde zunächst die Baselinephase mit 3 x 120 µl HBS für 2 min hergestellt. Dann wurden für 5 min 200 µl Stammzellen zugegeben und danach mit 3 x 120 µl HBS die Küvette für 10 min gespült. Zur Regeneration der Küvettenoberfläche wurde 3 x 120 µl 10 mM HCl auf die Küvette pipettiert, direkt danach folgten 3 x 120 µl 1 mM HCl für 2 min. Um die Baseline wieder zu stabilisieren und das HCl zu entfernen, wurde 3 x 120 µl HBS für 2 min auf die Küvette pipettiert. Für den nächsten Versuch konnte danach mit der Bindung der nächsten Zellen fortgefahren werden. In Abb. 11 ist eine Versuchsserie mit sechs Messungen dargestellt. Zum Zeitpunkt ▼ wurden jeweils die Stammzellen auf die Küvette pipettiert.

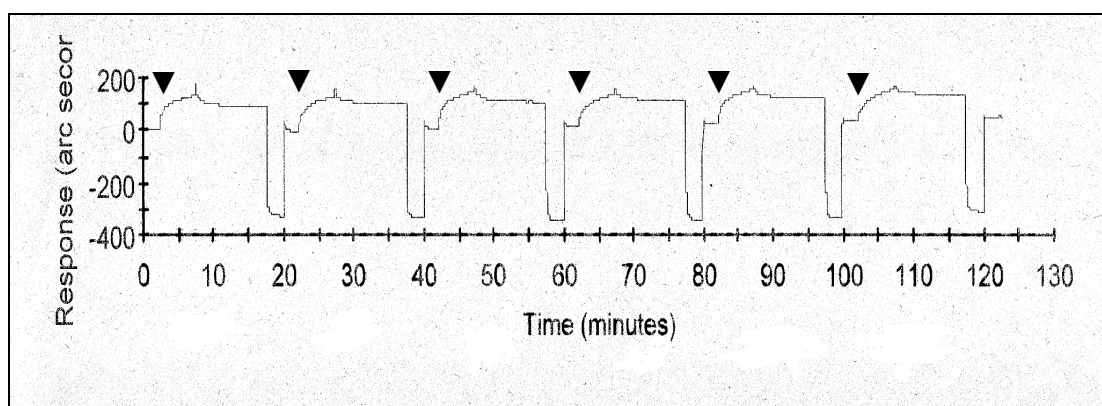


Abb. 11: Diagramm des optischen Biosensors mit drei Messdurchgängen (jeweils mit HLA-AK-Serum und AB-Serum) an einer Stammzellpräparation

3.3.11 Statistik

Von allen gemessenen Werten wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen bestimmt. Die Ergebnisse von verschiedenen Versuchen an einer Stammzellpräparation wurden jeweils zusammengefasst und wiederum Mittelwert und Standardabweichung bestimmt.

Die weitere statistische Auswertung erfolgte mit der Software SPSS für Windows. Zum Vergleich der Daten wurde in jedem Versuch der nicht-parametrische Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben durchgeführt, dabei wurde ein Wert von $p < 0,05$ als statistisch signifikant angenommen. Für diese Auswertung wurden für jeden Versuch die Ergebnisse aller drei einzelnen Versuchsansätze jeder Stammzellpräparation zusammengefasst, so dass eine potentielle Signifikanz zwischen den HLA-Antikörper-sensibilisierten und den nicht HLA-AK-sensibilisierten Stammzellpräparationen berechnet werden konnte. Hierfür wurde auch die Standardabweichung zwischen den verschiedenen Mittelwerten der einzelnen Stammzellpräparationen berechnet. Die zuvor berechneten Standardabweichungen zwischen den Werten der drei einzelnen Versuchsansätze jeder Stammzellpräparation wurden außer Acht gelassen. Es wird davon ausgegangen, dass sich die systematischen Fehler der Einzelversuche ausgleichen und dass somit der fehlerfreie wahre Mittelwert dargestellt wird.

In allen dargestellten Diagrammen werden die Signifikanzwerte aufgezeigt. Wenn keine Signifikanz nachgewiesen werden konnte, sind die Werte in Klammern dargestellt, so dass trotz fehlender Signifikanz eine eventuell vorhandene Tendenz erkannt werden kann.

4 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Wechselwirkung von hämatogenen Stammzellen mit spezifischen HLA-Antikörpern gegenüber nicht HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen untersucht werden. Dazu wurden in vitro verschiedene Versuche durchgeführt.

4.1 Bindung von HLA-Antikörpern an Stammzellen – „Crossmatch“

In diesem Versuch wurde überprüft, ob und in welchem Ausmaß spezifische HLA-Antikörper an humane Stammzellen binden – also ob es eine entsprechende Expression korrespondierender HLA-Antigene auf Stammzellen gibt.

Die Versuche wurden am Durchflusszytometer ausgewertet, wie zuvor in Abb. 3 dargestellt. In Abb. 12 ist beispielhaft ein Ergebnis in Histogrammform dargestellt.

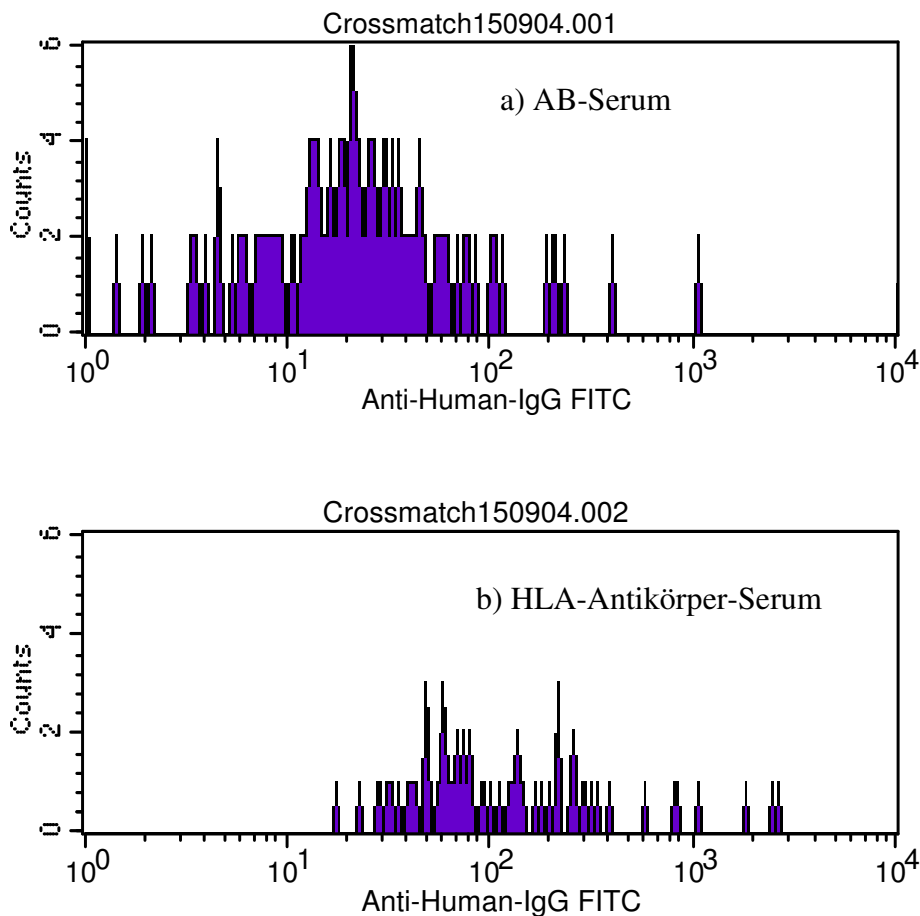


Abb. 12: Beispiel eines Crossmatch-Versuchsergebnisses

Zur genaueren Darstellung werden zunächst die Versuchsergebnisse der fünf untersuchten Stammzellpräparationen nacheinander mit ihren Standardabweichungen in einem Säulendiagramm einzeln dargestellt (Abb. 13). Dabei wird für jede Stammzellpräparation zunächst die AB-Serum-Kontrollgruppe und danach die mit spezifischen HLA-Antikörpern sensibilisierte Stammzellgruppe gezeigt.

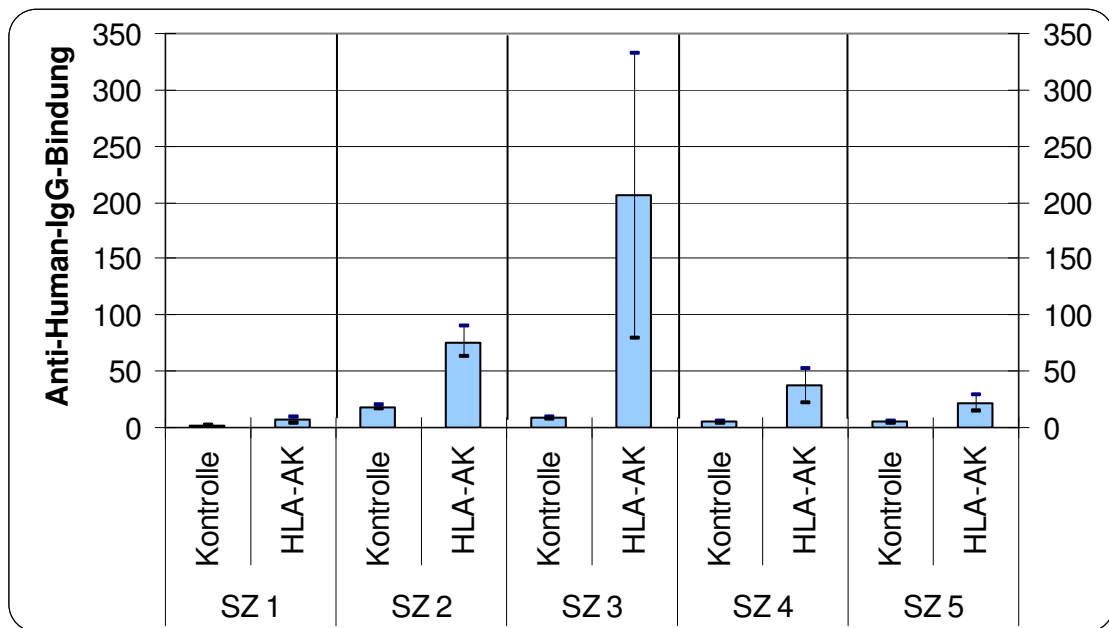


Abb. 13: Ergebnisübersicht der Versuche zum Crossmatch

Es zeigt sich bei jeder Stammzellpräparation ein Unterschied in der Stärke der Anti-Human-IgG-Bindung zwischen den sensibilisierten und den nicht sensibilisierten Zellen. Es fällt eine bei jeder Präparation erhöhte Anti-Human-IgG-Bindung der HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen gegenüber der AB-Serum-Kontrollgruppe auf, die jedoch von Stammzellpräparation zu Stammzellpräparation stark variiert.

In Tab. 1 werden die zusammengefassten Ergebnisse mit dem Ergebnis der Signifikanztestung dargestellt. Der Unterschied der Anti-Human-IgG-Bindung der HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen im Vergleich zu den nicht HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen ist mit $p=0,043$ signifikant.

Tab. 1: Zusammenfassung der Ergebnisse des Crossmatch

CROSSMATCH	MW ± SD
Kontrollgruppe	12,14 ± 10,43
Spez. HLA-Antikörper	106,32 ± 101,58
	<i>p = 0,043</i>

Zum Vergleich der Anti-Human-IgG-Bindung von HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen und Stammzellen, die mit zum exprimierten Antigen nicht korrespondierenden HLA-Antikörpern inkubiert wurden und folglich nicht sensibilisiert sein dürften, werden in Tab. 2 die Versuche an zwei Stammzellpräparationen einzeln dargestellt. Zusätzlich dargestellt sind auch die Ergebnisse der Kontrollgruppe, die mit AB-Serum inkubiert wurde und somit ebenfalls keine positiven Ergebnisse zeigen dürfte.

Tab. 2: Einzeldarstellung des Crossmatches an zwei verschiedenen Stammzellpräparationen

Zugegebenes Serum	Antigenspezifität	Antikörperspezifität	MW ± SD
	Präparation I		
AB-Serum Nr. 2	A1, -	-	4,94 ± 0,59
AB-Serum Nr. 4	A1, -	-	4,16 ± 0,68
AB-Serum Nr. 28	A1, -	-	4,03 ± 0,72
HLA-AK Nr. 1	A1, -	Anti A1	50,86 ± 3,40
HLA-AK Nr. 2	A1, -	Anti A1	23,04 ± 6,48
HLA-AK Nr. 3	A1, -	Anti A19	9,22 ± 2,12
	Präparation II		
AB-Serum Nr. 1	A2, A3	-	8,23 ± 1,93
AB-Serum Nr. 2	A2, A3	-	8,60 ± 0,82
AB-Serum Nr. 3	A2, A3	-	8,94 ± 2,61
HLA-AK Nr. 10	A2, A3	Anti A2	186,19 ± 89,34
HLA-AK Nr. 16	A2, A3	Anti A3	225,49 ± 175,31
HLA-AK Nr. 1	A2, A3	Anti A1	72,02 ± 47,57

Bei der Signifikanztestung zwischen den Mittelwerten der hier aufgeführten HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen und den zum HLA-Antigen nicht korrespondierenden HLA-Antikörpern ist mit $p = 0,179$ keine Signifikanz zu erkennen.

Die Mittelwerte der mit HLA-Antikörpern anderer Spezifität sensibilisierten Stammzellen (in der Tabelle grün dargestellt) liegen in beiden Fällen zwischen den Werten der sensibilisierten Stammzellen (rot dargestellt) und den Werten der Kontrollgruppe (blau dargestellt). Es zeigt sich aber ein deutlicher Trend der Werte der HLA-Antikörper anderer Spezifität zu den Werten der Kontrollgruppe hin. Eine gewisse unspezifische Bindung der HLA-Antikörper ist somit zu erkennen.

4.2 Klonogenität von Stammzellen

In diesen Versuchen wurde überprüft, in wie weit sich die HLA-AK-Sensibilisierung von Stammzellen auf deren Fähigkeit zur Proliferation auswirkt.

Die Darstellung der Ergebnisse der Klonogenitätsassays erfolgt getrennt für die nachgewiesenen erythroiden Burst-forming-Units (Abb. 14) und andere myeloide Colony-forming-Units (Abb.15).

Zunächst werden die Ergebnisse für jede Stammzellpräparation mit den entsprechenden Standardabweichungen einzeln dargestellt. Dabei wird zunächst jeweils die mit HLA-Antikörpern sensibilisierte Stammzellpräparation und danach die Kontrollgruppe gezeigt.

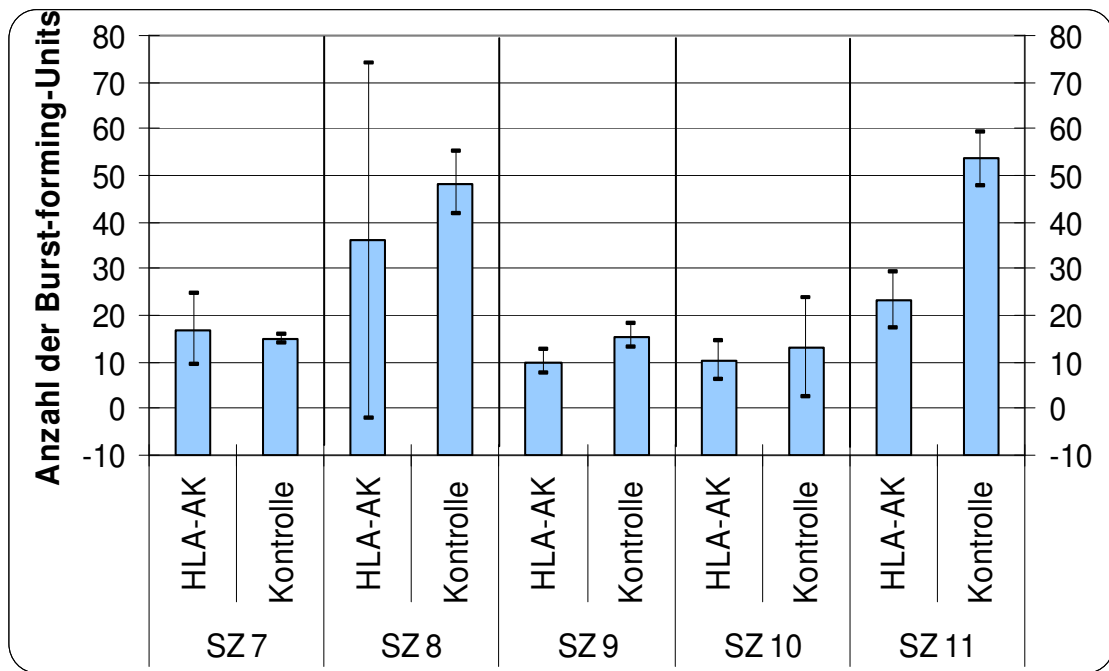


Abb. 14: Ergebnisübersicht der BFUs aus den Klonogenitätsassays

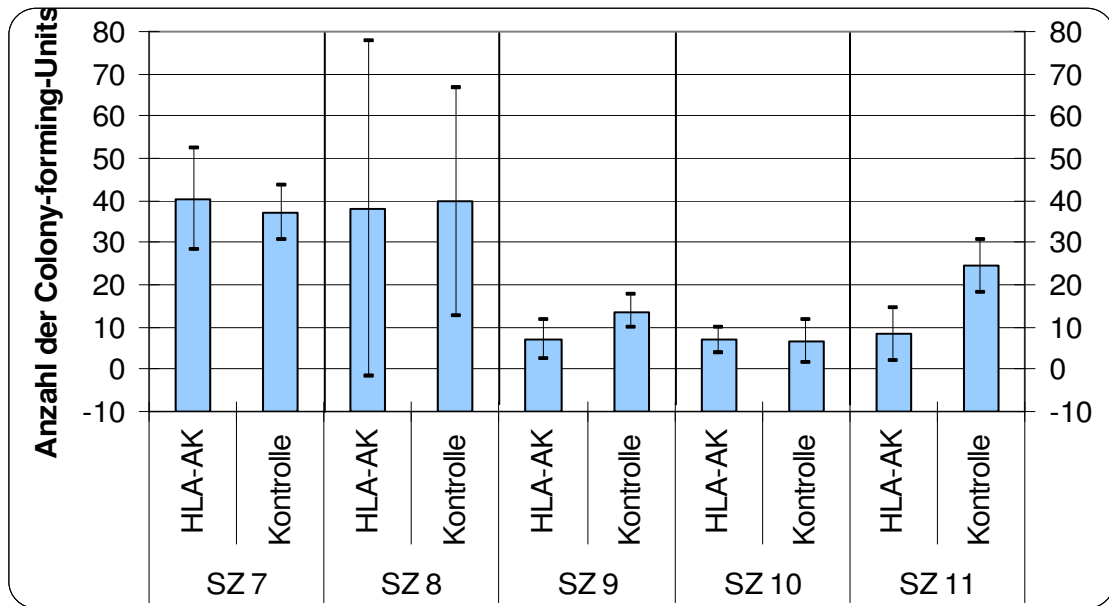


Abb. 15: Ergebnisübersicht der CFUs aus den Klonogenitätsassays

Bei der Auswertung der Burst-forming-Units erkennt man außer bei Stammzellpräparation Nr.7 in jedem Versuch ein stärkeres Wachstum der mit AB-Serum inkubierten Zellen, also der Kontrollgruppe.

Bei der Auswertung der Colony-forming-Units ist diese Tendenz weniger deutlich ausgeprägt. Ein deutlich stärkeres Wachstum der Kontrollgruppe ist hier nur bei den Stammzellpräparationen Nr.9 und Nr.11 erkennbar. Bei Stammzellpräparation Nr.8 ist ein leicht stärkeres Wachstum der Kontrollgruppe zu sehen.

Für die Signifikanztestung wurden die Auswertungen der Colony-forming-Units und der Burst-forming-Units jeweils zusammengefasst. Das Ergebnis der Signifikanztestung (nach dem Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben) ist in Tab. 3 und Tab. 4 dargestellt.

Tab. 3: Zusammenfassung der Ergebnisse der BFUs

KLONOGENITÄTSASSAYS	
Burst-forming-Units	MW ± SD
Kontrollgruppe	29,05 ± 20,03
Spez. HLA-AK	19,35 ± 10,77
	(p = 0,08)

Dieses Ergebnis ist mit $p = 0,08$ nicht signifikant. Demzufolge konnte in diesen Versuchen eine Inhibition der Klonogenität durch HLA-Antikörper nicht nachgewiesen werden.

Tab. 4: Zusammenfassung der Ergebnisse der CFUs

KLONOGENITÄTSASSAYS	MW \pm SD
Colony-forming-Units	
Kontrollgruppe	24,35 \pm 14,31
Spez. HLA-AK	20,15 \pm 17,35
	($p = 0,345$)

Dieses Ergebnis ist mit $p = 0,345$ nicht signifikant. Auch hier konnte keine Inhibition der Klonogenität durch HLA-Antikörper nachgewiesen werden.

Es zeigt sich, dass die Ergebnisse sowohl der Burst-forming-Units mit $p = 0,08$ als auch der Colony-forming-Units mit $p = 0,345$ nicht signifikant sind. Es lässt sich allerdings auch erkennen, dass in beiden Versuchsteilen die mit AB-Serum inkubierten Stammzellpräparationen stärker gewachsen sind als die mit HLA-Antikörpern sensibilisierten Stammzellen.

4.3 Apoptotisches Verhalten von Stammzellen

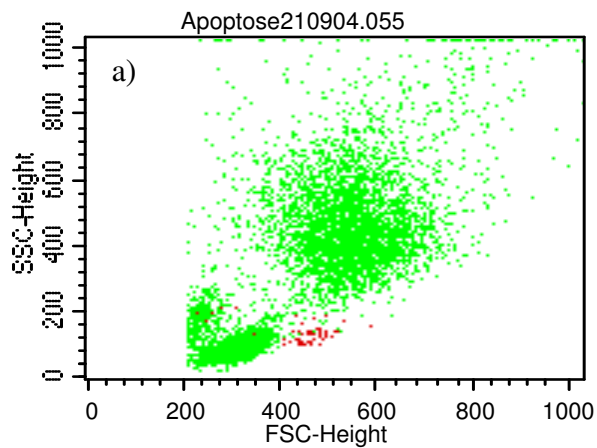
In diesem Versuch wurde überprüft, ob HLA-AK-sensibilisierte Stammzellen ein stärkeres Apoptoseverhalten zeigen als nicht HLA-AK-sensibilisierte Stammzellen.

Für die Apoptoseversuche wurden die Auswertungen in Dotplots und Histogrammen des Durchflusszytometers erstellt, wie in „Material und Methoden“ beschrieben.

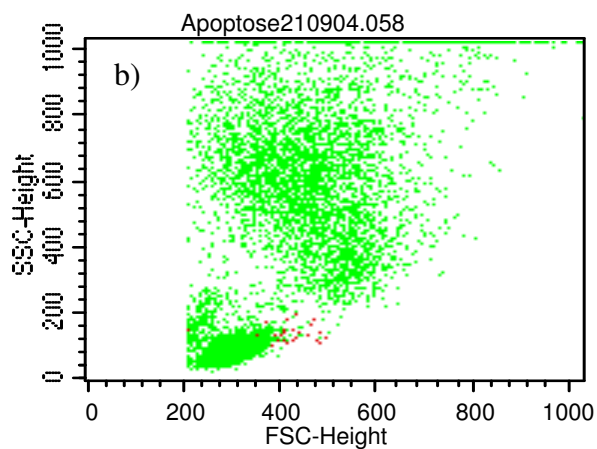
Insgesamt ist festzustellen, dass bei der 24- und 36-Stunden-Messung die HLA-AK-sensibilisierten Zellen in der Punktwolke ein anderes Streulichtverhalten zeigen als die nicht mit HLA-Antikörpern sensibilisierten Stammzellen. Besonders auffällig ist diese Veränderung im Bereich der Granulozyten. Trotzdem sind die CD34+-

Zellpopulationen immer gut abgrenzbar, so dass durch das heterogene Streulichtverhalten kein Einfluss auf die Ergebnisse anzunehmen ist.

Zur Verdeutlichung dieser Gegebenheit ist in Abb. 16 exemplarisch die 36-Stunden-Messung im Vergleich von HLA-AK-sensibilisierten und nicht HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen dargestellt:



a) AB-Serum



b) HLA-Antikörper-Serum

Abb. 16: Beispiel für die Streuung der Granulozyten nach Inkubation mit HLA-Antikörper-Serum bei einer 36-Stunden-Messung

Rot dargestellt: Stammzellen

Grün in zentraler Punktwolke dargestellt: Granulozyten

Die Auswertung der Versuche zum Apoptoseverhalten wird zunächst als Übersicht dargestellt, hierfür wurden alle Versuche zusammengefasst (Abb. 17).

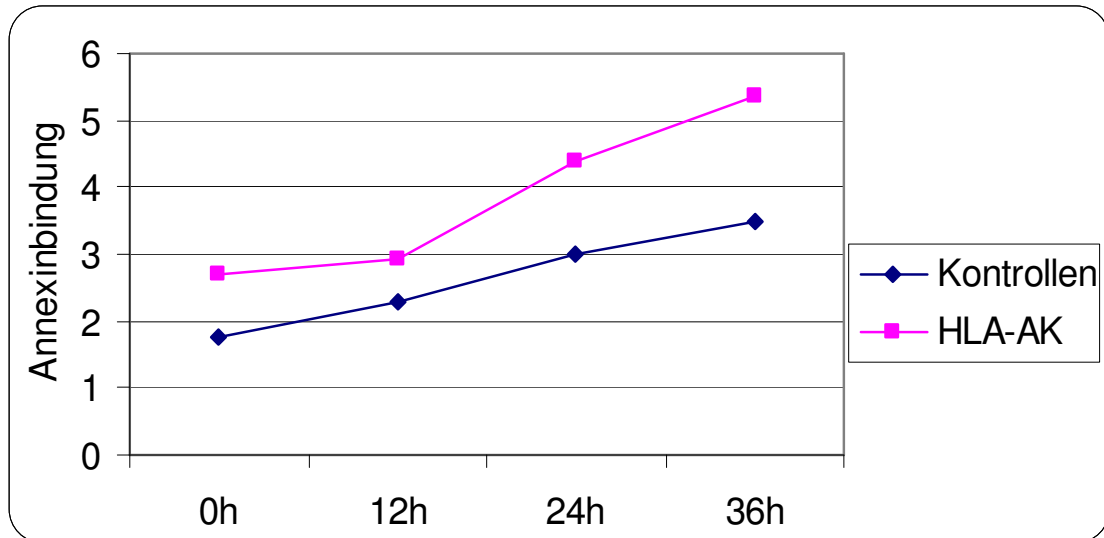


Abb. 17: Zusammenfassende Übersicht aller Apoptose-Ergebnisse. Eine detailliertere Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen folgt in Tab. 5.

Es ist erkennbar, dass schon zu Beginn des Versuches die Annexinbindung der HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen höher ist als die der nicht HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen. Eine Signifikanz ist zu diesem Zeitpunkt nicht nachweisbar. Gegen Ende der Versuche weisen die HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen eine wesentlich höhere Annexinbindung gegenüber den nicht HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen auf. Eine Signifikanz liegt beim 24-Stunden-Messzeitpunkt und beim 36-Stunden-Messzeitpunkt jeweils mit $p = 0,043$ vor.

Die Einzelergebnisse der verschiedenen Zeitabschnitte der Versuche mit den fünf verschiedenen Stammzellpräparationen werden in Tab. 5 dargestellt.

Tab. 5: Einzelergebnisse der Versuche zur Apoptose, dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung

	0h		12h		24h		36h	
	AB- Serum	HLA- AK	AB- Serum	HLA- AK	AB- Serum	HLA- AK	AB- Serum	HLA- AK
SZ 2	4,02 ± 1,35	8,13 ± 2,66	3,65 ± 0,75	7,71 ± 3,67	4,78 ± 0,58	7,85 ± 2,52	5,58 ± 0,83	9,30 ± 3,15
SZ 3	1,72 ± 0,21	1,61 ± 0,55	3,92 ± 0,61	3,68 ± 0,83	4,21 ± 0,68	4,70 ± 0,96	4,46 ± 0,79	6,37 ± 0,77
SZ 4	1,01 ± 0,01	1,14 ± 0,29	1,61 ± 0,11	1,10 ± 0,07	1,80 ± 0,26	1,89 ± 0,55	1,83 ± 0,51	2,21 ± 0,61
SZ 5	1,00 ± 0,01	1,89 ± 1,36	1,27 ± 0,30	1,03 ± 0,05	1,47 ± 0,28	2,00 ± 0,77	2,46 ± 0,66	3,60 ± 1,27
SZ 6	1,02 ± 0,04	1,02 ± 0,02	1,46 ± 0,37	1,03 ± 0,06	2,66 ± 0,52	5,49 ± 3,40	3,20 ± 0,75	42,8 ± 15,99

Die Signifikanzberechnung wurde nach Zusammenfassung aller Ergebnisse für jeden Zeitabschnitt einzeln durchgeführt. Dabei wird in Abb. 18 für jede Stammzellpopulation zunächst die AB-Serum-Kontrollgruppe und danach die mit HLA-Antikörpern sensibilisierte Stammzellgruppe gezeigt.

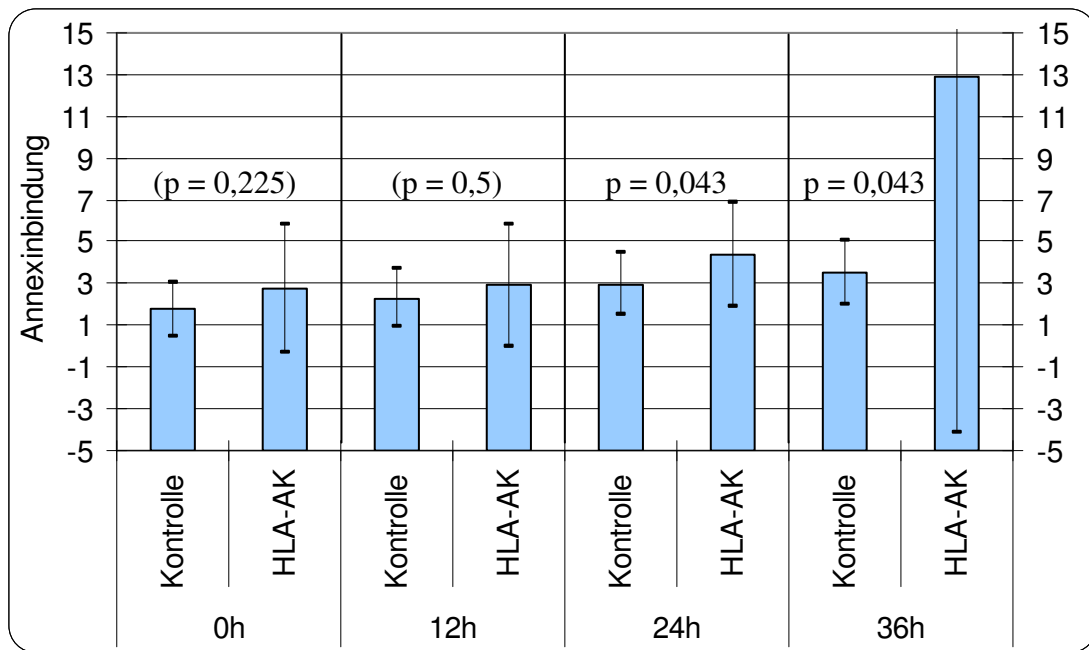


Abb. 18: Ergebnisübersicht der Apoptose-Versuche

Nach 0 und 12 Stunden Versuchszeit sind noch keine signifikanten Unterschiede in der Annexinbindung zwischen den HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen und den nicht HLA-AK-sensibilisierten Zellen zu erkennen. Die mittlere Annexinbindung der HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen ist zu diesem Zeitpunkt tendenziell höher als die der nicht HLA-AK-sensibilisierten Zellen. Zu Beginn des Versuches ist $p = 0,225$, nach 12 Stunden Versuchszeit ist $p = 0,5$. Nach 24 und 36 Stunden Versuchszeit ist der Unterschied der mittleren Annexinbindung zwischen HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen und der Kontrollgruppe in beiden Fällen mit $p = 0,043$ signifikant.

Die hohe Standardabweichung der HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen zum 36-h-Messzeitpunkt kommt durch den hohen Messwert einer der Stammzellpräparationen im Vergleich zu den vier anderen Stammzellpräparationen zustande. Da dieser Wert jedoch durch dreimalige Messung in drei verschiedenen Versuchsansätzen bestätigt wurde, ist nicht von einer Fehlmessung auszugehen. Der Wert wurde in die Auswertung mit einbezogen.

Zum Vergleich der Annexinbindung von HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen und Stammzellen, die mit HLA-Antikörpern anderer Spezifität inkubiert wurden, werden in Tab. 6 und Abb. 19 die Ergebnisse aller Versuche gemeinsam dargestellt.

Tab. 6: Zusammenfassung der Apoptose-Ergebnisse

APOPTOSE		AB-Serum-Kontrolle	Spezifische HLA-AK	HLA-AK anderer Spezifität
0 Stunden	MW ± SD	1,76 ± 1,31	2,76 ± 3,03	2,51 ± 1,69
12 Stunden	MW ± SD	2,29 ± 1,37	2,91 ± 2,91	2,41 ± 1,52
24 Stunden	MW ± SD	2,98 ± 1,46	4,39 ± 2,51	3,17 ± 1,45
36 Stunden	MW ± SD	3,51 ± 1,52	12,86 ± 16,96	3,90 ± 2,06

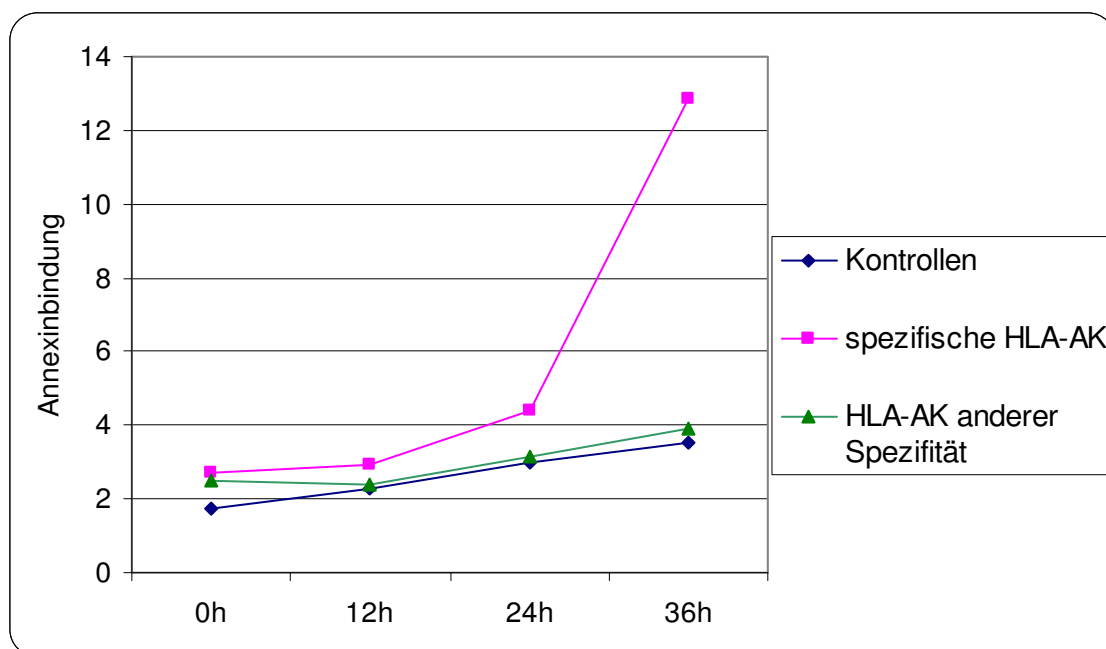


Abb. 19: Zusammenfassung der Apoptose-Ergebnisse

Die Ergebnisse der Messungen sind im gegenseitigen Vergleich von spezifischen HLA-Antikörpern und HLA-Antikörpern anderer Spezifität zu keinem Messzeitpunkt signifikant. Mit $p = 0,0796$ lässt sich aber sowohl zum 24- als auch zum 36-Stunden-Messzeitpunkt ein eindeutiger Trend erkennen.

Die Ergebnisse der mit HLA-Antikörpern anderer Spezifität inkubierten Stammzellen liegen im Bereich der Ergebnisse der mit AB-Serum inkubierten Stammzellen. Dies wird besonders nach 12, 24 und 36 Stunden Versuchsdauer deutlich.

Demzufolge kann davon ausgegangen werden, dass spezifische HLA-Antikörper – das heißt HLA-Antikörper mit korrespondierenden Antigenen auf Stammzellen – auch einen spezifischen Einfluss auf die Annexinbindung von Stammzellen ausüben.

4.4 Phagozytoseverhalten von Stammzellen

In diesem Versuch wurde die Phagozytoserate von HLA-Antikörper-sensibilisierten versus nicht HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen durch „third-part“-Effektorzellen untersucht.

Die Ergebnisse der Phagozytoseexperimente werden getrennt nach an Monozyten adhärennten Stammzellen und phagozytierten Stammzellen dargestellt.

Bei diesen Versuchen wurden die Stammzellpräparationen 7 und 8 zweifach verwendet. Die zweite Versuchsreihe wurde jeweils mit HLA-Antikörper-Seren anderer Patienten durchgeführt und daher separat aufgeführt.

In Abb. 20 werden für die Adhärenz die Mittelwerte der gemessenen Ergebnisse der einzelnen Stammzellpräparationen mit ihren Standardabweichungen gezeigt.

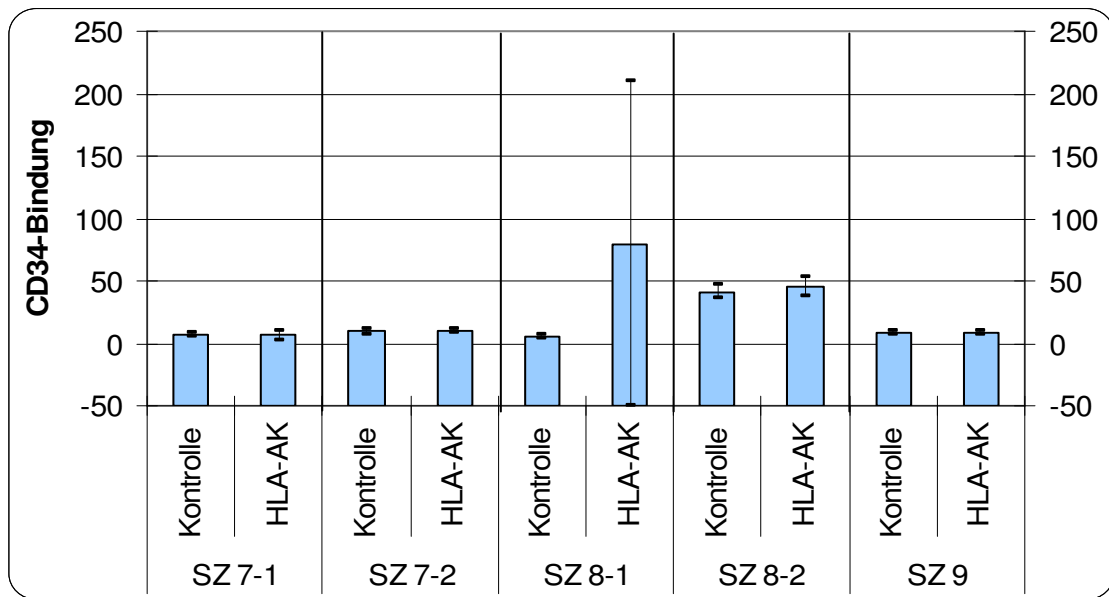


Abb. 20: Mittelwerte und Standardabweichungen der Adhärenz

Bei der Adhärenz ist bei den Stammzellpräparationen 8-2 und 9 die CD34-Bindung und damit die Adhärenz der HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen an Monozyten leicht stärker als die der nicht HLA-AK-sensibilisierten Zellen. Bei der Stammzellpräparation 8-1 liegt ein sehr deutlicher Unterschied vor. Bei den Stammzellpräparationen 7-1 und 7-2 ist es umgekehrt, hier ist die Adhärenz der Stammzellen der Kontrollgruppe leicht stärker.

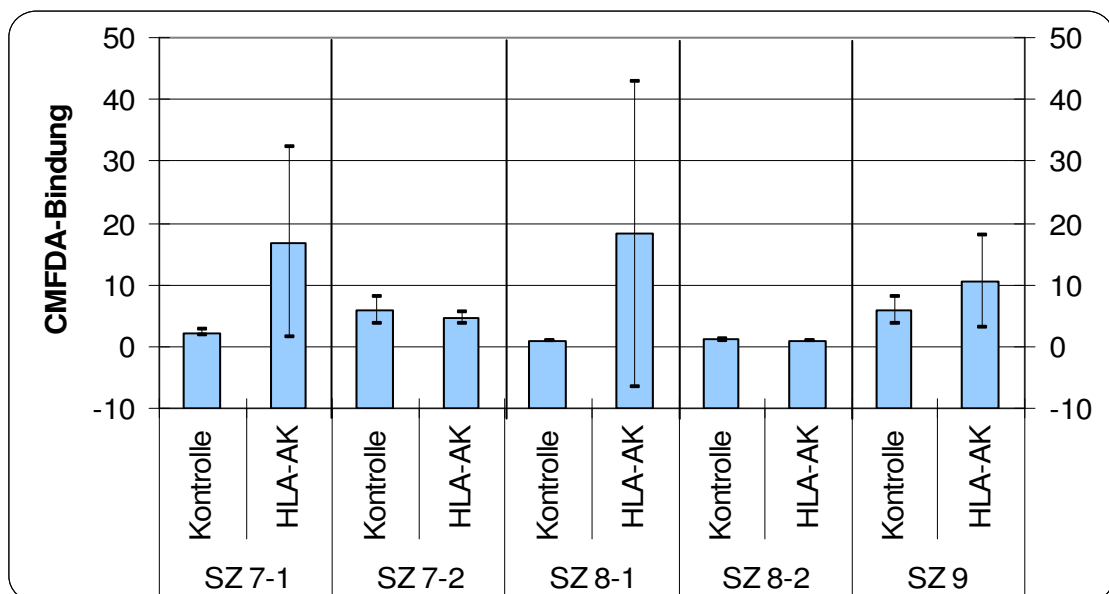


Abb. 21: Mittelwerte und Standardabweichungen der Phagozytose

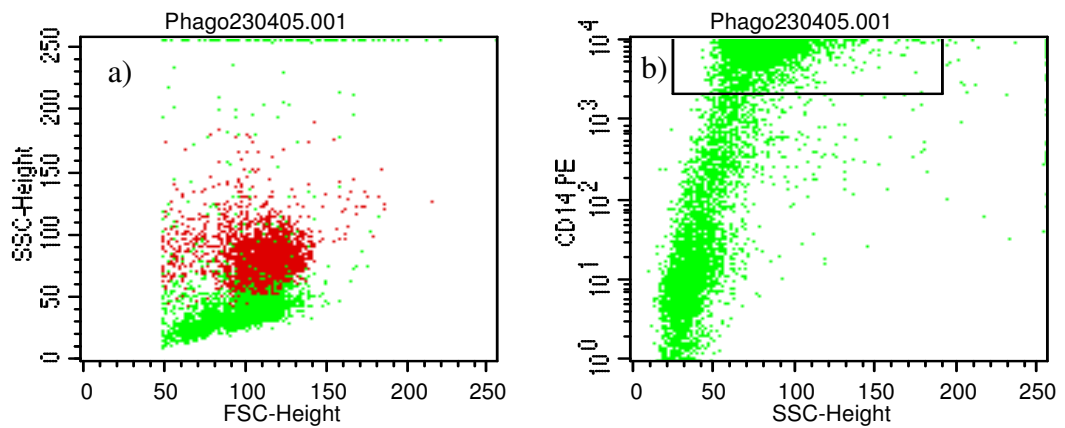
Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Phagozytose sind in Abb. 21 dargestellt. Bei den Stammzellpräparationen 7-1 und 8-1 ist jeweils die CMFDA-Bindung der HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen deutlich höher als die CMFDA-Bindung der nicht HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen. Bei der Stammzellpräparation 9 liegt ein leichter Unterschied vor. Das heißt, dass die HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen in größerem Ausmaß phagozytiert wurden als die Stammzellen der Kontrollgruppe. Bei den Stammzellpräparationen 7-2 und 8-2 ist es umgekehrt. Hier ist nur ein geringgradiger Unterschied zwischen den Versuchs- und den Kontrollgruppen zu erkennen.

Es ist anzumerken, dass bei den Stammzellpräparationen 7-1 und 8-1 jeweils bei den Versuchen mit den HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen in allen drei einzelnen Versuchsansätzen das Bild der Stammzellen bei der Versuchsauswertung im Dotplot verändert war. Zur besseren Darstellung ist eine dieser Punktwolken in Abb. 22 aufgeführt. Es ist erkennbar, dass die Zahl der CD14-positiven Zellen in dem entsprechenden Monozyten-Gate stark reduziert ist. Die wenigen vorhandenen Zellen weisen aber bei beiden Stammzellpräparationen eine hohe CMFDA-Bindung und im Fall der Stammzellpräparation 8-1 auch eine hohe CD34-Bindung auf. Es kann also davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Zellen im Gate tatsächlich - trotz der veränderten Darstellung - um Monozyten mit adhärenenten bzw. phagozytierten Stammzellen handelt.

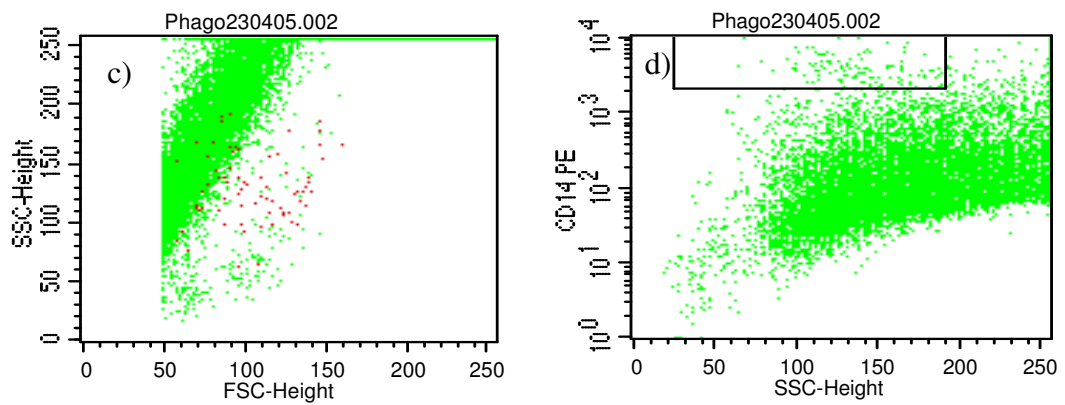
Diese Veränderung im Zellbild war bei Verwendung des AB-Serums nicht zu erkennen. Es ist also davon auszugehen, dass die Veränderung durch bestimmte Substanzen im HLA-AK-Serum zustande kam, die im AB-Serum nicht enthalten waren.

Bei der Stammzellpräparation 9 ist ebenfalls von einer ähnlichen Substanz auszugehen. In diesem Fall wurde nicht das Zellbild verändert, sondern die Zellzahl drastisch vermindert.

In Abb. 22 ist beispielhaft eine veränderte Darstellung der Zellen im Dotplot dargestellt.



a und b: AB-Serum



c und d: HLA-Antikörper-Serum

Abb. 22: Beispiel einer durch HLA-Serum veränderten Dotplot-Darstellung

Rot dargestellt in 22a und 22c: Monozyten

Im Gate dargestellt in 22b und 22d: Monozyten

Zum besseren Überblick und zur Signifikanztestung werden die zusammengefassten Ergebnisse der Adhärenz und der Phagozytose in Diagrammform in Abb. 23 und Abb. 24 dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität aus den einzelnen Versuchen. Die CD34-Intensität stellt ein Maß für die Adhärenz der Stammzellen an den Monozyten und die CMFDA-Intensität ein Maß für die Phagozytose der Stammzellen durch die Monozyten dar.

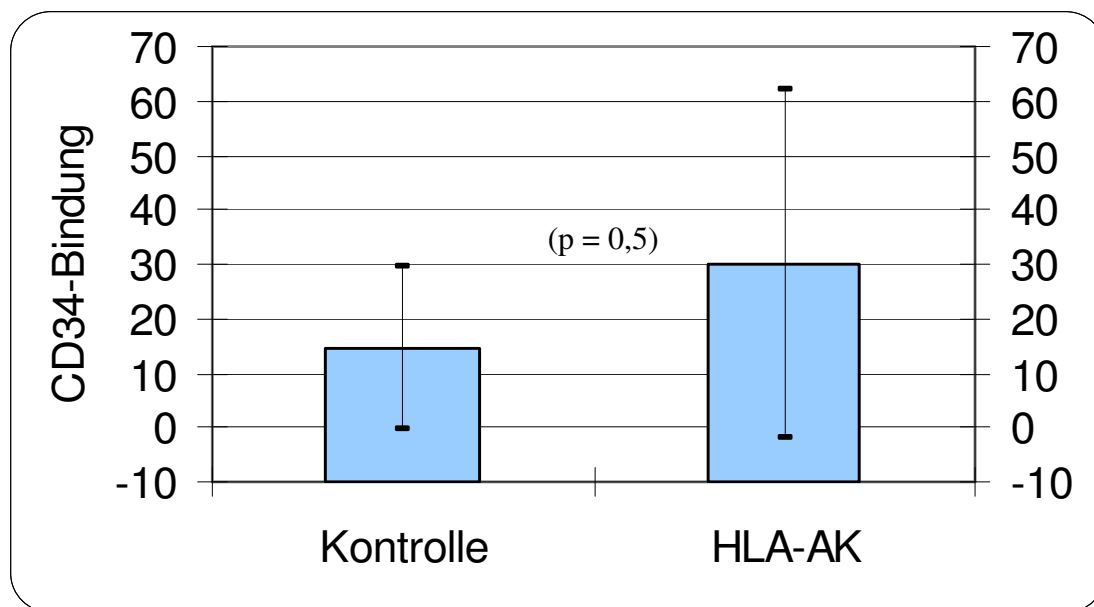


Abb. 23: Zusammenfassung der Ergebnisse der Adhärenz

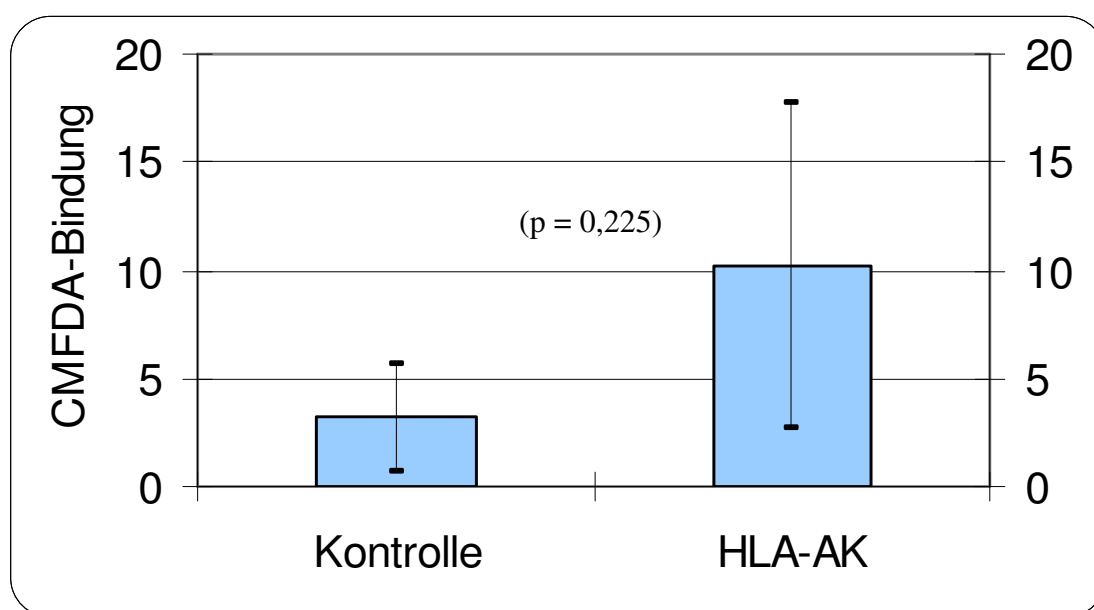


Abb. 24: Zusammenfassung der Ergebnisse der Phagozytose

Die Ergebnisse sind sowohl für die Adhärenz mit $p = 0,5$ als auch für die Phagozytose mit $p = 0,225$ nicht signifikant. Es zeigt sich jedoch für die HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen ein Trend zur stärkeren Adhärenz der Zellen an Monozyten. Auch die Phagozytose ist stärker ausgeprägt als für die Kontrollgruppe der nicht HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen.

4.5 Verhalten der Stammzellen im optischen Biosensorsystem

In diesen Versuchen wurde untersucht, ob die HLA-Antikörper-Sensibilisierung der Stammzellen deren Affinität zu Gefäßendothelzellen beeinflusst.

Um einen umfassenden Überblick über die Ergebnisse zu erhalten, erfolgt die Darstellung der Ergebnisse zunächst nach Stammzellpräparationen und Versuchen getrennt (Abb. 25). Es werden jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Messungen angezeigt. Sie dienen als Maß für die Affinität der HLA-Antikörper-sensibilisierten Stammzellen und der nicht HLA-AK-sensibilisierten Kontrollgruppe zum Endothel auf der Aminosilan-Versuchsküvette.

Für jede Stammzellpräparation wurde der Versuch mit zwei verschiedenen AB-Kontroll-Seren und mit zwei verschiedenen HLA-Antikörper-Seren mit jeweils korrespondierenden Antigenen durchgeführt.

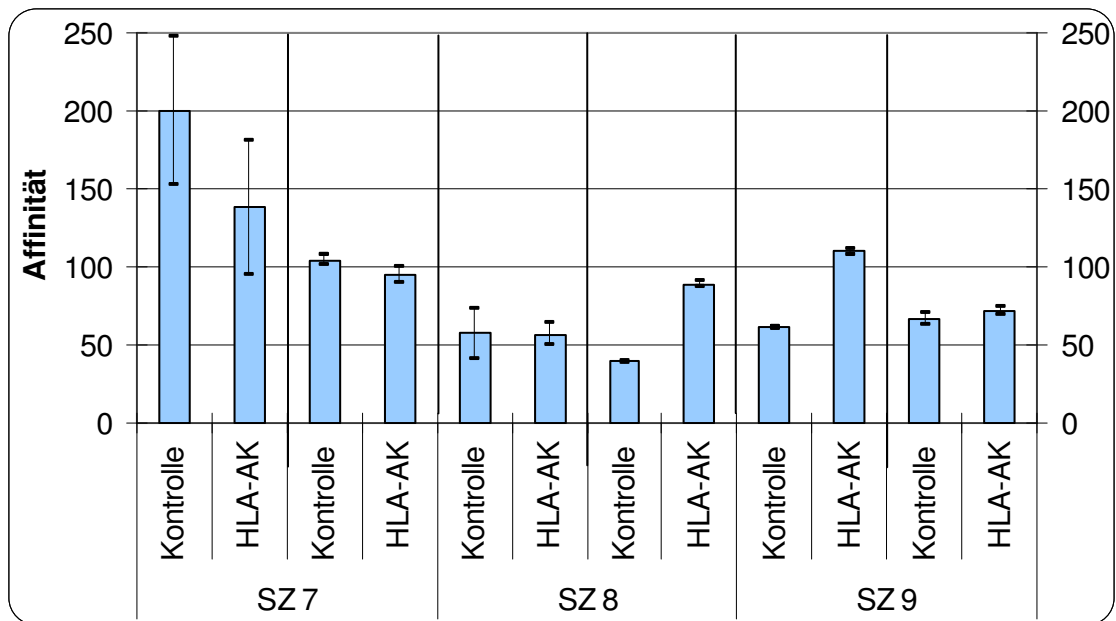


Abb. 25: Übersicht über die einzelnen Versuchsergebnisse am Optischen Biosensorsystem.

In dem Diagramm lässt sich keine eindeutige Tendenz der Ergebnisse erkennen. Bei den Kontrollseren der Stammzellpräparationen Nr. 7 und Nr. 8 ist jedoch in beiden Fällen mindestens eine der Affinitäten der Kontrollseren höher als die der HLA-Seren.

In Tab. 6 sind die Ergebnisse aller Versuche zusammengefasst. Der Mittelwert bezeichnet die aus den drei Einzelversuchen gemittelte Affinität der Stammzellen zum Endothel.

Tab. 7: Zusammenfassung aller Versuchsergebnisse am Optischen Biosensor

OPTISCHER BIOSENSOR	MW ± SD
Kontrollgruppe	88,15 ± 56,00
Spez. HLA-AK	93,35 ± 22,02
	($p = 1,0$)

Mit $p = 1,0$ ist dieses Ergebnis nicht signifikant. Es lässt sich keinerlei Trend zu einem unterschiedlichen Verhalten der Gruppen erkennen.

Für eine der Stammzellpräparationen wurde der Versuch zusätzlich mit einem HLA-Antikörper anderer Spezifität durchgeführt. Hiermit sollten zufällige - nicht HLA-spezifische - Ergebnisse ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tab. 8: Ausführliche Darstellung der einzelnen Ergebnisse einer Stammzellpräparation

Zugegebenes Serum	Antigenspezifität	Antikörperspezifität	MW ± SD
AB-Serum Nr. 8	A 11, A2	-	57,26 ± 15,84
AB-Serum Nr. 9	A 11, A2	-	39,35 ± 0,51
AB-Serum Nr. 10	A 11, A2	-	54,27 ± 2,13
HLA-AK Nr. 26	A 11, A2	Anti A 11	56,62 ± 7,16
HLA-AK Nr. 7	A 11, A2	Anti A 2	89,02 ± 1,51
HLA-AK Nr. 1	A 11, A2	Anti A 1	56,19 ± 2,25

Die Endothelaffinität der Stammzellen, die mit HLA-Antikörpern anderer Spezifität inkubiert wurden (grün dargestellt), liegt bei ähnlichen Werten wie die übrigen Ergebnisse der HLA-Antikörper-sensibilisierten (rot dargestellt) und nicht HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen (blau dargestellt). Auch hier ist somit keinerlei Trend zu erkennen.

5 Diskussion

Durch die zunehmende Bedeutung der allogenen Stammzelltransplantation für die Behandlung verschiedenster hämatologischer und onkologischer Krankheitsbilder [25, 35, 76, 98] wird es immer wichtiger, das immunologische Risiko der Stammzellempfänger für Abstoßungsreaktionen zu vermindern. Die wesentliche Voraussetzung zur klinischen Durchführung der allogenen Stammzelltransplantation waren die Entdeckung des HLA-Systems und später die Verbesserung der serologischen und der molekulargenetischen Typisierungstechniken der HLA-Antigene bzw. HLA-Gene [5, 89]. Mit den Methoden der hochauflösenden HLA-Typisierung bzw. sogar der DNA-Sequenzierung werden nicht nur Antigen-Mismatches zwischen Spender und Empfänger, sondern auch Allel-Mismatches festgestellt. Diese können ebenfalls Einfluss auf die Anzahl und Art der Abstoßungsreaktionen haben [52].

Da Spender und Empfänger wesentlich genauer als zuvor aufeinander abgestimmt werden konnten, wurden somit die Risiken für eine Graft-Versus-Host-Disease sowie für ein Engraftment-Failure deutlich vermindert.

Trotz dieser Untersuchungen sind Abstoßungsreaktionen immer noch ein großes Problem nach der Transplantation hämatopoetischer Stammzellen. Hierbei wird grundsätzlich unterschieden zwischen zellulärer Abstoßung und humoraler Abstoßung mit einer hierdurch bedingten Funktionseinschränkung der transplantierten Stammzellen. Diese Funktionseinschränkung könnte unter anderem durch donorspezifische HLA-Antikörper bedingt sein.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von präformierten donorspezifischen HLA-Antikörpern im Empfängerorganismus auf korrespondierende HLA-Antigene der transplantierten Stammzellen experimentell zu prüfen. Nicht alle Patienten besitzen solche präformierten Antikörper. In bestimmten Fällen - zum Beispiel nach Schwangerschaften, vorangegangenen Transfusionen oder Transplantationen [17, 61] - können sie jedoch vorliegen.

In vitro sollte zunächst überprüft werden, ob die HLA-Antikörper an die Stammzellen binden und somit auf ihnen nachweisbar sind. Es sollte getestet werden, ob die HLA-

Antikörper-sensibilisierten Stammzellen eine stärkere Apoptose aufweisen und ob sie stärker phagozytiert werden als nicht HLA-AK-sensibilisierte Stammzellen. Zusätzlich sollte die Klonogenität von HLA-AK-sensibilisierten und nicht HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen mit Hilfe von Klonogenitätsassays verglichen werden. Im optischen Biosensor sollte ein potentieller Unterschied in der Endothelaffinität zwischen HLA-AK-sensibilisierten und nicht HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen geprüft werden.

5.1 Bindung von HLA-Antikörpern an Stammzellen - „Crossmatch“

HLA-Antigene der Klasse I werden auf allen kernhaltigen Zellen, und somit auch auf hämatopoietischen Zellen, exprimiert [43]. In durchflusszytometrischen Versuchen zum Crossmatch sollte die Sensibilisierung von Spenderstammzellen durch präformierte Empfänger-HLA-Antikörper, deren Bindungsfähigkeit und somit auch die Expression von HLA-Antigenen auf hämatopoietischen Stammzellen nachgewiesen werden. Es zeigte sich ein mit $p = 0,043$ signifikanter Unterschied in der Anti-Human-IgG-Bindung zwischen den HLA-AK-sensibilisierten und nicht HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen. Damit wird deutlich, dass HLA-Antikörper an spezifische HLA-Antigene auf Spenderstammzellen binden. Die Spezifität dieser Bindung ist in Tab. 2 gezeigt. Dort wird am Beispiel von zwei Stammzellpräparationen das Crossmatch von Stammzellen mit verschiedenen Seren dargestellt. Verglichen wurden mit den Stammzellen korrespondierende HLA-AK-Seren, nicht korrespondierende HLA-AK-Seren und AB-Kontrollseren. Es ist erkennbar, dass die Anti-Human-IgG-Bindungswerte der spezifischen HLA-AK-Seren deutlich höher sind als die Werte der unspezifischen HLA-AK-Seren. Eine Signifikanz liegt nicht vor. Die Werte der unspezifischen HLA-AK-Seren sind erkennbar höher als die Werte der AB-Seren, was wahrscheinlich auf eine geringe unspezifische Bindung der unspezifischen HLA-Antikörper zurückzuführen ist. Vielleicht hätte durch nochmaliges zusätzliches Waschen der Stammzellen nach der Sensibilisierung diese unspezifische Bindung verringert werden können. Möglicherweise wäre aber auch der Zellverlust hierbei zu hoch gewesen. Bisher gibt es kein allgemein anerkanntes Protokoll zur Durchführung dieses Versuches, das hierzu verbindliche Anweisungen vorschreibt.

5.2 Klonogenität von Stammzellen

In verschiedenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die funktionelle durchflusszytometrische Bestimmung von CD34+-Zellen in begrenztem Ausmaß mit der „colony-forming-capacity“ der Stammzellen in Klonogenitätsassays korreliert [24, 79, 80]. Gleichwohl kann die Proliferationsfähigkeit von Stammzellen nur mit Klonogenitätsassays untersucht werden, die das Wachstum der Stammzellen in vivo bis zu einem gewissen Grad gut repräsentieren.

Bei der Auswertung der Klonogenitätsassays konnte kein signifikanter Wachstumsvorteil der nicht HLA-AK-sensibilisierten Zellen im Vergleich zu den HLA-AK-sensibilisierten Zellen nachgewiesen werden. Es ist jedoch erkennbar, dass tendenziell das Wachstum der Zellen der Kontrollgruppe etwas stärker war als das der HLA-AK-sensibilisierten Zellen. Besonders deutlich ist dies bei der Betrachtung der Burst-Forming-Units. Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass HLA-AK-sensibilisierte Zellen offensichtlich keinen signifikanten Wachstumsnachteil aufweisen. Tendenziell wird ihr Wachstum jedoch durch die Sensibilisierung mit HLA-Antikörpern beeinträchtigt. Um diese Beeinträchtigung genauer zu quantifizieren, sind weitere Forschungen mit größeren Versuchszahlen notwendig. Diese weiteren Versuche sind außerdem notwendig, um sicher auszuschließen, dass der dargestellte Trend möglicherweise auf einen unspezifischen Effekt zurückzuführen ist: Das AB-Serum könnte als Nährmedium auch potentiell bessere Wachstumsbedingungen für die Stammzellen bieten als das Serum mit HLA-Antikörpern.

Bertho et al. untersuchten den Einfluss von monoklonalen Anti-HLA-DR-Antikörpern auf das Wachstum von CD34+ Zellen. Dabei stellten sie eine Inhibition der granulozytären Differenzierung fest, die nicht durch vermehrte Apoptose der CD34+-Zellen bedingt war [10]. Dieser Einfluss von HLA-Klasse-II-Antikörpern würde dafür sprechen, dass auch HLA-Klasse-I-Antikörper einen Einfluss auf die Stammzellendifferenzierung in vitro haben könnten. In dieser Studie konnte dieser Einfluss jedoch nicht signifikant belegt werden.

5.3 Apoptotisches Verhalten von Stammzellen

Die durchflusszytometrische Apoptosemessung mit Hilfe von Annexin V ist eine akzeptierte Methode zur Analyse von Stammzellen und wurde schon in verschiedenen Studien durchgeführt. Abrahamsen et al. bestimmten mit dieser Methode erfolgreich die Apoptoserate von kryokonservierten PBSC-Präparaten [2].

Beim Vergleich der Apoptoseraten von HLA-AK-sensibilisierten und nicht HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen lässt sich zunächst feststellen, dass Serum mit spezifischen HLA-Antikörpern in einzelnen Fällen einen Einfluss auf das Zellbild in der Punktwolke der durchflusszytometrischen Messung hat. Dieser Einfluss wurde umso deutlicher erkennbar, je länger die Inkubationszeit der Stammzellen mit den HLA-Antikörpern andauerte. Die Zellen waren in der Dotplot-Darstellung weiter gestreut als die Zellen aus der Kontrolle mit AB-Serum. Zum Teil verminderte sich auch die Anzahl der messbaren Zellen. Bei den vergleichbaren Versuchen mit AB-Serum veränderte sich das Zellbild im Dotplot nur wenig bis gar nicht. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die HLA-Antikörper selbst die Stammzellen so verändern, dass sich ein von der normalen Zellverteilung abweichendes Bild in der durchflusszytometrischen Auswertung ergibt. Möglicherweise ist auch ein gewisser zytotoxischer Effekt als mitursächlich für die veränderten Zellbilder zu postulieren. Potentiell vorhandene unbekannte Substanzen in den betroffenen HLA-Seren könnten während der Inkubationszeit auf die Stammzellen eingewirkt und sie auf diese Weise verändert haben.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Versuche zur Apoptose fällt auf, dass zu Beginn der Messung wie erwartet noch kein signifikanter Unterschied in der Apoptoserate zwischen HLA-AK-sensibilisierten und nicht HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen vorliegt. Auch nach 12 Stunden Inkubationszeit ist der Unterschied noch nicht signifikant. Zum 24- und 36-Stunden-Zeitpunkt ist ein deutlich signifikanter Anstieg der Apoptoserate der mit HLA-Antikörpern sensibilisierten Stammzellen zu erkennen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass auch in vivo bei Patienten, die präformierte HLA-Antikörper aufweisen und sich einer Stammzelltransplantation unterziehen, die Apoptoserate der transplantierten Stammzellen höher sein könnte als es bei Patienten ohne präformierte Antikörper der Fall ist. Detaillierte klinische Daten

liegen dazu bislang jedoch nicht vor. Die vermehrte Apoptose der Stammzellen könnte eine der Ursachen für das von Anasetti et al. beschriebene vermehrte Transplantatversagen bei Patienten mit Donor-HLA-Inkompatibilität und vorbestehender Alloimmunisierung sein [3].

5.4 Phagozytose-Verhalten von Stammzellen

In verschiedenen Arbeiten wurde bereits erfolgreich das Labeling von unterschiedlichen phagozytierten Zellen mit CMFDA gezeigt: Baker [4] und Lim [42] markierten Thrombozyten, und Jersmann labelte apoptotische phagozytierte Zellen [32].

Nusbacher et al. zeigten, dass spezifische HLA-Antikörper die Funktion von phagozytierenden Granulozyten hemmend beeinflussen, wenn sie zuvor mit den Granulozyten inkubiert werden [62]. Shepard et al. konnten nachweisen, dass monoklonale Antikörper gegen Transmembran-Moleküle von Monozyten die Adhärenz und Phagozytose von IgG-sensibilisierten Erythrozyten hemmen [81]. Es zeigt sich also ein deutlicher Einfluss von auf phagozytierenden Zellen gebundenen Antikörpern auf die Phagozytoserate dieser Zellen.

In dieser Arbeit sollte mit einem solchen Ansatz untersucht werden, ob HLA-AK-sensibilisierte Stammzellen stärker phagozytiert werden als nicht HLA-AK-sensibilisierte Stammzellen. Die Makrophagen selbst waren bei diesem Versuch nicht HLA-AK-sensibilisiert.

Bei der Auswertung der Versuche zur Phagozytose von Stammzellen konnte kein signifikanter Unterschied der Phagozytoserate der HLA-Antikörper-sensibilisierten Stammzellen im Vergleich zu der nicht HLA-AK-sensibilisierten Kontrollgruppe festgestellt werden. Auch bei der Auswertung der Ergebnisse der Adhärenz war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen festzustellen. Es ist allerdings zu erkennen, dass sowohl die Phagozytoserate als auch die Adhärenzrate der HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen etwas höher war als die der nicht HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen. Eine klare Auswertung wird erschwert durch die teilweise veränderten Zellbilder in der durchflusszytometrischen Analytik bei den durch HLA-Antikörper sensibilisierten Zellen. Da ähnliche Veränderungen bei den

nicht AK-sensibilisierten Stammzellen in keinem Fall und bei den HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen auch nur in einzelnen Fällen auftraten, stellt sich die Frage, ob die Veränderungen durch die HLA-Antikörper im Serum selbst oder durch andere im Serum enthaltene Substanzen zustande kamen. Möglich ist, dass die veränderten HLA-Seren zum Beispiel von Dialysepatienten stammen. Bei diesen Patienten ist es durch ihre jeweilige Krankheit und Therapie durchaus möglich, dass im Serum Substanzen vorhanden sind, die das Zellbild in der durchflusszytometrischen Auswertung verändern. Trotz der Veränderungen weisen die gemessenen Zellen jedoch in einigen Fällen eine stark positive Fluoreszenz und in anderen Fällen eine schwächere Fluoreszenz auf. Es kann also nicht von einer Beeinflussung der Ergebnisse in eine bestimmte Richtung ausgegangen werden. Aus diesem Grund wurden in diese Auswertung alle gemessenen Ergebnisse mit einbezogen.

Zusammenfassend sind tendenziell sowohl die Adhärenz als auch die Phagozytose HLA-Antikörper-sensibilisierter Stammzellen stärker ausgeprägt als die Adhärenz und Phagozytose der nicht HLA-Antikörper-sensibilisierten Stammzellen. Ein signifikanter Unterschied ist auf Grund der geringen Fallzahlen jedoch nicht zu erkennen. Weitere Untersuchungen zur Phagozytose und Adhärenz von HLA-Antikörper-sensibilisierten Stammzellen wurden bislang nicht veröffentlicht, so dass keine weiteren Studien zum Vergleich der Ergebnisse herangezogen werden können.

5.5 Verhalten der Stammzellen im optischen Biosensorsystem

Bei der Auswertung der Versuche am Optischen Biosensor fällt auf, dass die Ergebnisse in keiner Weise richtungsweisend für oder gegen einen Einfluss von HLA-Antikörpern auf die Bindungskinetik von Stammzellen an Endothel sind. Es bleibt unklar, ob HLA-AK-sensibilisierte Stammzellen mit anderer Kinetik an Endothel binden als nicht HLA-AK-sensibilisierte Stammzellen. Somit kann mit den vorliegenden Daten keine Aussage dazu gemacht werden, ob durch die Antikörper-Sensibilisierung der Stammzellen eventuell auch die Penetration der Zellen ins Knochenmark beeinflusst werden könnte.

Um diese Hypothese erschöpfend klären zu können, wäre es notwendig, den Versuch mit einer wesentlich größeren Fallzahl an Stammzellen und Antikörpern zu

wiederholen. Eventuell wäre es auch hilfreich, den Versuch mit anderen Endothelzellen als mit den hier genutzten HDMEC-c durchzuführen, um verschiedene Endothelien vergleichen zu können. Bei den in diesen Versuchen benutzten Endothelzellen handelt es sich um humane mikrovaskuläre Endothelzellen, die aus Dermis isoliert wurden. Es kann davon ausgegangen werden, dass ähnliche mikrovaskuläre Endothelzellen auch in Gefäßen zu finden sind, aus denen Stammzellen in das Knochenmark penetrieren.

In Studien konnten schon Einflüsse von HLA-Antikörpern auf Endothelzellen nachgewiesen werden. In diesen Studien ging es allerdings um den direkten Kontakt von HLA-Antikörpern mit Endothelzellen, und nicht, wie in dieser Studie, um den Kontakt von HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen mit Endothelzellen. Narayanan et al. zeigten den Einfluss von HLA-Antikörpern auf die so genannte Akkomodation von Endothelzellen nach Organtransplantationen bei vollständig entfernten aber im Laufe der Zeit wieder ansteigenden Antikörpertitern [59].

Jindra et al. zeigten den Einfluss von HLA-Antikörpern auf das Überleben und die Proliferation von Endothelzellen. Hiernach stimulieren hohe Konzentrationen von HLA-Antikörpern die Endothelzellproliferation und fördern auf diese Weise die Transplantat-Vaskulopathie und damit die chronische Abstoßung solider Transplantate. Geringe Konzentrationen von HLA-Antikörpern hingegen fördern eine vermehrte Expression antiapoptotischer Proteine in Endothelzellen und wirken damit günstig auf das Outcome der Transplantation [33].

5.6 Zusammenfassung aller Ergebnisse und Vergleich mit Daten aus der Literatur

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass donorspezifische HLA-Antikörper an Stammzellen binden und durchflusszytometrisch auf ihnen nachgewiesen werden können. In Klonogenitätsassays wird durch HLA-Antikörper auf Stammzellen deren Wachstum im Vergleich zu nicht HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen leicht aber nicht signifikant vermindert. HLA-AK-sensibilisierte Stammzellen werden ab einem Zeitpunkt von 24 Stunden nach Versuchsbeginn signifikant stärker apoptotisch als nicht HLA-AK-sensibilisierte Stammzellen. Das Adhärenz- und Phagozytoseverhalten

von HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen ist im Vergleich zu nicht HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen zwar tendenziell, aber nicht signifikant erhöht. Über die Endothelaffinität der Stammzellen kann abschließend keine Aussage gemacht werden, es findet sich kein Unterschied im Verhalten der HLA-AK-sensibilisierten gegenüber den nicht HLA-AK-sensibilisierten Stammzellen.

Neben den HLA-Antigenen ist auch für erythrozytäre Blutgruppenantigene bekannt, dass sie auf verschiedenen Stammzellen nachgewiesen werden können.

Vaughan et al. wiesen mit Hilfe monoklonaler Anti-Kell-Antikörper und auch mit Hilfe von Anti-Kell-Antikörper enthaltenden Serumproben eine antikörperdosisabhängige Hemmung von erythrozytären Kell-positiven Vorläuferzellen nach. Dabei fiel auf, dass die unreiferen „BFU-erythrocyte“ stärker inhibiert wurden als die reiferen „CFU-erythrocyte“ [92], was durch die Tatsache erklärbar ist, dass das Kell-Antigen besonders auf unreifen erythrozytären Zellen exprimiert wird [45].

Wagner et al. zeigten, dass Anti-Kell-Antikörper sowohl an erythrozytäre als auch an megakaryozytäre Vorläuferzellen binden, auf denen das Kell-Antigen vorhanden ist. In Klonogenitätsassays wurde festgestellt, dass Anti-Kell-Antikörper sowohl das Wachstum von erythrozytären Vorläuferzellen als auch das Wachstum von megakaryozytären Kell-positiven Vorläuferzellen (CFU-MK) deutlich beeinträchtigen. Somit vermindern sie die Erythropoese und die Bildung von Thrombozyten [93].

In zwei verschiedenen Studien wurde das Erscheinen von erythrozytären, von ABO-Antikörpern verschiedenen Antikörpern nach Knochenmarktransplantationen untersucht [1, 90]. De la Rubia et al. konnten nachweisen, dass Patienten, die periphere Blutstammzelltransplantationen mit einem ABO-Mismatch erhalten, ein höheres Risiko haben, von den ABO-Antikörpern verschiedene erythrozytäre Antikörper zu entwickeln, als Patienten ohne ABO-Mismatch [21]. Als möglicher Mechanismus für diese Gegebenheit wird die Stimulation einer starken Immunantwort durch mittransplantierte Spenderlymphozyten oder durch noch vorhandene Empfängerlymphozyten angesehen. Diese Immunantwort ist auf die immungenetische Ungleichheit der ABO-inkompatiblen Transplantation zurückzuführen [73].

Die Reihenfolge der Expression erythrozyten-spezifischer Antigene während der Entwicklung von Erythrozyten aus Vorläuferzellen wurde von Southcott et al.

aufgeklärt. Demnach ist das Kell-Glykoprotein das zum frühesten Zeitpunkt exprimierte Antigen, was auf eine wichtige Rolle dieses Proteins in der Liniendifferenzierung der Stammzellen hinweist [82]. Andere nach Southcott in der erythrozytären Entwicklung entstehende Antigene sind das Rhesus Glykoprotein, das Landsteiner Wiener Glykoprotein, das Glycophorin A (GPA), Band 3, das Lutheran Glykoprotein und das Duffy Glykoprotein. Durch das zeitlich versetzte Erscheinen dieser Antigene können ihnen verschiedene Funktionen im Verlauf der Erythropoese zugeordnet werden [82].

Verschiedene Glykoproteine werden nicht nur auf verschiedenen erythrozytären Vorläuferzellen exprimiert, sondern auch auf anderen unterschiedlichen hämatopoetischen Stammzellen. Es ist bekannt, dass fetale Stammzellen das Glykoprotein IIb/IIIa exprimieren [57]. Dieses Protein wird auch auf verschiedenen hämatopoetischen Stammzellen exprimiert [63].

Nach Lepage et al. sind auf Megakaryozyten zwei verschiedene, für die Thrombozytenfunktion sehr wichtige, Glykoproteine lokalisiert. Sie erscheinen zu verschiedenen Zeitpunkten auf den Megakaryozyten und scheinen somit verschiedene Funktionen in der Differenzierung der Zellen zu haben. Das Glykoprotein IIb (GPIIb) ist schon auf unreifen CD34+ Zellen zu finden, während das GP Ib-V-IX erst nach spezifischer Zytokininduktion auf den Megakaryozyten nachweisbar wird [41].

Cassens et al. zeigten in einer Fallstudie, dass die maternalen Antikörper Anti-HPA-5b und Anti-HLA-A2 eine neonatale alloimmune Thrombozytopenie verursachen können. Diese Antikörper inhibierten jedoch in vitro nicht die Klonogenität von Megakaryozyten. Sie beeinflussten nach Transplantation des Nabelschnurblutes des an Thrombozytopenie erkrankten Spenders klinisch auch nicht die Hämatopoese im Empfänger[15].

Aus den gezeigten Beispielen wird ersichtlich, dass sich verschiedene Antigene auf Stammzellen in unterschiedlichen Stadien der Differenzierung nachweisen lassen, und dass folglich auch Antikörper mit diesen Antigenen reagieren können und dies auch tun. In einigen Fällen, wie unter anderem bei Vaughan und Wagner, wird das Stammzellwachstum inhibiert [92, 93]. Im Fall der Studie von Cassens kann nach Transplantation keine Beeinflussung der Hämatopoese festgestellt werden, obwohl die

vorhandenen Antikörper beim Spender eine Thrombozytopenie verursacht haben [15]. Auch HLA-Antigene werden auf Stammzellen exprimiert. Wie in den eigenen Versuchen gezeigt, reagieren mit spezifischen HLA-Antikörpern sensibilisierte Stammzellen in verschiedenen Versuchsansätzen anders als nicht HLA-AK-sensibilisierte Stammzellen. Da von den Versuchen in begrenztem Ausmaß Rückschlüsse auf die Bedingungen in vivo gezogen werden können, kann aus den Ergebnissen abgeleitet werden, dass sich auch in vivo nach Stammzelltransplantationen vorhandene präformierte spezifische Antikörper auf den transplantierten Stammzellen nachweisen lassen. Diese Antikörper führen in vitro zu einer erhöhten Apoptoserate und eventuell auch zu vermehrter Phagozytose und zu geringerem Wachstum der Zellen.

Es ist noch nicht im Detail untersucht worden, wann welche HLA-Antigene auf welchen Stammzellpopulationen exprimiert werden. Es ist somit auch noch unklar, welche Rolle HLA-Antigene bei der Differenzierung von unreifen Stammzellen zu reifen Zellen spielen.

Die oben genannten Versuchsergebnisse führen zu der Fragestellung, ob es sinnvoll ist, Patienten vor einer allogenen SZT mit HLA-Differenz grundsätzlich auf potentielle HLA-Antikörper zu untersuchen. Bisher wird in einzelnen Zentren ein serologischer Crossmatch bei SZT und Knochenmarktransplantationen bei Vorliegen von HLA-A, -B, -C, -DRB1 oder -DQB1-Differenzen durchgeführt [65, 66]. Es wird aber keine generelle Untersuchung des Patienten auf HLA-Antikörper vorgeschrieben, dies steht im grundsätzlichen Gegensatz zu Patienten bei soliden Organtransplantationen. Daran schließt sich die Frage an, ob zum Beispiel im Rahmen von haploidenten Stammzelltransplantationen bei Vorliegen von donor-spezifischen HLA-Antikörpern eine Auswahl alternativer Stammzellspender klinisch indiziert sein könnte.

Für Organtransplantationen, wie zum Beispiel für Transplantationen von Niere, Herz und Lunge, wird nach Takemoto et al. eine komplette Testung der potentiellen Transplantatempfänger auf donor-spezifische Antikörper gefordert. Damit soll das Risiko der sogenannten Antibody-Mediated-Rejection (AMR) minimiert oder sogar ausgeschlossen werden [86]. Die Grundlage hierfür liegt darin begründet, dass regelmäßig donor-reaktive HLA-Antikörper im Serum von Transplantatempfängern

nachgewiesen wurden, die eine Transplantatabstoßung durchgemacht hatten [49]. Außerdem spricht die AMR typischerweise nicht auf konventionelle Anti-Rejection-Therapie an und bringt somit ein schlechtes Ergebnis für die Patienten mit sich [48]. Opelz zeigte einen hoch signifikanten Einfluss der Zahl der HLA-Mismatches bei Nierentransplantationen auf das Transplantat-Outcome [64]. Da bisher noch keine zuverlässige Therapie für Kadaver-Nieren-Transplantationen mit HLA-Mismatches gefunden wurde, weist er auf die Notwendigkeit des weiteren HLA-Matching hin [64]. Von Jaramillo et al. konnte gezeigt werden, dass HLA-Antikörper neben akuten auch für chronische Abstoßungsreaktionen prädestinierend sind [30].

In verschiedenen Studien wurde für Nierentransplantationen festgestellt, dass die AMR resistent gegen Standardtherapien ist und somit eine schlechtere Prognose hat als eine einfache akute zelluläre Abstoßungsreaktion [47]. Die AMR tritt in diesen Fällen meist früh nach der Transplantation auf und verursacht eine schnelle funktionelle Verschlechterung [86]. Andere Studien entdeckten auch einen Zusammenhang zwischen zirkulierenden Antikörpern und der Entwicklung von chronischen Abstoßungsreaktionen und Transplantatverlust nach Nierentransplantation [31, 39].

Für Herztransplantationen konnte gezeigt werden, dass das Auftreten einer AMR die Anfälligkeit des Empfängers für eine Transplantatvaskulopathie erhöht und das Überleben des Transplantats gefährdet [50].

Auch bei Lungentransplantationen wurde ein Zusammenhang zwischen hyperakuter Abstoßung und präformierten donor-spezifischen HLA-Antikörpern festgestellt [18].

Für alle diese Organtransplantationen wurden Protokolle erstellt, um die zirkulierenden HLA-Antikörper zu vermindern und ein positives Crossmatch zu überwinden. Hierzu werden als Möglichkeiten hohe Dosen von intravenösen Immunglobulinen [26] oder intravenöse Immunglobuline kombiniert mit einem zusätzlichen Immunsuppressivum genannt [44]. Als weitere Möglichkeiten gelten die Plasmapherese kombiniert mit niedrigdosierten CMV-Hyperimmunglobulinen [56, 94, 100] und die Immunadsorptionstherapie direkt vor der Transplantation [28, 38]. Trotz dieser Therapieansätze werden noch Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen mit HLA-Mismatch beobachtet [44], so dass HLA-Matching weiterhin als die beste Prävention des Transplantatversagens gilt [64].

Auch bei Stammzelltransplantationen wurden bei Patienten mit bekannten

präformierten Antikörpern in Einzelfällen schon verschiedene Ansätze zur Elimination der Antikörper durchgeführt. Maruta et al. eliminierten Anti-Donor-lymphozytotoxische Antikörper mit Hilfe eines Plasmaaustausches und darauf folgender Infusion von Donor-Lymphozyten [46]. Braun et al. eliminierten präformierte HLA-Antikörper mit Hilfe der Immunadsorption an Staphylokokken-Protein A, so dass ein Stammzellengraftment eines HLA-inkompatiblen Spenders im Patienten möglich wurde [14]. Narimatsu et al. verhinderten eine Abstoßungsreaktion nach peripherer hämatopoetischer Stammzelltransplantation bei vorhandenen donor-spezifischen HLA-Antikörpern mit Hilfe einer Donor-Thrombozyten-Transfusion und Rituximab-Gaben vor der Transplantation sowie der Infusion einer Megadosis peripherer Blutstammzellen [60]. Gleichwohl sind die Wirkungen und die Relevanz von HLA-Antikörpern im Rahmen von experimentellen und klinischen Studien noch nicht ausreichend untersucht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die Kompatibilitätsbeurteilung der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation noch weitere Forschungen auf dem Gebiet der HLA-Antikörper bedingten Einflüsse auf die transplantierten Stammzellen und das Stammzell-Engraftment im Patienten notwendig sind.

Diese Arbeit gibt erste Hinweise auf die zugrunde liegenden Ursachen für die schon zuvor beobachteten vermehrten Komplikationen nach SZT bei Patienten mit präformierten donor-spezifischen HLA-Antikörpern. Ähnliche Studien müssten an größeren Fallzahlen wiederholt werden, um die Einflüsse von HLA-Antikörpern besonders auf die Phagozytose und Klonogenität der Stammzellen genauer definieren zu können. Sollten sich aus solchen Studien ähnliche Ergebnisse ergeben, müsste auch bei hämatogenen Stammzelltransplantationen über eine generell vorgeschriebene Testung der potentiellen Stammzellempfänger auf donor-spezifische HLA-Antikörper nachgedacht werden. Außerdem müsste eine prophylaktische Therapie im Falle einer nicht zu umgehenden SZT mit vorhandenen donor-spezifischen HLA-Antikörpern des Empfängers in Erwägung gezogen werden.

6 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AMR	Antibody Mediated Rejection
BFU	Burst Forming Unit
BS ³	Bis (sulfosuccinimidyl) Suberate
BSA	Bovine Serum Albumine
CFU	Colony Forming Unit
CMFDA	Chloro-Methyl-Fluorescein-Diacetate
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat, Fluoreszenzfarbstoff
FSC	Forward Scatter (Vorwärts-Streulicht)
G-CSF	Granulocyte-Colony-stimulating-Factor
GvHD	Graft versus Host Disease
HBS	Hepes Buffered Saline
HLA	Human Leucocyte Antigen
HvG	Host versus Graft
MHC	Major Histocompatibility Complex
MNCs	Mononukleäre Zellen
MW	Mittelwert
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin, Fluoreszenzfarbstoff
SD	Standardabweichung
SSC	Sideward Scatter (Seitwärts-Streulicht)
SZ	Stammzellpräparation
SZT	Stammzelltransplantation
TC	Tri-Color-conjugate, Fluoreszenzfarbstoff

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau eines Klasse-I-HLA-Moleküls [61]	4
Abb. 2: Schematische Darstellung einer Dichtegradientenzentrifugation	19
Abb. 3: Beispiel der Auswertung eines Crossmatch-Versuches	21
Abb. 4: Mechanismus der Annexinbindung an apoptotischen Zellen [7]	23
Abb. 5: Beispiel der Auswertung eines Versuchs zum Apoptoseverhalten, die Stammzellpräparation wurde mit AB-Serum inkubiert.	24
Abb. 6: Darstellung der zwei intrazellulären Reaktionen des CMFDA-Reagenz.	26
Abb. 7: Fließschema zur Phagozytose und Adhärenz	27
Abb. 8: Beispiel der Auswertung eines Versuchs zur Phagozytose	29
Abb. 9: BS ³ -Reaktionsschema.	33
Abb. 10: Immobilisierungsprotokoll von HDMEC-c-Zellen an Aminosilan	33
Abb. 11: Diagramm des optischen Biosensors mit drei Messdurchgängen (jeweils mit HLA-AK-Serum und AB-Serum) an einer Stammzellpräparation	34
Abb. 12: Beispiel eines Crossmatch-Versuchsergebnisses	36
Abb. 13: Ergebnisübersicht der Versuche zum Crossmatch	37
Abb. 14: Ergebnisübersicht der BFUs aus den Klonogenitätsassays	40
Abb. 15: Ergebnisübersicht der CFUs aus den Klonogenitätsassays	41
Abb. 16: Beispiel für die Streuung der Granulozyten nach Inkubation mit HLA-Antikörper-Serum bei einer 36-Stunden-Messung	43
Abb. 17: Zusammenfassende Übersicht aller Apoptose-Ergebnisse.	44
Abb. 18: Ergebnisübersicht der Apoptose-Versuche	46
Abb. 19: Zusammenfassung der Apoptose-Ergebnisse	47
Abb. 20: Mittelwerte und Standardabweichungen der Adhärenz	49
Abb. 21: Mittelwerte und Standardabweichungen der Phagozytose	49
Abb. 22: Beispiel einer durch HLA-Serum veränderten Dotplot-Darstellung	51
Abb. 23: Zusammenfassung der Ergebnisse der Adhärenz	52
Abb. 24: Zusammenfassung der Ergebnisse der Phagozytose	52
Abb. 25: Übersicht über die einzelnen Versuchsergebnisse am Optischen Biosensorsystem.	54

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammenfassung der Ergebnisse des Crossmatch	38
Tab. 2: Einzeldarstellung des Crossmatches an zwei verschiedenen Stammzellpräparationen	39
Tab. 3: Zusammenfassung der Ergebnisse der BFUs	41
Tab. 4: Zusammenfassung der Ergebnisse der CFUs	42
Tab. 5: Einzelergebnisse der Versuche zur Apoptose, dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung	45
Tab. 6: Zusammenfassung der Apoptose-Ergebnisse	47
Tab. 7: Zusammenfassung aller Versuchsergebnisse am Optischen Biosensor	54
Tab. 8: Ausführliche Darstellung der einzelnen Ergebnisse einer Stammzellpräparation	55

9 Literatur

1. Abou-Elella A, Camarillo T, Allen M, Barclay S, Pierce J, Holland H, Wingard J, Bray R, Rodey G, Hillyer C. Low incidence of red cell and HLA antibody formation by bone marrow transplant patients. *Transfusion* (1995) 35(11): 931-5.
2. Abrahamsen JF, Bakken AM, Bruserud O, Gjertsen BT. Flow cytometric measurement of apoptosis and necrosis in cryopreserved PBPC concentrates from patients with malignant diseases. *Bone Marrow Transplant* (2002) 29(2): 165-71.
3. Anasetti C, Amos D, Beatty PG, Appelbaum FR, Bensinger W, Buckner CD, Clift R, Doney K, Martin PJ, Mickelson E, et al. Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma. *N Engl J Med* (1989) 320(4): 197-204.
4. Baker GR, Sullam PM, Levin J. A simple, fluorescent method to internally label platelets suitable for physiological measurements. *Am J Hematol* (1997) 56(1): 17-25.
5. Baron F, Storb R. Allogeneic hematopoietic cell transplantation as treatment for hematological malignancies: a review. *Springer Semin Immunopathol* (2004) 26(1-2): 71-94.
6. Beatty PG, Mickelson EM, Petersdorf EW, Choo Y, Geraghty DE. Histocompatibility 1991. *Transfusion* (1991) 31(9): 847-56.
7. Becton Dickinson Biosciences. Product Spotlight - Annexin V. www.bdbiosciences.com

8. Benjamin RJ, McGurk S, Ralston MS, Churchill WH, Antin JH. ABO incompatibility as an adverse risk factor for survival after allogeneic bone marrow transplantation. *Transfusion* (1999) 39(2): 179-87.
9. Bensinger WI, Clift R, Martin P, Appelbaum FR, Demirer T, Gooley T, Lilleby K, Rowley S, Sanders J, Storb R, Buckner CD. Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in patients with advanced hematologic malignancies: a retrospective comparison with marrow transplantation. *Blood* (1996) 88(7): 2794-800.
10. Bertho N, Drenou B, Mooney N, Amiot L, Langanay T, Le Berre C, Charron D, Fauchet R. HLA-DR inhibits granulocytic differentiation without inducing apoptosis of CD34 cells. *Hum Immunol* (1999) 60(10): 944-54.
11. Böcker W, Denk H, Heitz PU. *Pathologie*. 2. Auflage (2001), Urban und Fischer. S. 134-135
12. Böcker W, Denk H, Heitz PU. *Pathologie*. 2. Auflage (2001), Urban und Fischer. S. 1103
13. Bortin MM. A compendium of reported human bone marrow transplants. *Transplantation* (1970) 9(6): 571-87. Zit. n. Thomas ED. Landmarks in the development of hematopoietic cell transplantation. *World J Surg* (2000) 24(7): 815-8.
14. Braun N, Faul C, Wernet D, Schnaidt M, Stuhler G, Kanz L, Risler T, Einsele H. Successful transplantation of highly selected CD34+ peripheral blood stem cells in a HLA-sensitized patient treated with immunoadsorption onto protein A. *Transplantation* (2000) 69(8): 1742-4.
15. Cassens U, Garritsen H, Kelsch R, van der Werf N, Frosch M, Witteler R, Ebell W, Sibrowski W. Platelet glycoprotein complex Ia/IIa antibodies cause

neonatal alloimmune thrombocytopenia but do not inhibit megakaryopoiesis and platelet recovery after allogeneic cord blood stem cell transplantation.

Bone Marrow Transplant (2001) 28(8): 803-6.

16. Cassens U, Sibrowski W. Relevance of blood group differences and antibodies in allogeneic stem cell transplantation. *Infusion Therapy and Transfusion Medicine* (2002) 29: 318-325.
17. Cecka JM, Zhang Q, Reed EF. Preformed cytotoxic antibodies in potential allograft recipients: recent data. *Hum Immunol* (2005) 66(4): 343-9.
18. Choi JK, Kearns J, Palevsky HI, Montone KT, Kaiser LR, Zmijewski CM, Tomaszewski JE. Hyperacute rejection of a pulmonary allograft. Immediate clinical and pathologic findings. *Am J Respir Crit Care Med* (1999) 160(3): 1015-8.
19. Cutler C, Antin JH. Peripheral blood stem cells for allogeneic transplantation: a review. *Stem Cells* (2001) 19(2): 108-17.
20. Dausset J. [Iso-leuko-antibodies.]. *Acta Haematol* (1958) 20(1-4): 156-66. Zit. n. Thomas ED. Landmarks in the development of hematopoietic cell transplantation. *World J Surg* (2000) 24(7): 815-8.
21. de La Rubia J, Arriaga F, Andreu R, Sanz G, Jimenez C, Vicente A, Carpio N, Marty ML, Sanz MA. Development of non-ABO RBC alloantibodies in patients undergoing allogeneic HPC transplantation. Is ABO incompatibility a predisposing factor? *Transfusion* (2001) 41(1): 106-10.
22. Deutsche Knochenmarkspenderdatei. Informationen zum Ablauf einer Stammzellspendersuche. 2006. www.dkms.de

23. Erker CG, Steins MB, Fischer RJ, Kienast J, Berdel WE, Sibrowski W, Cassens U. The influence of blood group differences in allogeneic hematopoietic peripheral blood progenitor cell transplantation. *Transfusion* (2005) 45(8): 1382-90.
24. Fritsch G, Emminger W, Buchinger P, Printz D, Gadner H. CD34-positive cell proportions in peripheral blood correlate with colony-forming capacity. *Exp Hematol* (1991) 19(11): 1079-83.
25. Gerull S, Goerner M, Benner A, Hegenbart U, Klein U, Schaefer H, Goldschmidt H, Ho AD. Long-term outcome of nonmyeloablative allogeneic transplantation in patients with high-risk multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* (2005) 36(11): 963-9.
26. Glotz D, Antoine C, Julia P, Suberbielle-Boissel C, Boudjeltia S, Fraoui R, Hacén C, Duboust A, Bariety J. Desensitization and subsequent kidney transplantation of patients using intravenous immunoglobulins (IVIg). *Am J Transplant* (2002) 2(8): 758-60.
27. Greinix HT, Fae I, Schneider B, Rosenmayr A, Mitterschiffthaler A, Pelzmann B, Kalhs P, Lechner K, Mayr WR, Fischer GF. Impact of HLA class I high-resolution mismatches on chronic graft-versus-host disease and survival of patients given hematopoietic stem cell grafts from unrelated donors. *Bone Marrow Transplant* (2005) 35(1): 57-62.
28. Higgins RM, Bevan DJ, Carey BS, Lea CK, Fallon M, Buhler R, Vaughan RW, O'Donnell PJ, Snowden SA, Bewick M, Hendry BM. Prevention of hyperacute rejection by removal of antibodies to HLA immediately before renal transplantation. *Lancet* (1996) 348(9036): 1208-11.
29. Hoffbrand AV, Pettit JE, Moss PAH, Hoelzer D. *Grundkurs Hämatologie*. 2. Auflage (2003), Blackwell Verlag. S. 104

30. Jaramillo A, Smith MA, Phelan D, Sundaresan S, Trulock EP, Lynch JP, Cooper JD, Patterson GA, Mohanakumar T. Development of ELISA-detected anti-HLA antibodies precedes the development of bronchiolitis obliterans syndrome and correlates with progressive decline in pulmonary function after lung transplantation. *Transplantation* (1999) 67(8): 1155-61.
31. Jeannot M, Pinn VW, Flax MH, Winn HJ, Russell PS. Humoral antibodies in renal allotransplantation in man. *N Engl J Med* (1970) 282(3): 111-7.
32. Jersmann HP, Ross KA, Vivers S, Brown SB, Haslett C, Dransfield I. Phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages: analysis by multiparameter flow cytometry. *Cytometry A* (2003) 51(1): 7-15.
33. Jindra PT, Zhang X, Mulder A, Claas F, Veale J, Jin Y-P, Reed EF. Anti-HLA Antibodies Can Induce Endothelial Cell Survival or Proliferation Depending on their Concentration. *Transplantation* (2006) 82: S33-S35.
34. Keever-Taylor CA, Bredeson C, Loberiza FR, Casper JT, Lawton C, Rizzo D, Burns WH, Margolis DA, Vesole DH, Horowitz M, Zhang MJ, Juckett M, Drobyski WR. Analysis of risk factors for the development of GVHD after T cell-depleted allogeneic BMT: effect of HLA disparity, ABO incompatibility, and method of T-cell depletion. *Biol Blood Marrow Transplant* (2001) 7(11): 620-30.
35. Kim SW, Tanimoto TE, Hirabayashi N, Goto S, Kami M, Yoshioka S, Uchida T, Kishi K, Tanaka Y, Kohno A, Kasai M, Higuchi M, Mori S, Fukuda T, Izutsu K, Sao H, Ishikawa T, Ichinohe T, Takeuchi K, Tajima K, Tanosaki R, Harada M, Taniguchi S, Tobinai K, Hotta T, Takaue Y. Myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for non-Hodgkin lymphoma: a nationwide survey in Japan. *Blood* (2006) 108(1): 382-9.

36. Klumpp TR. Immunohematologic complications of bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* (1991) 8(3): 159-70.
37. Korbling M, Przepiorka D, Huh YO, Engel H, van Besien K, Giralt S, Andersson B, Kleine HD, Seong D, Deisseroth AB, et al. Allogeneic blood stem cell transplantation for refractory leukemia and lymphoma: potential advantage of blood over marrow allografts. *Blood* (1995) 85(6): 1659-65.
38. Kupin WL, Venkat KK, Hayashi H, Mozes MF, Oh HK, Watt R. Removal of lymphocytotoxic antibodies by pretransplant immunoadsorption therapy in highly sensitized renal transplant recipients. *Transplantation* (1991) 51(2): 324-9.
39. Lee PC, Terasaki PI, Takemoto SK, Lee PH, Hung CJ, Chen YL, Tsai A, Lei HY. All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies. *Transplantation* (2002) 74(8): 1192-4.
40. Lee S, Russo D, Redman C. Functional and structural aspects of the Kell blood group system. *Transfus Med Rev* (2000) 14(2): 93-103.
41. Lepage A, Leboeuf M, Cazenave JP, de la Salle C, Lanza F, Uzan G. The alpha(IIb)beta(3) integrin and GPIb-V-IX complex identify distinct stages in the maturation of CD34(+) cord blood cells to megakaryocytes. *Blood* (2000) 96(13): 4169-77.
42. Lim J, Kim Y, Han K, Kim M, Lee KY, Kim WI, Shim SI, Kim BK, Kang CS. Flow cytometric monocyte phagocytic assay for predicting platelet transfusion outcome. *Transfusion* (2002) 42(3): 309-16.
43. Löffler G, Petrides P. *Biochemie und Pathobiochemie*. 6. Auflage (1998), Springer. S. 1060

44. Mahmoud K, Sobh M, El-Shenawy F, Mostafa A, Abo El Magd M, Hassan N, El-Agroudy A, Sheashaa H, Opelz G, Ghoneim M. Effect of high-dose intravenous immunoglobulin on suppression of alloantibodies against hla in highly sensitized transplant candidates. *Transplant Proc* (2004) 36(6): 1850-2.
45. Marsh WL, Redman CM. The Kell blood group system: a review. *Transfusion* (1990) 30(2): 158-67.
46. Maruta A, Fukawa H, Kanamori H, Harano H, Noguchi T, Kodama F, Kase N, Matsuzaki M, Miyashita H, Motomura S, et al. Donor-HLA-incompatible marrow transplantation with an anti-donor cytotoxic antibody in the serum of the patient. *Bone Marrow Transplant* (1991) 7(5): 397-400.
47. Mauiyyedi S, Colvin RB. Humoral rejection in kidney transplantation: new concepts in diagnosis and treatment. *Curr Opin Nephrol Hypertens* (2002) 11(6): 609-18.
48. Mauiyyedi S, Crespo M, Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, Saidman SL, Tolkoff-Rubin NE, Williams WW, Delmonico FL, Cosimi AB, Colvin RB. Acute humoral rejection in kidney transplantation: II. Morphology, immunopathology, and pathologic classification. *J Am Soc Nephrol* (2002) 13(3): 779-87.
49. McKenna RM, Takemoto SK, Terasaki PI. Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. *Transplantation* (2000) 69(3): 319-26.
50. Michaels PJ, Fishbein MC, Colvin RB. Humoral rejection of human organ transplants. *Springer Semin Immunopathol* (2003) 25(2): 119-40.
51. Mickelson EM, Petersdorf E, Anasetti C, Martin P, Woolfrey A, Hansen JA. HLA matching in hematopoietic cell transplantation. *Hum Immunol* (2000) 61(2): 92-100.

52. Mickelson EM, Petersdorf EW, Hansen JA. HLA matching and hematopoietic cell transplant outcome. *Clin Transpl* (2002): 263-71.
53. Mielcarek M, Leisenring W, Torok-Storb B, Storb R. Graft-versus-host disease and donor-directed hemagglutinin titers after ABO-mismatched related and unrelated marrow allografts: evidence for a graft-versus-plasma cell effect. *Blood* (2000) 96(3): 1150-6.
54. Mohyeddin Bonab M, Alimoghaddam K, Vatandoust S, Forouzia F, Jahani M, Ghavamzadeh A. Are HLA antigens a risk factor for acute GVHD in thalassemic patients receiving HLA-identical stem cell transplantation? *Transplant Proc* (2004) 36(10): 3190-3.
55. Molecular Probes. CellTracker™ Probes for Long-Term Tracing of Living Cells - Product information. 2004.
56. Montgomery RA, Zachary AA, Racusen LC, Leffell MS, King KE, Burdick J, Maley WR, Ratner LE. Plasmapheresis and intravenous immune globulin provides effective rescue therapy for refractory humoral rejection and allows kidneys to be successfully transplanted into cross-match-positive recipients. *Transplantation* (2000) 70(6): 887-95.
57. Murray LJ, Mandich D, Bruno E, DiGiusto RK, Fu WC, Sutherland DR, Hoffman R, Tsukamoto A. Fetal bone marrow CD34+CD41+ cells are enriched for multipotent hematopoietic progenitors, but not for pluripotent stem cells. *Exp Hematol* (1996) 24(2): 236-45.
58. Nanri M, Tanabe K, Ishida H, Tokumoto T, Shinmura H, Toma H. Poor graft survival in patients historically positive for antidonor antibody after living related renal transplantations. *Transplant Proc* (2002) 34(5): 1583.

59. Narayanan K, Jendrisak MD, Phelan DL, Mohanakumar T. HLA class I antibody mediated accommodation of endothelial cells via the activation of PI3K/cAMP dependent PKA pathway. *Transpl Immunol* (2006) 15(3): 187-97.
60. Narimatsu H, Wake A, Miura Y, Tanaka H, Matsumura T, Takagi S, Kato D, Myojo T, Kusumi E, Masuoka K, Miyakoshi S, Morinaga S, Saji H, Ichinohe T, Taniguchi S. Successful engraftment in crossmatch-positive HLA-mismatched peripheral blood stem cell transplantation after depletion of antidonor cytotoxic HLA antibodies with rituximab and donor platelet infusion. *Bone Marrow Transplant* (2005) 36(6): 555-6.
61. Navarrete CV. The HLA system in blood transfusion. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* (2000) 13(4): 511-32.
62. Nusbacher J, MacPherson JL, Gore I, Jr., Grinberg R. Inhibition of granulocyte erythrophagocytosis by HLA antisera. *Blood* (1979) 53(3): 350-7.
63. Ody C, Vaigot P, Quere P, Imhof BA, Corbel C. Glycoprotein Iib-IIIa is expressed on avian multilineage hematopoietic progenitor cells. *Blood* (1999) 93(9): 2898-906.
64. Opelz G. New Immunosuppressants and HLA Matching. *Transplant Proc* (2001) 33: 467-468.
65. Ottinger HD, Müller C, Riebschläger S, Arnold R, Beelen DW, Blasczyk R, Ehninger G, Einsele H, Finke J, Haag C, Holler C, Kolb HJ, Kolbe K, Kremens B, Mytilineos J, Seidl C, Zander AR, Grosse-Wilde H. Dritter deutscher Konsensus zur immungenetischen Spenderauswahl für die allogene Stammzelltransplantation. Deutsche Gesellschaft für Immungenetik, Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation (1999).

66. Ottinger HD, Muller CR, Goldmann SF, Albert E, Arnold R, Beelen DW, Blasczyk R, Bunjes D, Casper J, Ebell W, Ehninger G, Eiermann T, Einsele H, Fauser A, Ferencik S, Finke J, Hertenstein B, Heyll A, Klingebiel T, Knipper A, Kremens B, Kolb HJ, Kolbe K, Lenartz E, Lindemann M, Muller CA, Mytilineos J, Niederwieser D, Runde V, Sayer H, Schaefer UW, Schmitz N, Schroder S, Schulze-Rath R, Schwerdtfeger R, Siegert W, Thiele B, Zander AR, Grosse-Wilde H. Second German consensus on immunogenetic donor search for allotransplantation of hematopoietic stem cells. *Ann Hematol* (2001) 80(12): 706-14.
67. Ottinger HD, Rebmann V, Pfeiffer KA, Beelen DW, Kremens B, Runde V, Schaefer UW, Grosse-Wilde H. Positive serum crossmatch as predictor for graft failure in HLA-mismatched allogeneic blood stem cell transplantation. *Transplantation* (2002) 73(8): 1280-5.
68. Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* (1969) 280(14): 735-9.
69. Petersdorf EW, Gooley TA, Anasetti C, Martin PJ, Smith AG, Mickelson EM, Woolfrey AE, Hansen JA. Optimizing outcome after unrelated marrow transplantation by comprehensive matching of HLA class I and II alleles in the donor and recipient. *Blood* (1998) 92(10): 3515-20.
70. Petersdorf EW, Hansen JA, Martin PJ, Woolfrey A, Malkki M, Gooley T, Storer B, Mickelson E, Smith A, Anasetti C. Major-histocompatibility-complex class I alleles and antigens in hematopoietic-cell transplantation. *N Engl J Med* (2001) 345(25): 1794-800.
71. Petersdorf EW. HLA matching in allogeneic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol* (2004) 11(6): 386-91.

72. Petersdorf EW, Malkki M. Human leukocyte antigen matching in unrelated donor hematopoietic cell transplantation. *Semin Hematol* (2005) 42(2): 76-84.
73. Petz LD. Hemolysis associated with transplantation. *Transfusion* (1998) 38(3): 224-8.
74. Przepiorka D, Smith TL, Folloder J, Khouri I, Ueno NT, Mehra R, Korbling M, Huh YO, Giralt S, Gajewski J, Donato M, Cleary K, Claxton D, Braunschweig I, van Besien K, Andersson BS, Anderlini P, Champlin R. Risk factors for acute graft-versus-host disease after allogeneic blood stem cell transplantation. *Blood* (1999) 94(4): 1465-70.
75. Pschyrembel W. Pschyrembel, klinisches Wörterbuch. 259. Auflage (2002), de Gruyter. S. 1577
76. Qazilbash MH, Saliba R, De Lima M, Hosing C, Couriel D, Aleman A, Roden L, Champlin R, Giralt SA. Second autologous or allogeneic transplantation after the failure of first autograft in patients with multiple myeloma. *Cancer* (2006) 106(5): 1084-9.
77. Renz-Poster H, Krautzig S, Braun J. Basislehrbuch Innere Medizin. 3. Auflage (2004), Urban und Fischer. S. 405
78. Sasazuki T, Juji T, Morishima Y, Kinukawa N, Kashiwabara H, Inoko H, Yoshida T, Kimura A, Akaza T, Kamikawaji N, Kodera Y, Takaku F. Effect of matching of class I HLA alleles on clinical outcome after transplantation of hematopoietic stem cells from an unrelated donor. *Japan Marrow Donor Program. N Engl J Med* (1998) 339(17): 1177-85.
79. Serke S, Sauberlich S, Abe Y, Huhn D. Analysis of CD34-positive hemopoietic progenitor cells from normal human adult peripheral blood: flow-cytometrical

- studies and in-vitro colony (CFU-GM, BFU-E) assays. *Ann Hematol* (1991) 62(2-3): 45-53.
80. Serke S, Sauberlich S, Huhn D. Multiparameter flow-cytometrical quantitation of circulating CD34(+)-cells: correlation to the quantitation of circulating haemopoietic progenitor cells by in vitro colony-assay. *Br J Haematol* (1991) 77(4): 453-9.
81. Shepard SL, Hadley AG. Monocyte-bound monoclonal antibodies inhibit the Fc gamma RI-mediated phagocytosis of sensitized red cells: the efficiency and mechanism of inhibition are determined by the nature of the antigen. *Immunology* (1997) 90(2): 314-22.
82. Southcott MJ, Tanner MJ, Anstee DJ. The expression of human blood group antigens during erythropoiesis in a cell culture system. *Blood* (1999) 93(12): 4425-35.
83. Stussi G, Seebach L, Muntwyler J, Schanz U, Gmur J, Seebach JD. Graft-versus-host disease and survival after ABO-incompatible allogeneic bone marrow transplantation: a single-centre experience. *Br J Haematol* (2001) 113(1): 251-3.
84. Stussi G, Muntwyler J, Passweg JR, Seebach L, Schanz U, Gmur J, Gratwohl A, Seebach JD. Consequences of ABO incompatibility in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* (2002) 30(2): 87-93.
85. Takahashi R, Sekine N, Nakatake T. Influence of monoclonal antiplatelet glycoprotein antibodies on in vitro human megakaryocyte colony formation and proplatelet formation. *Blood* (1999) 93(6): 1951-8.

86. Takemoto SK, Zeevi A, Feng S, Colvin RB, Jordan S, Kobashigawa J, Kupiec-Weglinski J, Matas A, Montgomery RA, Nickerson P, Platt JL, Rabb H, Thistlethwaite R, Tyan D, Delmonico FL. National conference to assess antibody-mediated rejection in solid organ transplantation. *Am J Transplant* (2004) 4(7): 1033-41.
87. Tasaki T, Sasaki S, Gotoh K, Itoh C, Itoh S, Kuriya S. Multiple red blood cell antibodies produced by donor B lymphocytes after ABO-matched allogeneic bone marrow transplantation. *Transfus Sci* (1999) 20(2): 121-7.
88. Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant* (2003) 3(6): 665-73.
89. Thomas ED. Landmarks in the development of hematopoietic cell transplantation. *World J Surg* (2000) 24(7): 815-8.
90. Ting A, Pun A, Dodds AJ, Atkinson K, Biggs JC. Red cell alloantibodies produced after bone marrow transplantation. *Transfusion* (1987) 27(2): 145-7.
91. Van Rood JJ, Eernisse JG, Van Leeuwen A. Leucocyte antibodies in sera from pregnant women. *Nature* (1958) 181(4625): 1735-6. Zit. n. Thomas ED. Landmarks in the development of hematopoietic cell transplantation. *World J Surg* (2000) 24(7): 815-8.
92. Vaughan JI, Manning M, Warwick RM, Letsky EA, Murray NA, Roberts IA. Inhibition of erythroid progenitor cells by anti-Kell antibodies in fetal alloimmune anemia. *N Engl J Med* (1998) 338(12): 798-803.
93. Wagner T, Bernaschek G, Geissler K. Inhibition of megakaryopoiesis by Kell-related antibodies. *N Engl J Med* (2000) 343(1): 72.

94. Warren DS, Zachary AA, Sonnenday CJ, King KE, Cooper M, Ratner LE, Shirey RS, Haas M, Leffell MS, Montgomery RA. Successful renal transplantation across simultaneous ABO incompatible and positive crossmatch barriers. *Am J Transplant* (2004) 4(4): 561-8.
95. Wernet D, Schnaidt M, Northoff H. Reactivation of recipient antibody to blood cell antigens soon after allogeneic bone marrow transplantation. *Vox Sang* (1996) 71(4): 212-5.
96. Worel N, Kalhs P, Keil F, Prinz E, Moser K, Schulenburg A, Mitterbauer M, Mannhalter C, Mayr WR, Schwarzingler I, Hocker P, Lechner K, Greinix HT. ABO mismatch increases transplant-related morbidity and mortality in patients given nonmyeloablative allogeneic HPC transplantation. *Transfusion* (2003) 43(8): 1153-61.
97. Wunder E. Short Term Colony Assay for CFU-GM. *Hematopoietic Stem Cells*. 1994, AlphaMed Press, Dayton, Ohio, USA.
98. Xia L, Fang J, You Y, Guo T, Liu F, Zhang C, Jiang H, Zou P. Allogeneic peripheral blood hematopoietic stem cell transplantation for patients with hematologic malignancies. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* (2006) 26(1): 47-9.
99. Young PP, Goodnough LT, Westervelt P, Diersio JF. Immune hemolysis involving non-ABO/RhD alloantibodies following hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* (2001) 27(12): 1305-10.
100. Zachary AA, Montgomery RA, Ratner LE, Samaniego-Picota M, Haas M, Kopchaliiska D, Leffell MS. Specific and durable elimination of antibody to donor HLA antigens in renal-transplant patients. *Transplantation* (2003) 76(10): 1519-25.

10 Danksagung

Herrn Professor Dr. Dr. Walter Sibrowski danke ich für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, die Laboratorien des Institutes für Transfusionsmedizin nutzen zu können.

Mein besonderer Dank für eine hervorragende Zusammenarbeit gilt auch Herrn Priv.-Doz. Dr. Uwe Cassens, der mir beim Entwurf und bei der Durchführung der Arbeit jederzeit mit Rat und Unterstützung zur Seite stand.

Auch den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Transfusionsmedizin möchte ich für ihre Hilfe bei praktischen und organisatorischen Fragen danken, dabei gilt mein besonderer Dank Frau Verena Valtwies und Frau Marion Behr.

Herrn Johannes Gerss aus dem Institut für Biomathematik und medizinische Informatik danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung und Darstellung meiner Daten.

11 Lebenslauf

Name	Catrin Surholt
Geburtsort	Münster
Geburtsdatum	22.08.1981
Konfession	römisch-katholisch
Eltern	Ingeborg Surholt, geb. Hartmann (gelernte Bürokauffrau, Hausfrau) Heinrich Surholt, Finanzbeamter
Schulbildung	1988 – 1992 Nikolaischule Wolbeck 1992 – 2001 Gymnasium Wolbeck 29.05.2001 Allgemeine Hochschulreife
Ausbildung	2001 – 2007 Studium der Medizin, Westfälische Wilhelms- Universität Münster 10.09.2003 Ärztliche Vorprüfung 07.12.2007 Ärztliche Prüfung
Approbation	18.12.2007

Münster, den 07.05.2008