

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

***IN VITRO* GELAGERTE ERYTHROZYTEN ZEIGEN EIN
CHARAKTERISTISCHES INTERAKTIONSPROFIL
MIT IMMUNZELLEN**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium
der medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Haarmann, geb. Bienek, Natalie Martha
aus Königshütte

2007

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

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

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 2007

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

***In vitro* gelagerte Erythrozyten zeigen ein charakteristisches Interaktionsprofil mit Immunzellen**

Haarmann, geb. Bienek, Natalie Haarmann

Das Erythrozytenkonzentrat (EK) ist die am häufigsten transfundierte Blutkomponente. Eine Lagerung von Erythrozyten (RBC) außerhalb des Organismus führt jedoch zu multiplen Veränderungen an den RBC, die als Lagerungsschaden bezeichnet werden und weitreichende rheologische und möglicherweise auch immunologische Auswirkungen für den Patienten haben können. Daher beschäftigt sich diese Arbeit im Wesentlichen mit zwei Fragen:

- 1) Lässt sich *in vitro* ein Einfluss der Erythrozytenlagerung auf Interaktionen hämotherapeutisch angewandter RBC-Präparationen mit antigenpräsentierenden Zellen (APC) und mit Endothelzellen (EC) nachweisen?
- 2) Ist der Einfluss der Erythrozytenlagerung auf Interaktionen hämotherapeutisch angewandter RBC-Präparationen mit APC und mit EC von funktioneller Relevanz?

Es wurde ein methodischer Ansatz etabliert und validiert, der die biomolekulare Interaktionsanalyse mittels IAsys®-Technologie mit der Analyse von Genexpressionsprofilen mittels cDNA-Chips verknüpft. Es wurden Interaktionen zwischen einerseits gelagerten RBC und andererseits T-Zellen (Treg), dendritischen Zellen (DC), Monozyten und humanen venösen (HSaVEC), aortalen (HAoEC) und mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) in Anwesenheit von HBS oder Vollblut untersucht.

Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- 1) Die Bindung gelagerter RBC mit DC, Monozyten und HDMEC in Gegenwart von Vollblut im Vergleich von Tag 1 und Tag 28 nimmt statistisch signifikant ab. Die Bindung der RBC in HBS im Vergleich von Tag 1 zu Tag 28 stellt sich in der Regel als vermindert dar, ohne statistisch signifikant zu sein. An Tag 1 ist die Bindung der RBC an alle immobilisierten Liganden in HBS grundsätzlich niedriger als in Vollblut, wobei sie nur für Monozyten, HAoEC, HSaVEC und HDMEC Signifikanz erreicht.
- 2) Gelagerte RBC zeigen in APC und EC charakteristische Genexpressionsprofile und regulieren nach einer Lagerdauer von 21 und 42 Tagen in APC und in EC besonders die Gene signifikant, welche an der „zellulären Signaltransduktion“ und am „zellulären Stress“ beteiligt sind.

Die Ergebnisse lassen folgende Schlussfolgerungen zu:

- 1) Die Interaktion von RBC mit DC, Monozyten und HDMEC wird im Medium Vollblut durch steigende Lagerdauer der Erythrozyten signifikant supprimiert, während sich im Medium HBS mit steigender Lagerdauer keine signifikante Abnahme der Bindungsintensität feststellen lässt. Zudem interagieren frische RBC in HBS signifikant schwächer mit Monozyten und EC als in Vollblut.
- 2) Die Interaktion von gelagerten EK mit Endothelzellen und antigenpräsentierenden Zellen induziert charakteristische Genexpressionsprofile. Zusätzlich konnte ein Versuchsdesign etabliert werden, welches prinzipiell geeignet ist, verschiedene Markergene für RBC-Zell-Interaktionen zu identifizieren.

Der entwickelte experimentelle Ansatz ist somit prinzipiell dazu geeignet, den Einfluss der Lagerdauer von EK auf RBC-Zell-Interaktionen und auf Genexpressionsprofile von Monozyten und mikrovaskulären Endothelzellen zu beschreiben und zu analysieren. Außerdem erlaubt er es, Markergene für RBC-Zell-Interaktionen zu identifizieren und möglicherweise in Zukunft neue Qualitätskontrollen für Blutprodukte zu entwickeln.

Inhaltsübersicht

Abkürzungsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis.....	X
Tabellenverzeichnis.....	XI
1. Einleitung.....	1
1.1. Erythrozytentransfusion	1
1.1.1. Indikationen, Kontraindikationen, unerwünschte Wirkungen	1
1.1.2. Zusammensetzung leukozytendepletierter EK in Additivlösung	2
1.2. Antigenpräsentierende Zellen	4
1.3. Endothelzellen.....	5
1.4. Hämorheologische Aspekte der Erythrozytentransfusion	7
1.4.1. Rolle der Erythrozyten in der Hämorheologie.....	7
1.4.2. Rolle der Blutgefäßwand in der Hämorheologie	8
1.4.3. Einfluss der Erythrozytenlagerung auf hämorheologische Parameter.....	9
1.4.4. Problematik der Lagerungsschäden von Erythrozytenkonzentraten.....	10
1.5. Fragestellung der Arbeit	12
2. Material und Methoden.....	13
2.1. Verwendete Materialien.....	13
2.2. Herkunft und Eigenschaften der verwendeten Blutpräparate	15
2.3. Herkunft und Isolierung der untersuchten Zielzellen (regulatorische T-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, Endothelzellen)	17
2.3.1. Lymphozytenisolierung aus Buffy coats	17
2.3.2. Regulatorische T-Zellen.....	17
2.3.3. Dendritische Zellen	18
2.3.4. Monozyten	19
2.3.5. Endothelzellen.....	19
2.4. IAsys®-Technologie	21
2.4.1. Funktionsweise des IAsys®-Gerätes	21
2.4.2. Immobilisierung der Liganden.....	22
2.4.3. Messvorgang	24

2.5. Microarrays	26
2.5.1. Technologie.....	26
2.5.2. Versuchsaufbau und Durchführung der Piquor TM Microarrays	27
2.6. Statistische Auswertung.....	30
3. Ergebnisse.....	32
3.1. Biomolekulare Interaktionsanalysen.....	32
3.1.1. Validierung und Qualitätskontrolle der Methodik.....	32
3.1.2. Ergebnisse der IAsys®-Messungen.....	36
3.2. Genexpressionsanalysen	52
4. Diskussion	61
4.1. Lässt sich <i>in vitro</i> ein Einfluss der Erythrozytenlagerung auf Interaktionen hämotherapeutisch angewandter RBC-Präparationen mit APC und mit EC nachweisen?	64
4.2. Ist der Einfluss der Erythrozytenlagerung auf Interaktionen hämotherapeutisch angewandter RBC-Präparationen mit APC und EC von funktioneller Relevanz?	65
4.3. Zusammenfassung und Ausblick	67
Anhang.....	68
Literaturverzeichnis	70

Abkürzungsverzeichnis

ACD	Adenin-Citrat-Dextrose
APC	antigen presenting cell
arc sec	Winkelsekunden (Bogenmaß)
aRNA	amplifizierte antisense RNA
BS ³	bis(sulfosuccinimidyl)suberate
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
Ca	Calcium
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cy3-dCTP	Cyanin3-Desoxycytidintriphosphat
Cy5-dCTP	Cyanin5-Desoxycytidintriphosphat
d	Tag
DC	dendritic cell
DEHP	Di-(2-ethylhexyl)phthalat
d.h.	das heißt
DPG	Diphosphoglycerat
EC	endothelial cell
ECGS	endothelial cell growth supplement
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
EDHF	endothelium-derived hyperpolarizing factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EK	Erythrozytenkonzentrat
f	folgende
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Fc	Fragment cristalline
FCS	Fetal Calf Serum
ff	fortfolgende

h	Stunde
HAoEC	Human Aortic Endothelial Cell
HBS	siehe HepesBSS
HCl	Salzsäure
HDMEC	Human Microvascular Endothelial Cell, aus Dermis isoliert
Hepes	N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulphonic acid]
HepesBSS	Hepes Buffered Saline Solution
HIV	human immunodeficiency virus
HSaVEC	Human Saphenous Vein Endothelial Cell
i.A.a.	in Anlehnung an
ICAM	intercellular adhesion molecule
LFA	functional leukocyte antigen
MACS	Magnetic Cell Sorting
Mg	Magnesium
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	messenger ribonucleic acid
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
n	Summe
ng	Nanogramm
NHS	N-Hydroxysuccinimide
NO	Stickstoffmonoxid
o.g.	oben genannt
PBL	peripheral blood lymphocytes
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PBS/T	PBS, welches Tween 20 TM mit einer Konzentration von 0,05% enthält
pH	pondus Hydrogenii
PIQUOR	Parallel Identification and Quantification of RNAs
RBC	red blood cell
Rh pos.	Rhesus positiv

RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Kulturmedium)
SAG	saline Adenin-Glucose
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
TM	Trade Mark
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TNS	Trypsin Neutralising Solution
TRADD	TNFR-associated death domain
Treg	Regulatorische T-Zellen
U	Umdrehung
USP	United States Pharmacopeial
usw.	und so weiter
WWU	Westfälische Wilhelms-Universität
Vol.	Volumen
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Heterogenität von Endothelzellen.....	6
Abbildung 2: IAsys®-Küvette	21
Abbildung 3: IAsys®-Funktionsmechanismus	22
Abbildung 4: Immobilisierungsmechanismus am Beispiel einer Carboxylatoberfläche	23
Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Messzyklus.....	25
Abbildung 6: Beispiel eines Graphen über den Zeitraum eines Messzyklus.....	25
Abbildung 7: unterschiedliches Expressionsprofil zweier Zellen.....	26
Abbildung 8: Beispiel für einen hybridisierten, fluoreszenzmarkierten Microarray	30
Abbildung 9: Ergebnisse der Kontrollmessungen mit Plasma zu verschiedenen Zeitpunkten der Lagerdauer an einer mit HSaVEC beschichteten Küvette.....	33
Abbildung 10: Ergebnisse der Messungen mit unterschiedlichen Analyten an einer mit HSaVEC beschichteten Küvette	35
Abbildung 11: Vergleich der Bindungsintensitäten von RBC an Treg im Medium HBS und Vollblut an unterschiedlichen Tagen der Lagerdauer	46
Abbildung 12: Vergleich der Bindungsintensitäten von RBC an DC im Medium HBS und Vollblut an unterschiedlichen Tagen der Lagerdauer	46
Abbildung 13: Vergleich der Bindungsintensitäten von RBC an Monozyten im Medium HBS und Vollblut an unterschiedlichen Tagen der Lagerdauer	47
Abbildung 14: Vergleich der Bindungsintensitäten von RBC an HAoEC im Medium HBS und Vollblut an unterschiedlichen Tagen der Lagerdauer	47
Abbildung 15: Vergleich der Bindungsintensitäten von RBC an HSaVEC im Medium HBS und Vollblut an unterschiedlichen Tagen der Lagerdauer	48
Abbildung 16: Vergleich der Bindungsintensitäten von RBC an HDMEC im Medium HBS und Vollblut an unterschiedlichen Tagen der Lagerdauer	48
Abbildung 17: Vergleich der Bindungsintensitäten von RBC an verschiedenen Liganden im Medium HBS am Tag 1 und Tag 28 der Lagerdauer.....	49
Abbildung 18: Vergleich der Bindungsintensitäten von RBC an Monozyten, HDMEC und DC im Medium Vollblut am Tag 1, 14 und 28 der Lagerdauer	50
Abbildung 19: Vergleich der Bindungsintensitäten von RBC an Treg, HAoEC und HSaVEC im Medium Vollblut am Tag 1, 14 und 28 der Lagerdauer	51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Qualitätskriterien transfundierbarer Erythrozytenkonzentrate	3
Tabelle 2:	Übersicht über die Hybridisierung der 4 Arrays.....	29
Tabelle 3:	Beispiel für Standardabweichungen anhand von Messungen mit Plasma als Analyt an HSaVEC, immobilisiert auf einer Carboxylat-Küvette.....	32
Tabelle 4:	Bindungsintensitäten und Standardabweichungen unterschiedlicher APC und EC mit 1 Tag und 7 Tage alten RBC in HBS und Vollblut.....	36
Tabelle 5:	Bindungsintensitäten und Standardabweichungen unterschiedlicher APC und EC mit 1 und 14 Tage alten RBC in HBS und Vollblut	37
Tabelle 6:	Bindungsintensitäten und Standardabweichungen unterschiedlicher APC und EC mit 1 und 21 Tage alten RBC in HBS und Vollblut	38
Tabelle 7:	Bindungsintensitäten und Standardabweichungen unterschiedlicher APC und EC mit 1 und 28 Tage alten RBC in HBS und Vollblut	39
Tabelle 8:	Bindungsintensitäten und Standardabweichungen unterschiedlicher APC und EC mit 7 und 14 Tage alten RBC in HBS und Vollblut	40
Tabelle 9:	Bindungsintensitäten und Standardabweichungen unterschiedlicher APC und EC mit 7 und 21 Tage alten RBC in HBS und Vollblut	41
Tabelle 10:	Bindungsintensitäten und Standardabweichungen unterschiedlicher APC und EC mit 7 und 28 Tage alten RBC in HBS und Vollblut	42
Tabelle 11:	Bindungsintensitäten und Standardabweichungen unterschiedlicher APC und EC mit 14 und 21 Tage alten RBC in HBS und Vollblut	43
Tabelle 12:	Bindungsintensitäten und Standardabweichungen unterschiedlicher APC und EC mit 14 und 28 Tage alten RBC in HBS und Vollblut	44
Tabelle 13:	Bindungsintensitäten und Standardabweichungen unterschiedlicher APC und EC mit 21 und 28 Tage alten RBC in HBS und Vollblut	45
Tabelle 14:	Differentielle Genexpression	52

1. Einleitung

1.1. Erythrozytentransfusion

Gesunden Blutspendern können bis zu 500 ml Vollblut ohne klinische Symptomatik entnommen werden [18]. In der Regel werden 450-500 ml Vollblut nach Standardmethoden mit 63-70 ml einer sterilen, pyrogenfreien Stabilisatorlösung in einem geschlossenen Mehrfach-Blutbeutelssystem gemischt [66]. Der verwendete CPD-Stabilisator besteht zumeist aus Citrat, Phosphat und Dextrose oder aus CPDA-1, also mit Adenin-Zusatz, und hat einen pH-Wert von 5,6-5,8, so dass nach Vermischen mit dem Vollblut ein leicht saurer pH-Wert von 7,1-7,2 entsteht, der eine längere Lagerung bei 4°C ermöglicht [18, 66].

Durch hohe Nebenwirkungen, z.B. die Entstehung von Gerinnungsstörungen, Immunisierung gegen Leukozytenantigene und die Übertragung zellständiger Viren, ist die Vollblutkonserve heute aber nur noch eine Vorstufe bei der Herstellung von Blutpräparaten und Plasmaderivaten [5, 18, 66]. Um die Immunmodulation und das Infektionsrisiko zu vermindern, sind leukozytendepletierte Erythrozytenkonzentrate (EK) in Additivlösung heute die Standardpräparate [42]. Die EK werden in geschlossenen Systemen leukozytendepletiert, in der Regel mittels Filterung.

Die Lagerdauer der EK ist in Abhängigkeit von der Additivlösung und den Verfahren auf 28-49 Tage bei +4°C ±2°C beschränkt [9]. EK seltener Blutgruppen können mit hohem logistischen und finanziellen Aufwand kryokonserviert über mehrere Jahre gelagert werden [66].

1.1.1. Indikationen, Kontraindikationen, unerwünschte Wirkungen

Die Gabe von EK ist nur nach exakter Prüfung der Indikation und alternativer, gleichwertiger Therapiemöglichkeiten angezeigt. Es existieren keine absoluten und allgemeingültigen Grenzwerte für Hämoglobin und Hämatokrit, die eine Indikation klar aufzeigen. Außer den Laborwerten sind die Dauer, Schwere und Ursache der Anämie relevant sowie die Anamnese, das Alter und der klinische Zustand des Patienten [66]. Exemplarisch zeigt die Diskussion um kritische Hämoglobinwerte im Alter, dass das Ausmaß der Anämie als Transfusionstrigger patientengruppenspezifisch und individuell beurteilt werden muss [16].

Die klassischen Indikationen zur EK-Transfusion sind der akute Blutverlust und die Behandlung chronischer Anämien [57]. Bei kritischer Indikationsstellung und sachgerechter Anwendung der Blutprodukte sind keine absoluten oder relativen Kontraindikationen bekannt [66].

Nichtsdestotrotz können unerwünschte Arzneimittelnebenwirkungen auftreten, die sich im Wesentlichen in vier große Gruppen gliedern lassen: die hämolytische Transfusionsreaktion, immunologische Transfusionsreaktionen einschließlich der febrilen und allergischen Transfusionsreaktionen, transfusionsassoziierte Infektionen sowie Transfusionsreaktionen aufgrund metabolischer Störungen [57, 66]. Die Überwachung des Nebenwirkungsprofils der EK-Transfusion auf lokaler, regionaler und auch nationaler Ebene mit dem Ziel der Verbesserung der Sicherheit der Hämotherapie ist Aufgabe der Hämovigilanz.

Die bisher größte Hämovigilanz-Studie aus Großbritannien zeigt, dass bei weitgehender Beherrschung der klassischen transfusionsassoziierten Infektionsrisiken (HIV, HBV, HCV) die immunologischen Nebenwirkungen der Transfusion zunehmend wichtig werden [5, 7, 60]. In dem Zusammenhang ist anzumerken, dass Mechanismen der Antigenpräsentation, die für die Immunantwort auf Blutprodukte von zentraler Bedeutung sind, in der Literatur bisher nur in Einzelfällen Beachtung finden. Wie unter dem Punkt „Fragestellung“ der vorliegenden Arbeit zusammengefasst ist, gehört es zu den Zielen dieser Arbeit, funktionell relevante *in vitro*-Assays zur Untersuchung der Interaktionen gelagerter RBC mit APC zu entwickeln.

1.1.2. Zusammensetzung leukozytendepletierter EK in Additivlösung

Die wirksamen Bestandteile leukozytendepletierter EK sind funktionell und morphologisch intakte Erythrozyten. Zusätzliche Restbestandteile von Plasma, Thrombozyten, Stabilisatoren, additiven Lösungen und möglicherweise in minimalen Konzentrationen aus Blutbeuteln freigesetzten Weichmachern haben für die Wirksamkeit der EK keine wesentliche klinische Bedeutung und keinen therapeutischen Effekt [66].

Tabelle 1: Qualitätskriterien transfundierbarer Erythrozytenkonzentrate

EK-Qualitätskriterien	leukozytendepletiertes EK in Additivlösung	gewaschenes leukozyten- depletiertes EK
Volumen (ml)	200-350	200-300
Hämatokrit (%)	50-70	50-75
Hämoglobingehalt (mmol)	>24,8	>22,32
Leukozyten	<1x10 ⁶	<1x10 ⁶
Plasma (ml)	<25	<1
Hämolyse (%)	<0,8	<0,8

Funktionell und morphologisch intakte Erythrozyten sind bikonkave Scheiben mit einem Durchmesser von 7,5 - 8,3 μm und einer Dicke von 1,7 μm [42]. Sie machen 44 Vol.-% des Gesamtblutvolumens aus. Vom Restvolumen verteilen sich 55 Vol.-% auf Plasma, 0,5 Vol.-% auf Leukozyten und 0,4 Vol.-% auf Thrombozyten. Die Erythrozytenzahl pro μl beträgt bei einem Mann 4,6-6,2 Millionen und bei einer Frau 4,0-5,4 Millionen [29]. Die bikonkave Form der Erythrozyten dient einer guten Verformbarkeit, ist wichtig für die Blutviskosität und verhindert die Sequestration der Zellen, z.B. bei der Passage durch die Milz [42]. Durch äußere Krafteinwirkung können RBC so verformt werden, dass sie durch Kapillargefäße passen, deren Durchmesser kleiner 0,75 μm ist [15, 29, 42]. Dadurch können sie selbst kleinste Gefäßbezirke mit Sauerstoff versorgen.

Reife RBC sind kern- und mitochondrienlos. 90% ihres Trockengewichts entfallen auf Hämoglobin, welches für den Austausch und Transport der Atemgase in Lunge, Blut und Gewebe verantwortlich ist [29]. Die durchschnittliche Lebensdauer von RBC beträgt 110-120 Tage, die Eliminationsrate liegt bei ca. 1% pro Tag. Da EK alle Altersstufen von RBC enthalten, beträgt die mittlere Überlebenszeit transfundierter RBC 57,7 Tage [66].

Neben der Funktion des Atemgastransportes haben RBC eine Vielzahl weiterer Aufgaben unter immunologischen, hämostaseologischen, infektiologischen, metabolischen und hämorheologischen Aspekten:

- RBC können das Wachstum und die Apoptose von T-Zell-Subpopulationen regulieren und somit die Immunabwehr unterdrücken [3, 7, 17].
- Es ist in der Literatur bekannt, dass die Applikation der als Alternative zum EK entwickelten Hämoglobinlösungen bei kritisch kranken Patienten die Entwicklung einer

Sepsis beeinflussen können [7, 33]. Diese Daten zeigen, dass die Erythrozytenmembran eine Rolle bei der Infektabwehr spielen muss, obwohl die pathophysiologischen Mechanismen im Detail noch unbekannt sind.

- RBC können die Plättchenaggregation beeinflussen [21].
- Durch die hohe Pufferkapazität des Blutes können größere Azidosen oder Alkalosen vermieden werden [29].
- Unter hämorheologischen Aspekten wird zunehmend der Einfluss des Hämoglobins auf den Nitratstoffwechsel und in diesem Zusammenhang auf die Regulierung des Gefäßtonus klinisch relevant [55].

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die EK-Transfusion durchaus der Transplantation eines flüssigen Gewebes mit sehr vielschichtigen und komplexen Funktionen gleichkommt. Unter klinischen und wissenschaftlichen Aspekten ist daher kritisch zu diskutieren, ob ein EK als ein nach Arzneimittelkriterien standardisierbares Arzneimittel angesehen werden kann [64].

1.2. Antigenpräsentierende Zellen

Die Präsentation von dem Organismus fremden Molekülen auf allogenen Geweben erfolgt auf einer Vielzahl hochspezialisierter Zellen des Empfängerorganismus, den so genannten antigenpräsentierenden Zellen (APC). APC differieren in Morphologie und Funktion erheblich in Abhängigkeit von der Biochemie des Moleküls, das sie präsentieren (Lipid-, Zucker-, Proteinstruktur). Am gründlichsten untersucht in der Immunologie ist die Antigenpräsentation von Proteinantigenen. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich im Hinblick auf Antigenpräsentation daher auf Proteinantigene.

APC nehmen beim erstmaligen Kontakt des Organismus mit einem Proteinantigen diese exogenen Antigene auf, fragmentieren sie proteolytisch und präsentieren sie mit spezifischen Membranproteinen der MHC-Klasse I und II auf der Zelloberfläche.

Im Anschluss werden sie in der Regel T-Helfer-Zellen präsentiert. In Verbindung mit einem costimulatorischen Signal kommt es zur Aktivierung ruhender T-Helfer-Zellen und über die Interaktion der aktivierten T-Helfer-Zellen mit antikörperproduzierenden Zellen zur humoralen Immunantwort. Die humorale Immunantwort, das heißt die Antikörperantwort, ist die

klassische Immunantwort auf den Kontakt eines Organismus mit im Rahmen der EK-Transfusion verabreichten fremden RBC.

Zu den APC, die im Sinne der Immunantwort auf Proteinantigene relevant sind, zählt man klassischerweise dendritische Zellen, Monozyten bzw. Makrophagen und auch B-Lymphozyten. Die stärkste Immunstimulation bewirken dendritische Zellen [37, 53].

Neuere Literatur zeigt aber eindeutig, dass Antigenpräsentation durch B-Lymphozyten auch für die EK-Transfusion diskutiert werden muss: Zunehmend setzt sich die Erkenntnis durch, dass B-Lymphozyten nicht nur lösliche Antigene präsentieren, sondern auch membrangebundene Antigene internalisieren und präsentieren können [4, 11].

1.3. Endothelzellen

Endothelzellen stellen einen einschichtigen Verband flacher Zellen dar und bilden so die innere Auskleidung von Blut- und Lymphgefäßen und serösen Höhlen. Durch die Bildung von rohrähnlichen Hohlräumen sind sie in der Lage die Grenzfläche zwischen zirkulierender Flüssigkeit und dem Gewebe der Gefäßwand zu stellen [50]. Dabei ist es von funktioneller Bedeutung, ob die EC sich im arteriellen, venösen oder kapillären Gefäßabschnitt befinden, da die EC in unterschiedlichen Gefäßbereichen unterschiedliche Funktionen haben und sich demzufolge auch morphologisch voneinander unterscheiden [13, 24]. Neben seiner Funktion als passive Barriere regelt das EC den Austausch von Substanzen zwischen Gewebe und Blut. Es ist an der Regulation der Blutgerinnung und der Wundheilung sowie an der Induktion der Gefäßneubildung beteiligt. Der Gefäßtonus wird über Stickstoffmonoxid vom Endothel mitbestimmt [30, 62]. Neuere Studien konnten nachweisen, dass mit steigender Lagerdauer der EK der Anteil des freien Hämoglobins ebenfalls ansteigt, welches die NO-Moleküle bindet und über Vasokonstriktion zu einem Blutdruckanstieg führt [31]. Rothermel et al. konnten darüber hinaus *in vivo* an Mäusen nachweisen, dass Endothelzellen im Rahmen einer transplantationsrelevanten immunologischen Antwort Antigene präsentieren können [51, 52]. Pober und Kollegen haben in einer Reihe von Arbeiten zeigen können, dass Interaktionen zwischen EC und T-Zellen die Funktionen des Gefäßsystems und des Immunsystems miteinander verknüpfen [13]. Obwohl EC-RBC-Interaktionen in Abhängigkeit von der Lagerdauer transfundierter RBC die Funktion des Endothels auch unter immunologischen Aspekten beeinflussen könnten, finden solche Aspekte der Lagerdauer transfundierter EK in der Literatur bisher keine Beachtung.

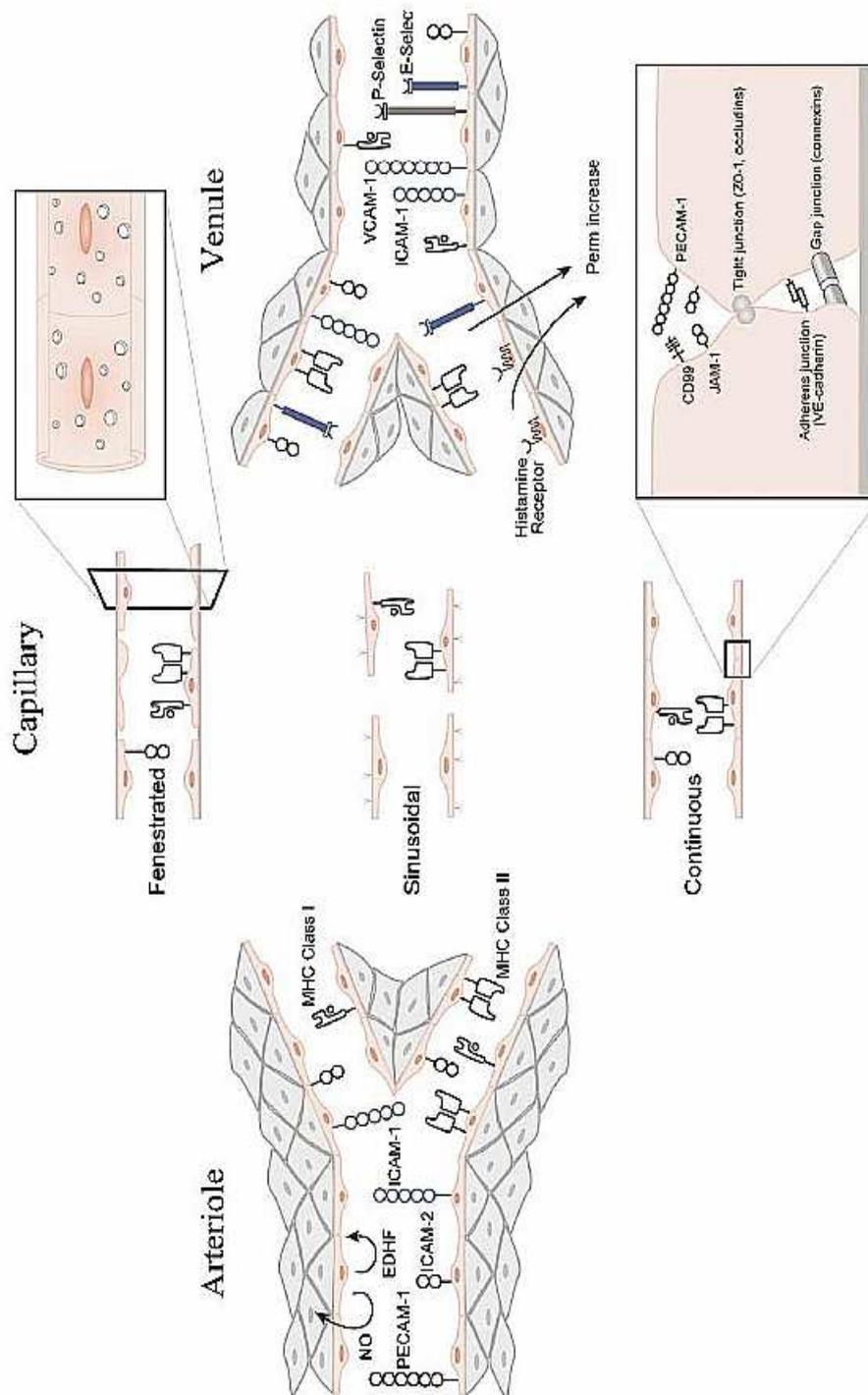


Abbildung 1: Heterogenität von Endothelzellen.

Erkennbar sind Spezialisierungen auf arterielle, venöse und kapilläre Endothelzellen. Arterielle EC kontrollieren den Blutfluss mittels NO und EDHF-Produktion, venöse EC rekrutieren Leukozyten mittels Adhäsionsmolekülen, und kapilläre EC sichern den Stoffaustausch durch fenestrierte oder sinusoidale Gefäßabschnitte. Übernommen aus Annual Review of Immunology, Volume 22 © 2004 mit freundlicher Genehmigung von Annual Reviews, www.annualreviews.org

1.4. Hämorheologische Aspekte der Erythrozytentransfusion

Hämorheologie beschäftigt sich mit den Fließeigenschaften des Blutes. Sie ist insbesondere im mikrovaskulären Bereich relevant und wird bei konstanter Temperatur, konstantem Druckgradienten und konstanten Strömungsbedingungen wesentlich von der Blutviskosität determiniert. Die Blutviskosität ist ein multifaktorielles System, in das besonders die korpuskulären Bestandteile des Blutes, die Erythrozytenverformbarkeit, die Erythrozytenaggregation und daneben auch der Proteingehalt des Plasmas einfließen [20, 42, 63].

Hämorheologische Aspekte haben eine große Bedeutung in der Transfusionsmedizin [5, 19]. Insbesondere die Problematik der EK-Lagerung ist im Kontext der Hämorheologie wichtig. Durch eine Lagerung der RBC außerhalb des Organismus kommt es zu multiplen Veränderungen an den Erythrozyten, die die Hämorheologie negativ beeinflussen können. Der Vorgang wird als Lagerungsschaden bezeichnet [66]. Im Folgenden werden die einzelnen Determinanten physiologischer Einflüsse der RBC und der EC auf die Hämorheologie und die Determinanten des Lagerungsschadens ausführlicher beschrieben.

1.4.1. Rolle der Erythrozyten in der Hämorheologie

Zwei für die Blutviskosität relevante Faktoren sind zum einen die Neigung der Erythrozyten, Aggregate zu bilden und zum anderen ihre mechanischen Eigenschaften.

Bei verlangsamter Strömungsgeschwindigkeit lagern sich RBC aneinander und bilden Aggregate, so genannte Rouleaux-Formationen, die die Blutströmung behindern oder sogar zum Stillstand bringen. Bevorzugt können Stillstände in den Kapillaren und postkapillären Venolen auftreten, hier sind die Scherkräfte und Schubspannungen am niedrigsten. Das Blut wird zum festen Körper und verursacht eine Stase. Das Ausmaß der Aggregation ist zusätzlich abhängig von Hämatokrit und Plasmaviskosität [42].

RBC sind durch den Aufbau ihrer Zellmembran, durch das günstige Verhältnis der Zelloberfläche zum Zellvolumen und durch ihren niedrigviskosen Zellinhalt leicht verformbar und können auf diese Weise Kapillare mit einem Durchmesser von $<7,5 \mu\text{m}$ passieren [15]. Durch Verhärtung der Membran, Viskositätssteigerung des Zellinhalts, Schrumpfung (zur Stechapelform) oder Aufquellen in hypotonen Lösungen verlieren sie ihre Fluidität und ver-

schlechtern die Blutströmung. Typische Erkrankungen in diesem Zusammenhang sind die Sichelzellanämie und die Sphärozytose [42, 50].

Die Viskosität des Plasmas wird in erster Linie durch die Konzentration von Proteinen mit einem hochmolekularen Aufbau determiniert, die im Wasser kolloidal gelöst sind. Dazu zählen z.B. Fibrinogen, α_2 -Makroglobulin und IgM. Je größer ein Eiweißmolekül ist und je mehr es von der sphärischen Form abweicht, desto größer ist sein hämorheologischer Einfluß. Eine pathologische Zunahme der Plasmaproteine und zusätzlicher Paraproteine findet man z.B. beim Plasmacytom. Die Geldrollenbildung der RBC ist besonders beim Plasmacytom in der Literatur gut bekannt [20, 42, 48].

1.4.2. Rolle der Blutgefäßwand in der Hämorheologie

Die Bedeutung der Gefäßwand für die Hämorheologie wird durch das Verständnis der Rolle der Leukozyten deutlich. Da Leukozyten eine weniger flexible Membran als RBC besitzen, können sie durch Kapillaren, deren Durchmesser kleiner ist als der Durchmesser der Leukozyten, nur sehr schwer fließen. Ihre dadurch verlangsamte Strömungsgeschwindigkeit behindert die sich dahinter akkumulierenden Erythrozyten. Aus diesem Grund kann der Strömungswiderstand steigen, die Blutströmungsgeschwindigkeit verlangsamt sich, und eine vollständige Verlegung von Blutgefäßen kann eintreten, insbesondere bei einer pathologischen Erhöhung der Leukozytenwerte, wie z.B. bei akuten Leukämien [42, 63].

Das Endothel hat unter anderem die Funktion, Leukozyten zur Immunabwehr aus dem strömenden Blut in das Gewebe zu rekrutieren [32, 42, 51, 52]. Im Bereich einer lokalen Entzündung oder Verletzung kommt es zu einer schwachen Bindung zwischen auf dem Endothel sezernierten Selektinen und Leukozyten. Da die Bindung noch nicht genügend stark ist, rollen die Leukozyten mit dem Blutfluss am Endothel entlang, bilden dabei neue Verbindungen und lösen die alten, bis es zu einer stabilen Verbindung zwischen ICAM-1 auf dem Endothel und LFA-1 auf dem Leukozyten kommt. Daran schließen sich die Diapedese des Leukozyten durch die Gefäßwand und die Migration zum Ort der Noxe entlang eines chemotaktischen Gradienten an [32, 42].

Es wird vermutet, dass ein Multiorganversagen nach Sepsis, Polytrauma, Verbrennungen oder Reperfusion nach Ischämie durch eine generalisierte und nicht mehr nur lokal begrenzte Leukozyten-Endothel-Interaktion verursacht wird [44].

Neuere *in vitro* - Studien lassen die Hypothese zu, dass die Adhäsion von RBC an das Endothel mit zunehmender Lagerdauer ebenfalls sinkt und somit Einfluss auf die hämorheologischen Eigenschaften des Blutes nimmt [38].

1.4.3. Einfluss der Erythrozytenlagerung auf hämorheologische Parameter

Wie bereits dargestellt, spielt die Erythrozytenlagerung für die hämorheologischen Parameter des sogenannten Lagerungsschadens eine wesentliche Rolle. Die bisher untersuchten Aspekte eines Lagerungsschadens können wie folgt zusammengefasst werden:

- Mit zunehmender Lagerdauer verringert sich der ATP-Gehalt der RBC, und es kommt zum Lipidverlust in der Zellmembran, zur Sphärozytose, Stechapfelformen und steigender Rigidity der Erythrozyten. Diese nicht nur hämorheologisch sondern auch klinisch relevanten Auswirkungen können durch den Zusatz von Adenin und Inosin zur Stabilisatorlösung vermindert werden [42, 64].
- Es kommt mit zunehmender Lagerdauer zur Erhöhung der Laktatkonzentration und Freisetzung von Inhaltsstoffen der Erythrozyten, wie Kalium, Laktatdehydrogenase oder Hämoglobin im Blutprodukt [66].
- Die lagerungsbedingte Schwellung, Entstehung einer Kugelform und Hämolyse der RBC wird weitestgehend durch den Zusatz von Mannitol zur Stabilisatorlösung vermieden [42, 66].
- Gelagerte RBC, die zum Zeitpunkt der Transfusion alt sind, exprimieren mehr Annexin V als junge transfundierbare RBC, welches ein Zeichen verstärkter Apoptose ist [59].
- Eine erhöhte Aggregationsbereitschaft von RBC in Abhängigkeit von der Lagerdauer konnte *in vitro* nachgewiesen werden [28]. Die Ausbildung von Mikroaggregaten in EK wird jedoch durch Leukozytendepletion des Produkts minimiert [42].
- Ein Abfall des pH-Werts von 7,1-7,2 auf 6,85 in CPD-Konserven bis zum Ende der Lagerungsperiode ist bekannt und wird derzeit als klinisch tolerabel angesehen. Ein weiterer Abfall durch noch längere Lagerung beeinträchtigt die Energiegewinnung der Erythrozyten über die enzymatisch gesteuerte Glykolyse, hat eine Linksverschiebung der Sauerstoffdissoziationskurve zur Folge und verhindert somit eine Freisetzung von Sauerstoff ins Gewebe [18, 42, 47, 64].

- Proteine von gelagerten RBC werden durch Hämolyse freigesetzt und können mit zunehmender Lagerdauer ihr Molekulargewicht und den isoelektrischen Punkt verändern [1].
- Funktionell relevante Membranbestandteile der RBC werden im Rahmen der Lagerung verändert. So konnte z.B. eine veränderte Expression der Blutgruppenmerkmale Lewis und P im Verlauf der Lagerung nachgewiesen werden [43].
- Im Verlauf der EK-Lagerung werden Zuckerreste auf der Oberfläche der RBC exprimiert, die eine positive serologische Verträglichkeitsprobe auslösen könnten [42].
- In Abhängigkeit vom Lipidgehalt und Lagerdauer des EK wird der Plastikweichmacher (DEHP) aus Blutbeuteln freigesetzt [66]. Dieser Effekt kann besonders für Risikogruppen wie Frühgeborene mit hohem und langfristigem Transfusionsbedarf klinisch relevant sein [35, 36].

1.4.4. Problematik der Lagerungsschäden von Erythrozytenkonzentraten

Ein zentrales Problem der Hämotherapie ist es seit langem, Blut *in vitro* so zu konservieren, dass die Funktionsfähigkeit seiner Bestandteile voll erhalten bleibt und gleichzeitig die Transfundierbarkeit der Blutbestandteile über einen ausreichend langen Zeitraum gewährleistet ist [41]. Besonders in den Zeiten vor dem ersten und dem zweiten Weltkrieg haben sich Rous, Turner, Robertson et al. durch die Lagerung von Blut in einer Citrat-Dextrose-Lösung, die zu einer verminderten Lyse des Blutes geführt hat, verdient gemacht. 1943 wurde einheitlich in Großbritannien die von Loutit und Mollison durch Studien bestätigte saure Citrat-Dextrose-Lösung eingeführt, die die Lagerungsmöglichkeiten deutlich verbesserte [25, 57]. Durch die Zugabe von Adenin (=ACD-Lösung) durch Gabrio, Nakao et al. wurde die Haltbarkeit von Blutkonserven noch weiter verlängert, so dass EK unter 4°C-Bedingungen mittlerweile je nach Stabilisatorlösung bis zu 49 Tagen gelagert werden können [27, 41]. Das Problem der Erhaltung der Funktionsfähigkeit des Blutes für einen bestimmten Zeitraum wurde also im Wesentlichen gelöst. Im nächsten Schritt richtete sich seit ca. 1960 das Augenmerk auf die Qualität der gelagerten Blutkonserven, z.B. die Problematik der Sauerstofffreisetzung aus Hämoglobin bei vermindertem 2,3-DPG-Gehalt im Blutpräparat [40, 41].

Bis heute sind viele Aspekte der Lagerung von Blutpräparaten untersucht worden, und es lässt sich zusammenfassend feststellen, dass Lagerung Qualitätseinbußen der EK zur Folge

hat, die als Lagerungsschaden bezeichnet werden [5]. Besondere Relevanz erhalten die Konsequenzen des Lagerungsschadens vor folgendem statistischen Hintergrund: eine niederländische Fünf-Jahres-Studie der Amsterdamer Universitätsklinik zeigte an ca. 74.000 transfundierten EK, dass die durchschnittliche Lagerdauer dieser EK $19,4 \pm 7$ Tage beträgt und 37% aller transfundierten EK älter als drei Wochen sind [47].

Beispielsweise kann man beobachten, dass kürzer als zwei Wochen gelagerte RBC *in vivo* zum größten Teil überleben, während länger gelagerte RBC in den ersten 24h nach Transfusion verstärkt abgebaut werden [41]. Desweiteren sind die negativen Einflüsse der Lagerdauer auf Metabolismus, Biochemie und Morphologie von RBC und somit auf die Hämorrhheologie im oberen Kapitel beschrieben worden. Chen et al. zeigten z.B. mittels Atomkraftmikroskopie die relevanten Veränderungen der RBC-Membran nach Lagerung der unpräparierten RBC an der Luft [12]. Auch auf die zum Großteil noch unerforschte Rolle der RBC im Immunsystem ist an dieser Stelle hinzuweisen. Es ist zu vermuten, dass die Lagerdauer der EK nach Retransfusion auch auf immunologische Parameter Einfluss nehmen kann [3].

Viele Veränderungen sind *in vivo* innerhalb von 48-72 Stunden reversibel [42, 64, 66]. Dennoch konnte beispielsweise von Valeri und Hirsch im Jahr 1969 nachgewiesen werden, dass sich der Kaliumgehalt 15-16 Tage in ACD-Lösung gelagerter RBC erst innerhalb von 6 Tagen normalisiert [41]. Es wird vermutet, dass der Lagerungsschaden besonders auf den Gesundheitszustand schwerkranker Herzpatienten oder Intensivpatienten Einfluss nimmt [42, 57, 66]. Von Purdy et al. konnte sogar eine höhere Mortalitätsrate nach Transfusion von 17-25 Tage altem Blut nachgewiesen werden, die mit der Lagerdauer der EK assoziiert sein kann [45]. Von Marik et al. wurden Mikrozirkulationsstörungen mit ischämischen Reaktionen nach der Gabe von EK, die älter als 15 Tage waren, aufgezeigt [39]. Tsai et al. konnten *in vivo* belegen, dass bei septischen Ratten die Transfusion von 28 Tage alten RBC zu mikrovaskulärer Minderperfusion und daraus resultierender ungenügender Sauerstoffversorgung führte [65]. Daher wird für den Bereich der Intensivmedizin bereits empfohlen, 7-10 Tage alte EK zu verwenden, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten [42, 66].

1.5. Fragestellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit widmet sich dem Thema des Lagerungsschadens der EK unter dem Aspekt der Interaktion der RBC mit APC des peripheren Blutes und mit Endothelzellen in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer der EK und nähert sich der Problematik mit Hilfe zweier Fragen:

1. Lässt sich anhand von *in vitro*-Systemen ein Einfluss der Erythrozytenlagerung auf Interaktionen hämotherapeutisch angewandter RBC-Präparationen mit antigenpräsentierenden Zellen und mit Endothelzellen nachweisen?
2. Ist ein Einfluss der Erythrozytenlagerung auf Interaktionen hämotherapeutisch angewandter RBC-Präparationen mit antigenpräsentierenden Zellen und mit Endothelzellen von funktioneller Relevanz?

Um die Frage des Einflusses der EK-Lagerung auf RBC-APC-Interaktionen und RBC-EC-Interaktionen unter *in vitro*-Bedingungen zu untersuchen, die *in vivo*-Bedingungen möglichst nahe kommen, wurde die biomolekulare Interaktionsanalyse mittels der IAsys®-Technologie als *in vitro*-Untersuchungssystem für diese Fragestellung etabliert, validiert und angewandt.

Zur Untersuchung der funktionellen Relevanz der EK-Lagerung auf RBC-APC-Interaktionen und RBC-EC-Interaktionen wurde die Genomexpressionsanalyse mittels der Array-Technologie eingesetzt.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Materialien

- DetachKit, Promocell, Heidelberg, Deutschland - Zusammensetzung:
 - HEPES/BSS
 - Trypsin
 - TNS
- Easy SepTM magnetic nanoparticles, StemCell Technologies Inc., Vancouver, Kanada
Zusammensetzung:
 - Magnetische Dextran-Eisen-Partikel
 - Aqua bidestillata
- Easy SepTM positive selection cocktail, StemCell Technologies Inc., Vancouver, Kanada – Zusammensetzung:
 - Monoklonale IgG1-Antikörper der Maus bilden bispezifische, tetramere Antikörper-Komplexe (TACs), die gegen CD25+ und Dextran gerichtet sind
 - Antikörper gegen humane Fc-Rezeptoren
 - PBS
- FCS, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- Ficoll-Hypaque, Biochrom, Berlin, Deutschland
 - Dichte 1,077 g/ml
- MACS-Puffer, Milteny Biotec, Köln, Deutschland – Zusammensetzung:
 - EDTA 2 mM
 - FCS 0,5%ig
 - PBS pH 7,4
- PBS, Sigma-Aldrich, München, Deutschland – Zusammensetzung:
 - NaCl 8 g/l
 - Na₂HPO₄ 1,15 g/l
 - KCl 0,2 g/l
 - KH₂PO₄ 0,2 g/l

- Rosette SepTM antibody cocktail, StemCell Technologies Inc., Vancouver, Kanada
Zusammensetzung:
 - Monoklonale IgG1-Antikörper der Maus gegen: CD8, CD16, CD19, CD36, CD56 und Glycophorin A an RBC
- RPMI 1640, Gibco/Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland – Zusammensetzung:
 - D-Glucose 4,5 g/l
 - HEPES puffer 2,383 g/l
 - Natriumbicarbonat 1,5 g/l
 - Natriumpyruvat 0,1100 g/l
 - L-glutamin
 - Indikator: Phenolrot
- SAG-Mannitol, Universitätsklinikum Münster, Deutschland – Zusammensetzung:
 - Glucose-Monohydrat 9 g/l
 - Adenin 170 g/l
 - Mannitol 52,5 g/l
 - Natriumchlorid 87,7 g/l
 - Aqua ad injectabilia 1 l
- StemSepTM antibody cocktail, StemCell Technologies Inc., Vancouver, Kanada
Zusammensetzung:
 - Monoklonale IgG1-Antikörper der Maus gegen: CD3, CD14, CD16, CD19, CD34, CD56, CD66b, Dextran und Glycophorin A an RBCs bilden bispezifische, tetramere Antikörper-Komplexe
 - PBS
- StemSepTM magnetic colloid, StemCell Technologies Inc., Vancouver, Kanada
Zusammensetzung:
 - Magnetische Dextran-Eisen-Partikel
 - USP-Kochsalzlösung (pH 7,0-7,5)

- Endothelial Cell Growth Medium, Promocell, Heidelberg, Deutschland

Zusammensetzung für HAoEC und HSaVEC:

- ECGS/H 0,4%
- FCS 2%
- Epidermal Growth Factor 0,1 ng/ml
- Hydrokortison 1 µg/ml
- Basic Fibroblast Factor 1 µg/ml
- Amphotericin B 50 µg/ml
- Gentamycin 50 µg/ml

- Endothelial Cell Growth Medium, Promocell, Heidelberg, Deutschland

Zusammensetzung für HDMEC:

- ECGS/H 0,4%
- FCS 5%
- Epidermal Growth Factor 10 ng/ml
- Hydrokortison 1 µg/ml
- Basic Fibroblast Factor -
- Amphotericin B 50 µg/ml
- Gentamycin 50 µg/ml

2.2. Herkunft und Eigenschaften der verwendeten Blutpräparate

Die verwendeten Blutpräparate wurden von gesunden Blutspendern zur Verfügung gestellt. Im Institut für Transfusionsmedizin der Universitätskliniken Münster wurde die Spende routinemäßig verarbeitet. Dabei wurden die Richtlinien der Bundesärztekammer zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion sowie die institutsinternen Richtlinien (Standardarbeitsanleitung des Institutes für Transfusionsmedizin und Transplantationsimmunologie der WWU Münster) eingehalten. Es wurden ausschließlich Präparate der Blutgruppe 0 Rh(D)positiv verwendet. Die Spenden wurden in Form von Vollblut, d.h. als Blutprobe oder komplette Spende, als leukozytendepletiertes EK, Frischplasma oder Buffy coat in den

Untersuchungen eingesetzt. Die eingesetzten Blutpräparationen wurden nach folgenden Verfahren hergestellt:

Zur Gewinnung der Frischplasmen, der EK und der Buffy coats verwendete man ein geschlossenes Beutelsystem (Leukotrap, Firma Pall, Dreieich, Deutschland), in dem ca. 450 ml des Spenderblutes gesammelt wurden.

- Vollblut:
 - Zentrifugation mit 3200 U/min für 20 min bei 22°C, Bremse 2,
 - Einzelne Blutproben kleineren Volumens (10 ml pro Abnahme) wurden durch sterile Venenpunktion gewonnen,
 - Das Vollblut wurde durch EDTA antikoaguliert,
- EK:
 - Erythrozyten flossen mittels Schwerkraft in einen Transferbeutel,
 - Resuspension der Erythrozyten in der Additivlösung SAG-Mannitol,
 - Vor weiterer Verwendung der EK (z.B. für Messungen am IAsys®, s.u.) wurde die Konzentration der Suspension mit physiologischer Kochsalzlösung auf 4×10^9 Zellen/ml eingestellt.
- Plasma: Abpressen und Abschweißen des Plasma in einen Leerbeutel.
- Buffy coat:
 - Ca. 120 ml Buffy coat verbleiben im Ausgangsbeutel,
 - Um reine Lymphozyten-Suspensionen zu erhalten, wurden die Buffy coats weiter verarbeitet (s.u.).

2.3. Herkunft und Isolierung der untersuchten Zielzellen (regulatorische T-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten, Endothelzellen)

2.3.1. Lymphozytenisolierung aus Buffy coats

Die Isolierung der Lymphozyten aus einem Buffy coat wurde unter Verwendung einer Ficoll-Hypaque-Lösung nach dem folgenden Protokoll durchgeführt. Das Prinzip der Ficoll-Trennung erfolgt nach der Dichtegradientenzentrifugation:

- Falls noch kein Buffy coat vorliegt, müssen Plasma und Erythrozyten aus dem Vollblut durch Zentrifugieren (3.000 U/min, 15 min, 20°C, Bremse 0) herausgetrennt werden, so dass die Lymphozyten als Schicht sichtbar werden und mit einer Pipette abgenommen werden können.
- Die Zellsuspension wird mit RPMI in neuen Tubes auf das Ausgangsvolumen gebracht und auf Tubes verteilt, die bereits mit Ficoll-Lösung versehen sind. Das Verhältnis Zellsuspension zu Ficoll-Lösung soll 1:1 betragen.
- Die Ficoll-Trennung erfolgt in der Zentrifuge für 30 min bei 20°C, 2.400 U/min und Bremse 0.
- Anschließend folgt die quantitative Entnahme der Lymphozytenschicht und die nochmalige Zentrifugation für 15 min bei 20°C, 2400 U/min und Bremse 2.
- Der Überstand wird verworfen, und die PBL werden zweifach in RPMI gewaschen (1.600 U/min, 7 min, 20°C, Bremse 9).
- Die Lymphozytensuspension wird resuspendiert und auf die gewünschte Konzentration mit RPMI oder RPMI FCS 5% in Abhängigkeit von der Fragestellung eingestellt.

2.3.2. Regulatorische T-Zellen

Mit dem folgenden Protokoll wurden aus 200 ml Vollblut CD4⁺CD25⁺-regulatorische T-Zellen gewonnen:

- 10x20 ml Vollblut wurden mit jeweils 1 ml Rosette SepTM antibody cocktail versetzt, gut gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Nach der anschließenden Ficoll-Separation (20 ml Ficoll-Lösung auf 20 ml Vollblut, 30 min bei 20°C und 2.400 U/min ohne Bremse zentrifugiert) wurden die CD4⁺-

T-Zellen abgenommen und in einem von StemCell empfohlenen Medium (PBS mit 2% FCS und 1 mM EDTA, ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) zweifach gewaschen.

- Nach dem Waschen wurden die Zellen im selben Medium aufgenommen und auf 1×10^8 Zellen/ml eingestellt.
- Die Zellsuspension wurde in FACS-Tubes aufgeteilt, man fügte 100 μl Easy SepTM positive selection cocktail pro ml Suspension hinzu, mischte und inkubierte die Lösung 15 min bei Raumtemperatur.
- Es folgten die Zugabe von 50 μl Easy SepTM magnetischen Nanopartikeln pro ml Zellsuspension, ein erneutes Mischen und die Inkubation für 10 min bei Raumtemperatur.
- Das Volumen der Lösung wurde mit dem o.g. Medium auf 2,5 ml aufgefüllt und das Tube wurde für 5 min im Magneten inkubiert.
- Als nächstes stellte man die Einheit Tube-Magnet in einer gleichmäßigen Bewegung auf den Kopf, verwarf den Überstand und füllte, vorsichtig mischend, nach 2-3 min das Tube mit dem o.g. Medium wieder auf 2,5 ml auf. Der Vorgang wurde noch zweimal wiederholt.
- Schließlich wurden die isolierten $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ -T-Zellen in RPMI, welches 5% FCS (RPMI-FCS 5%ig) enthielt, mit einer Konzentration von 3×10^6 /ml aufgenommen.

2.3.3. Dendritische Zellen

Zur Gewinnung von dendritischen Zellen wurden zunächst Lymphozyten aus einem Buffy coat isoliert (Protokoll s.o.).

- Die Lymphozyten wurden auf 1×10^8 /ml im von StemCell empfohlenen Medium (PBS mit 2% FCS und 1 mM EDTA, ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) eingestellt, mit dem StemSepTM antibody cocktail versehen (100 μl /ml Zellen) und bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert.
- Anschließend fügte man 1,5 ml StemSepTM magnetic colloid pro 2 ml Zellsuspension hinzu und inkubierte dieses 12 min bei Raumtemperatur.
- Um die Zellen aus der Suspension zu isolieren, verwendete man MACS-Säulen (Milteny Biotec, Köln, Deutschland), wobei man pro Säule 1 ml der Lösung in ein

Tube drückte. Im Anschluss wurden die Säulen dreimal mit jeweils 1ml des empfohlenen Mediums gespült.

- Daraufhin überführte man die dendritischen Zellen mit 1 ml RPMI-FCS 5%ig pro Säule in ein FACS-Röhrchen und stellte sie auf die gewünschte Konzentration ein.
- Die isolierte Zellzahl aus einem Buffy coat aus 500 ml Vollblut lag bei $2,16 \times 10^7$ /ml.

2.3.4. Monozyten

Die Extraktion von Monozyten erfolgte über die Isolierung von Lymphozyten aus Vollblut oder Buffy coats (Protokoll s.o.). Es wurde nach dem folgenden Protokoll vorgegangen:

- 8Well-Platten wurden mit 2 ml/Well RPMI-FCS 5%ig beschickt und für 1 h bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert. Im Anschluss wurde die Flüssigkeit abgegossen und die Platten wurden mit 1,5 ml/Well der zuvor isolierten PBL-Suspension befüllt. Die Zellen hatten eine Konzentration von 1×10^7 /ml RPMI-FCS 5%ig. Es erfolgte die Inkubation für 1 h bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt.
- Nach 1 h waren die Monozyten am Boden der 8Well-Platten adhärent, so dass man den flüssigen Überstand (=ohne Monozyten) abnehmen konnte. Um die Monozyten von der Platte zu lösen, befüllte man die Wells erneut mit 2 ml/Well frischen RPMI-FCS 5%ig, stellte diese für 2 min auf einen Eisblock und bearbeitete den Boden mit einem Cell-Scraper.
- Nach dem Überführen der Zellsuspension in ein Tube wurde die Konzentration ermittelt und auf den jeweils benötigten Wert eingestellt.

2.3.5. Endothelzellen

Für die Untersuchungen wurden primäre EC aus dem venösen, arteriellen und mikrovaskulären Gefäßsystem verwendet (Firma Promocell, Heidelberg, Deutschland):

- Humane aortale Endothelzellen (HAoEC),
- Humane Endothelzellen der Vena saphena (HSaVEC),
- Humane mikrovaskuläre Endothelzellen, isoliert aus der Dermis (HDMEC).

Alle drei verwendeten Arten von Endothelzellen wurden von PromoCell mittels Immunofluoreszenz positiv auf den Von-Willebrand-Faktor getestet. Negative Ergebnisse brachten Tests auf Bakterien, Fungizide, Mykoplasmen, HIV, Hepatitis B und Hepatitis C.

- Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Endothelial Cell Growth Medium (s.o.) im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt. Alle 2 Tage wurde das Medium erneuert.
- Wenn die Zellen 70-90% des Bodens bedeckten und viele mitotische Figuren erkennbar waren, wurden Subkulturen angelegt. Dafür wurden das mitgelieferte Medium und ein DetachKit verwendet.
- Zunächst wurden die Böden von Kulturflaschen mit dem empfohlenen Kulturmedium mit 200 µl/cm² bedeckt und die Flaschen für 30 min bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert.
- In der Flasche mit dem Zell-Monolayer wurde das alte Medium durch 5 ml HepsBSS ersetzt und die Zellen wurden 30 sec mit der Lösung gespült. Danach wurde die Lösung verworfen und man fügte 100 µl Trypsin/cm² hinzu. Sofort im Anschluss beobachtete man die Zellen unter einem Mikroskop.
- Wenn sich alle Zellen vom Boden gelöst hatten, aber noch vor Ablauf von 7 min, addierte man 100 µl TNS/cm² hinzu und überführte die Zellsuspension in ein Tube, welches mit 500 U/min für 4 min bei 20°C und Bremse 9 zentrifugiert wurde.
- Man entfernte den Überschuss und resuspendierte die Zellen in 1,5 ml des empfohlenen Kulturmediums, füllte das Tube auf 2 ml auf und bestimmte die Zellkonzentration.
- Schließlich teilte man die Suspension auf die vorbereiteten Flaschen auf und lagerte sie im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt. Auch hier wurde das Medium alle 48h gewechselt.

2.4. IAsys®-Technologie

2.4.1. Funktionsweise des IAsys®-Gerätes

Die biomolekulare Interaktionsanalyse ermöglicht es, markierungsfrei und zeitaufgelöst die Bindung von Biomolekülen zu messen. Einer der beiden Interaktionspartner (hier dendritische Zellen, regulatorische T-Zellen, Monozyten und Endothelzellen) wird auf der Sensoroberfläche (Coupling Layer) einer Küvette immobilisiert (s.u.) und kann nach einem bestimmten Schema repetitierend (s.u.) mit dem zweiten Interaktionspartner (Sample Well, hier RBC) in Kontakt gebracht werden. Die Bindungsreaktion kann zeitsynchron auf einem Bildschirm verfolgt werden.

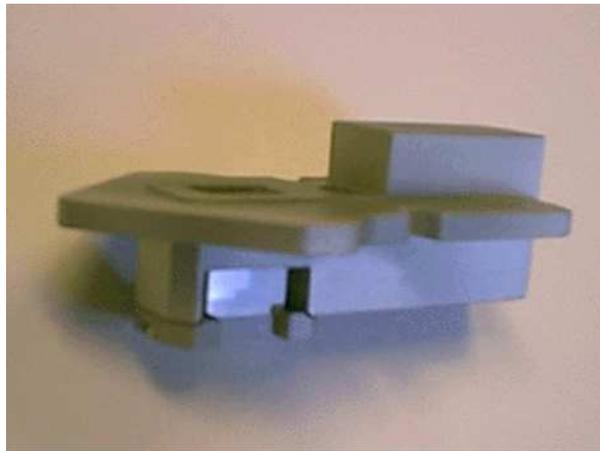


Abbildung 2: IAsys®-Küvette

(aus dem Schulungsmaterial der Firma IAsys®, Cambridge, England)

Die IAsys®-Technologie nutzt das optische Detektionsprinzip eines Prismenkopplers (Resonant Mirror) und misst dabei die Änderungen der Kopplungsbedingungen eines isolierten Schichtwellenleiters. Auf einer Seite wird Laserlicht in den Prismenblock geleitet. Das Licht durchdringt den Resonant Mirror (welcher sich aus einem High und einem Low index resonant layer zusammensetzt) und wird an der Sensoroberfläche im Sinne einer Totalreflexion gebrochen, da es von einem dichteren in ein dünneres Medium eintritt. Dabei entstehen evaneszierende Wellen, anhand derer das Gerät den Brechungsindex in einer dünnen Flüssigkeitsschicht messen kann. Die Interaktion zwischen dem Liganden und dem Analyten verändert den Brechungsindex proportional zu der an der Sensoroberfläche angehefteten Masse, also in Abhängigkeit von der Bindungsintensität der Probe an die Liganden. Auf der anderen

Seite durchdringt das reflektierte, gebrochene Licht erneut den Resonanzspiegel und tritt aus dem Prismenblock wieder aus. Dort wird es in ein elektronisches Signal umgewandelt, vom Detektor aufgenommen und dem Benutzer unmittelbar als konkrete Zahl mit der Einheit arc sec präsentiert.

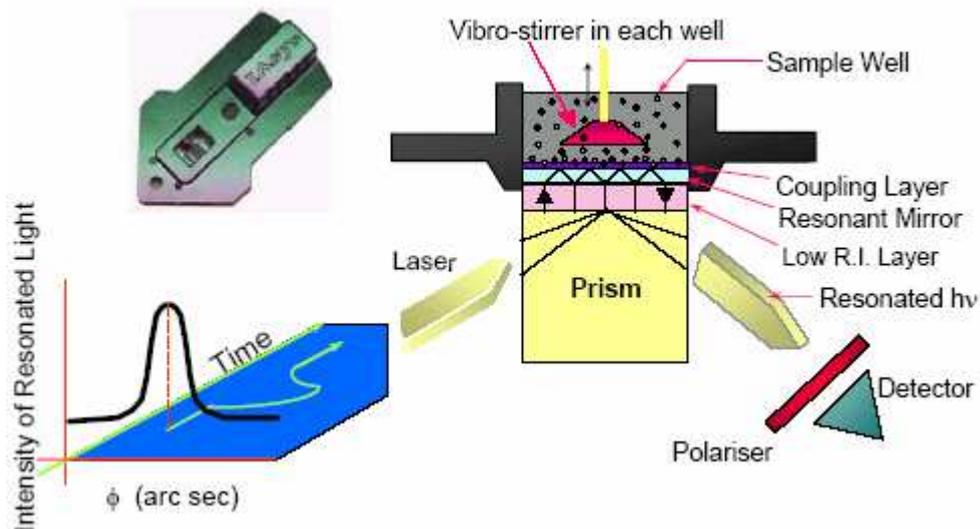


Abbildung 3: IAsys®-Funktionsmechanismus

(aus dem Schulungsmaterial der Firma IAsys®, Cambridge, England)

2.4.2. Immobilisierung der Liganden

Es wurden Küvetten mit planaren Aminosilan- und Carboxylatoberflächen verwendet, da man an ihnen anhand kovalenter Bindungen ganze Zellen anhaften kann. Jede der im Folgenden durchgeführten Aktionen ist sofort als Veränderung des Graphen am Computer zu erkennen.

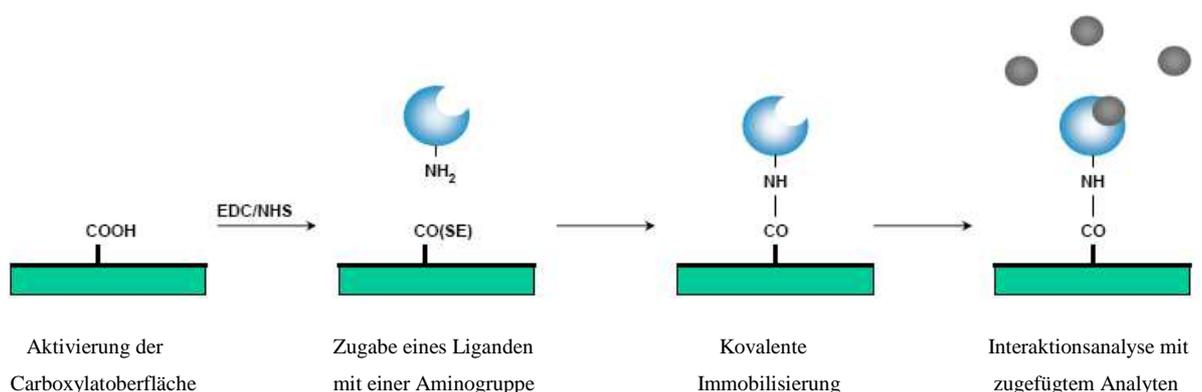
Dendritische Zellen (DC), Regulatorische T-Zellen (Treg) und Monozyten wurden alle nach dem gleichen Muster an Aminosilan-Küvetten immobilisiert:

- Dafür wurde jeweils eine neue Küvette in das IAsys®-Gerät eingelegt, die Temperatur auf 20°C und der Stirrer (Mischgerät, welches für eine gleichmäßige Verteilung der Substanzen sorgt) auf 75% seiner Kapazität eingestellt.
- Zunächst beschickte man die Küvette mit 3x200µl PBS („3x“ bedeutet: 200 µl auftragen, absaugen, wieder 200 µl auftragen, absaugen und ein letztes mal 200 µl auftragen und belassen), um eine konstante Ausgangssituation zu schaffen, die sogenannte Baseline.

- Nach gelungener Äquilibration ersetzte man das PBS durch 3x200 μl BS³ und ließ es 11 min lang mit der Küvettenoberfläche reagieren.
- Anschließend wurden wieder 3x 200 μl PBS aufgetragen und nach Ablauf von 6 min durch frische 3x200 μl PBS erneuert, die man für 2 min beließ.
- Sodann entfernte man das PBS und brachte 250 μl Zellsuspension auf, mit den Zellen, die man zu immobilisieren wünschte. Die Konzentrationen waren folgende:
 - Treg $3 \times 10^6/\text{ml}$ Kulturmedium
 - DC $2,16 \times 10^7/\text{ml}$ Kulturmedium
 - Monozyten $1 \times 10^8/\text{ml}$ Kulturmedium
- Nach 20 min tauschte man die Suspension gegen 3x200 μl PBS (3 min) aus und anschließend das PBS gegen 3x 200 μl BSA (für 15 min).
- Die letzten beiden Vorgänge waren das Entfernen der BSA-Lösung mit Hilfe von PBS/T 3x200 μl (Wirkzeit 5 min) und das Erstellen einer neuen Baseline mit 3x200 μl PBS.

Den Immobilisierungserfolg konnte man aus der Differenz zwischen den Werten der letzten und der ersten Baseline errechnen:

- Treg 542,35 arc sec
- DC 438,84 arc sec
- Monozyten 1.056,64 arc sec



Legende:



Abbildung 4: Immobilisierungsmechanismus am Beispiel einer Carboxyloberfläche

(aus dem Schulungsmaterial der Firma IAsys®, Cambridge, England)

Die Immobilisierung der HAoEC, HSaVEC und der HDMEC erfolgte an Carboxylatküvetten:

- Die Ausgangstemperatur betrug 20°C und der Stirrer war auf 75% eingestellt mit Ausnahme der HSaVEC, hier war die Einstellung auf 100% erhöht worden.
- Wie auch bei den Aminosilanküvetten hat man zuerst eine stabile Baseline mit 3x200 µl PBS herbeigeführt und im Anschluss die Küvetten mit 200 µl EDC-NHS-Lösung innerhalb von 7 min aktiviert.
- Als nächstes ersetzte man das EDC-NHS durch 3x200 µl PBS für 3 min und im Folgenden durch 120 µl Acetat (pH 4,5), welches man auf der Küvette beließ und durch 200 µl der Zellsuspension ergänzte. Die Konzentrationen waren folgende:
 - HAoEC 2,5x10⁵/ml Kulturmedium
 - HSaVEC 5x10⁵/ml Kulturmedium
 - HDMEC 4,3x10⁵/ml Kulturmedium
- Nach 10-12 min Reaktionszeit wurde die Zellsuspension entfernt und die Kavität mit 3x200 µl PBS für 3 min gefüllt.
- Um die Zellen auf der Küvettenoberfläche zu blockieren, verwendete man 3x200 µl BSA (2 mg/ml, pH 7,4), das man für 2min beließ und schließlich durch 3x200 µl PBS austauschte.
- Der Immobilisierungserfolg betrug:
 - HAoEC 877 arc sec
 - HSaVEC 1004 arc sec
 - HDMEC 1047 arc sec

2.4.3. Messvorgang

Die Messungen am IAsys® erfolgten immer nach dem gleichen Schema. Das Gerät war auf 20°C und 75% Stirrer-Kapazität eingestellt.

- Zunächst wurde eine konstante Baseline mittels 3x120 µl HBS eingestellt.
- Daraufhin wurde der Analyt (immer 120 µl RBC 4x10⁹/ml Kochsalzlösung + 120 µl HBS, Plasma oder Vollblut) hinzugefügt und die 5-minütige Phase der Assoziation (=Binding) durchgeführt, in der der Analyt mit dem Liganden eine Bindung einging.

- Im Anschluss ersetzte man den Analyten durch 3x120 µl HBS, welches in der Phase der Dissoziation (Dauer: 10 min) alle nicht gebundenen Teilchen entfernte.
- Als nächstes folgte die Regeneration der Küvettenoberfläche mittels 3x120 µl HCl 10 mM und 3x120 µl HCl 1 mM, das für 2 min in der Kavität verblieb und die eingegangenen Bindungen wieder löste.
- Schließlich wurde die Küvette mit 3x120 µl HBS neutralisiert und die Baseline erneut eingestellt, so dass nach 2 min wieder ein Analyt aufgetragen werden konnte.

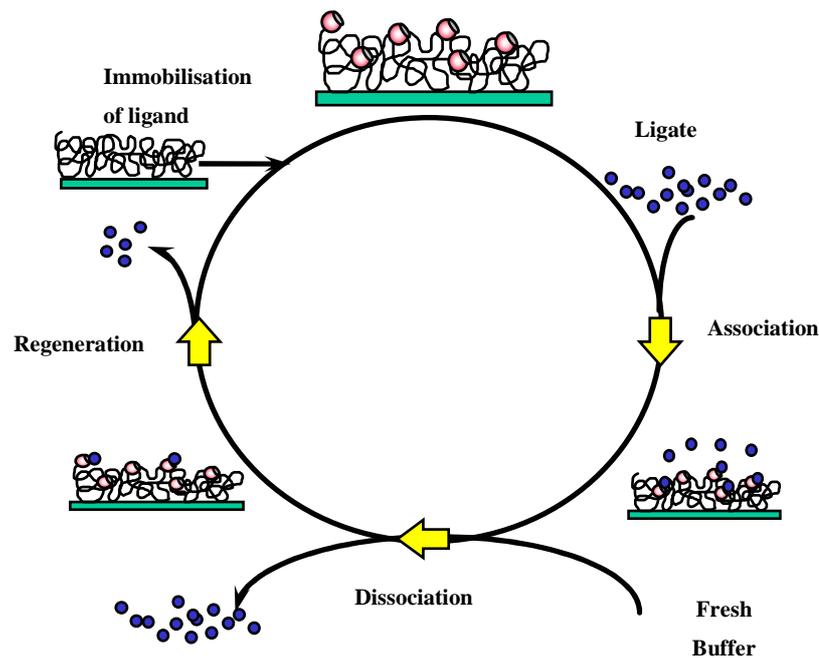


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Messzyklus

(i.A.a. Schulungsmaterial der Firma IAsys®, Cambridge, England)

Die Bindung wurde auch hier als Differenz berechnet. Man subtrahierte den Wert der Baseline, den man kurz vor dem Auftragen des Analyten ablesen konnte, vom Wert der Dissoziation (kurz vor der Regenerationsphase).

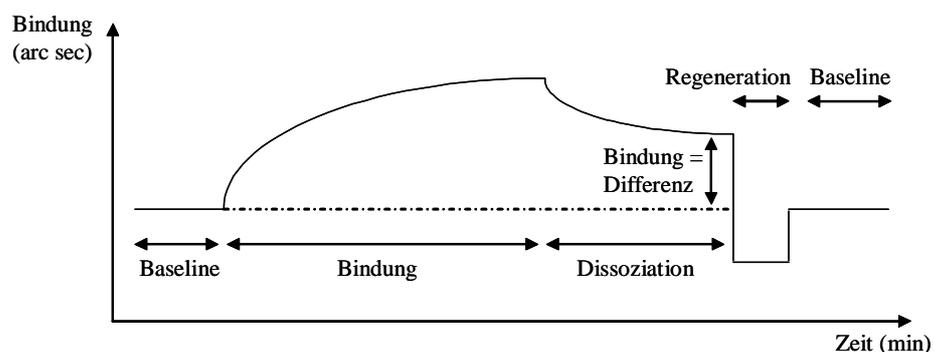


Abbildung 6: Beispiel eines Graphen über den Zeitraum eines Messzyklus

2.5. Microarrays

2.5.1. Technologie

Die Anwendung der Piquor™ Microarrays Technologie soll der Fragestellung nachgehen, wie sich das Expressionsprofil von antigenpräsentierenden Zellen, wie den HDMEC und Monozyten, in Anwesenheit von RBC mit unterschiedlicher Lagerdauer verändert. Das Prinzip besteht darin, den Unterschied zwischen zwei Zellen anhand der Anzahl aktivierter oder deaktivierter Gene zu bestimmen.

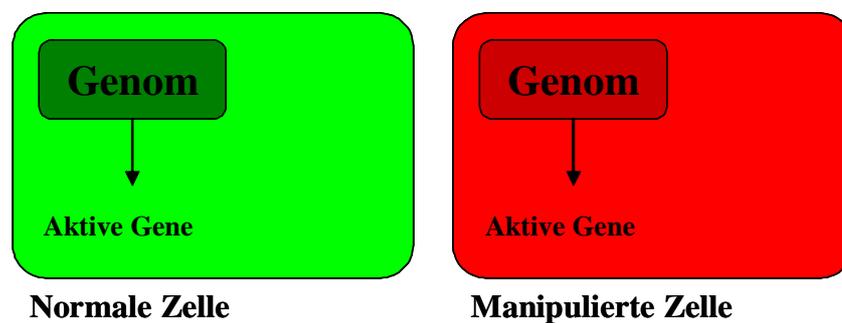


Abbildung 7: Unterschiedliches Expressionsprofil zweier Zellen

(i.A.a. Produktinformation von Piquor™ Microarrays)

Die Piquor™ Microarrays Technologie verwendet dafür kleinste gläserne Probenträger (Arrays), auf denen nach bestimmten Belegungsprotokollen bereits bekannte cDNA-Fragmente der Spezies Mensch, Maus oder Ratte als „Spots“ aufgetragen sind. Dabei kann ein Array mit Tausenden von Genspots bedruckt werden, die wieder aus mehreren Hundert Nukleotiden bestehen.

Für Messungen genügen Probengrößen von 0,5-2 µg reiner mRNA die aus 50-100 µg RNA oder 5×10^6 Zellen oder 50mg Gewebe gewonnen werden können, bzw. 0,01 µg mRNA vor Amplifizierung, das entspricht 1 µg RNA oder $0,1 \times 10^6$ Zellen oder 1 mg Gewebe.

Anschließend wird die zu untersuchende cDNA mit Fluoreszenz-markierten Nukleotiden, die je nach Fragestellung rot oder grün erscheinen können, gelabeled und auf die Arrays hybridisiert. Danach werden die hybridisierten Arrays mit einem Laser gescannt und die Reaktionsintensitäten nach Qualität und Intensität der Fluoreszenz bestimmt. Dadurch können große Teile des Genoms in einem Experiment identifiziert und quantifiziert werden.

Arrays können also die Frage beantworten, welche Gene, zu welchem Zeitpunkt und unter welchen Umständen exprimiert oder in der Expression geschwächt werden.

2.5.2. Versuchsaufbau und Durchführung der Piquor™ Microarrays

Die Durchführung der Genexpressionsanalyse erfolgte in Arbeitsteilung zwischen dem Institut für Transfusionsmedizin in Münster und der Firma Memorec (Köln, Deutschland). Versuchsdesign und -aufbau lagen in der Verantwortung des Institutes und wurden, soweit es die Fragestellung der vorliegenden Doktorarbeit betraf, im Rahmen der Dissertation geleistet. Die Zell/Zell-Interaktionen und die Isolierung der Zielzellen nach der Interaktion erfolgten im Institut. Die Zellen wurden im kryokoservierten Zustand der Firma Memorec übergeben. Memorec führte die m-RNA-Isolierung, die Hybridisierung der Chips und die Datenerfassung durch. Die Auswertung der Daten erfolgte wieder im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit im Institut.

Der Versuchsaufbau stellte sich wie folgt dar:

- 8-Well-Nunc-Platten wurden entweder mit 5×10^5 Endothelzellen oder 5×10^6 Monozyten gecoatet.
- Für die Experimente wurden EC nach der zweiten Passage verwendet.
- Die Monozyten wurden mittels Magnetseparation isoliert:
 - Lymphozyten-Isolierung aus Buffy coats (Protokoll s.o.)
 - Aufnehmen von 4×10^8 Lymphozyten in 3,2 ml kaltem MACS-Puffer
 - Zugabe von 800 μ l CD14 Microbeads
 - Inkubation für 15 min im Kühlschrank
 - Zellen mit 10-20°C kaltem MACS-Puffer waschen, Überstand abnehmen und 4×10^8 Lymphozyten in 2 ml kaltem MACS-Puffer aufnehmen
 - Magnetseparation mit vier MACS-Säulen (Milteny Biotec, Köln, Deutschland), mehrfaches Waschen und Poolen der Monozyten
 - Aufnahme in RPMI-FCS 5%ig bei einer Konzentration von ca. 5×10^6 Zellen/ml
- RBC aus leukozytendepletierten EK in Additivlösung wurden an unterschiedlichen Tagen der Lagerdauer entnommen und mit Frischplasma auf eine Konzentration von 4×10^9 /ml eingestellt.

- Die RBC-Plasma-Suspension wurde auf die Zielzellen gegeben und bei 37°C für 2h unter rotierender Agitation inkubiert. Anschließend wurde die RBC-Plasma-Suspension aus dem Ansatz abgenommen.
- Die Zielzellen wurden mit RPMI gewaschen, von der Oberflächen der Nunc-Platten abgenommen und unmittelbar im flüssigen Stickstoff kryokonserviert.

Die Firma Memorec ging wie folgt mit den kryokonservierten Proben vor:

- Die gefrorenen Zellpellets wurden von Memorec mit je 3,5 ml Lösung aus dem Blood RNA Tube (PAXgene Blood RNA Kit Handbook, PreAnalytiX /QIAGEN, Hilden, Deutschland) resuspendiert und 2 Stunden lang bei Raumtemperatur lysiert.
- Zur RNA-Extraktion wurde das PAXgene Blood RNA Kit (PAXgene Blood RNA Kit Handbook, PreAnalytiX /QIAGEN, Hilden, Deutschland) verwendet.
- Anschließende Spektrophotometrie-Messungen untersuchten die RNA-Proben auf ihre Konzentration, Reinheit und Ausbeute.

Die mRNA der zu untersuchenden EC und Monozyten wurde vor der Hybridisierung amplifiziert und die erhaltene aRNA für die Hybridisierung der in Tabelle 2 gezeigten Arrays genutzt. Zur Hybridisierung wurden die Immunology-Microarrays der Firma Memorec eingesetzt. Die Microarrays umfassen jeweils 4x1.076 cDNAs: 1.064 Gene, die immunologisch relevante Strukturen kodieren, sowie zehn cDNA-Positivkontrollen (sechs sogenannte „house-keeping“ Gene und vier DNA-Fragmente aus E.coli) und zwei Negativkontrollen (Heringssperma-DNA und Puffer). Da jede cDNA vierfach aufgetragen wurde, bestand jedes Array aus 4.304 Spots. Die 1.064 Gene lassen sich in 12 Funktionsgruppen unterteilen:

- Cytokine und ihre Rezeptoren
- Apoptose und Entzündung
- Zellzyklus
- DNA-Reparatur und DNA-Metabolismus
- Extrazelluläre Matrix
- Zellulärer Stress
- Akut-Phase Reaktanden

- Komplement-System
- Zelluläre Signaltransduktion
- Zelloberflächenmarker
- Proteindegradierung
- Transkriptionsfaktoren

Die Markierung der RNA wurde durchgeführt mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden (Cy3-dCTP = grün und Cy5-dCTP = rot), wobei die Kontrollproben mit Cy3 markiert wurden. Da von der Probe EC mit RBC (1 Tag Lagerdauer) und Normalplasma nicht genügend Material für alle Kontrollen zur Verfügung stand, wurde aus einem zeitgleich laufenden Versuch des Institutes für Transfusionsmedizin mit EC ein Pool gebildet, der als Kontrolle für alle EC-beladenen Microarrays diente, so dass nach folgender Formel die Genregulationen miteinander verglichen werden konnten:

$$\frac{\left. \begin{array}{l} \text{EC_1_}(\text{Cy5 SI_Gen } x) \\ \text{Pool_}(\text{Cy3 SI_Gen } x) \end{array} \right\} \text{R1}}{\text{-----}} = \frac{\left. \begin{array}{l} \text{EC_1_}(\text{Cy5 SI_Gen } x) \\ \text{EC_2_}(\text{Cy5 SI_Gen } x) \end{array} \right\} \text{R3}}{\text{-----}}$$

$$\frac{\left. \begin{array}{l} \text{EC_2_}(\text{Cy5 SI_Gen } x) \\ \text{Pool_}(\text{Cy3 SI_Gen } x) \end{array} \right\} \text{R2}}{\text{-----}}$$

Tabelle 2: Übersicht über die Hybridisierung der 4 Arrays

Array-Nummer	Cy5-Markierung	Cy3-Markierung
1.Array	Monozyten RBC, Lagerdauer Tag 21 Normalplasma	Monozyten RBC, Lagerdauer Tag 1 Normalplasma
2.Array	Monozyten RBC, Lagerdauer Tag 42 Normalplasma	Monozyten RBC, Lagerdauer Tag 1 Normalplasma
3.Array	Endothelzellen RBC, Lagerdauer Tag 21 Normalplasma	Endothelzellen-Pool RBC Lagerdauer Tag 1 Normalplasma
4.Array	Endothelzellen RBC, Lagerdauer Tag 42 Normalplasma	Endothelzellen-Pool RBC Lagerdauer Tag 1 Normalplasma

Nach Hybridisierung der Arrays wurden diese getrennt nach Cy3- und Cy5-Markierung mit einem Laser-Scanning-Gerät (ScanArray Lite, Packard Bioscience, Dreieich, Deutschland) eingelesen und anschließend übereinander gelegt. Die Cy3- und Cy5-Markierungen erschienen nun grün und rot. Wenn die Farbe rot erschien, wurden die untersuchten Gene der Cy5-markierten Monozyten bzw. EC stärker exprimiert als die der Cy3-markierten Kontrollgruppe. Bei grünen Spots wurden wiederum die Gene des Kontrollansatzes stärker exprimiert und bei gelben Signalen waren beide Expressionen gleich stark.

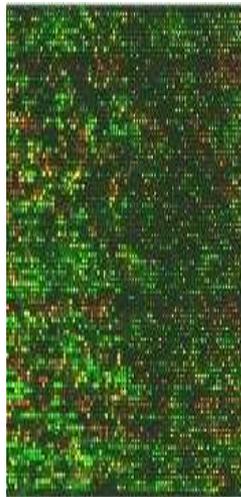


Abbildung 8: Beispiel für einen hybridisierten, fluoreszenzmarkierten Microarray

2.6. Statistische Auswertung

Statistische Analysen der IAsys®-Ergebnisse wurden mit dem Statistikprogramm SPSS 12.0.1 (SPSS, München, Deutschland) durchgeführt. Ermittelt wurden Mittelwerte und Standardabweichungen der verschiedenen Messreihen. Die statistische Signifikanz unterschiedlicher Ergebnisse dieser Messreihen wurde unter Zuhilfenahme des Wilcoxon-Tests bewertet. In Einzelfällen wurde in Abhängigkeit vom Versuchsdesign der Two-Sample t-Test (verbundene Stichproben) angewandt. Wenn statistische Ergebnisse mit Hilfe des Two-Sample t-Test gewonnen wurden, ist dies im Ergebnisteil besonders vermerkt. Dabei galten alle p-Werte $<0,05$ als statistisch signifikant. Alle Ergebnisse stellen Mittelwerte und Standardabweichungen dar.

Relevant für die Expressionswerte der Microarrays waren die Signal- und Hintergrundintensitäten von Cy3 und Cy5, die mit Hilfe der ImaGeneTM Software 5.1 (BioDiscovery, El Segundo, USA) ermittelt wurden. Dabei wurden die Hintergrund- von den Signalintensitäten subtrahiert und der Quotient aus Cy5/Cy3 errechnet. Im Anschluss wurden die Werte über den Median aller Signalquotienten normiert und der Mittelwert aller vier identischen Versuchsreihen eines Arrays errechnet. Eine zusätzliche visuelle Kontrolle schloss Artefakte aus. Der Ausschluss aller Genspots, deren Intensität nicht mindestens dem doppelten des Mittelwerts der Hintergrundintensitäten entsprach, vermied die Auswertung falsch positiver Werte. Alle relevanten Genspots wurden in Punktediagrammen zusammengefasst.

Die von der Firma Memorec gelieferten Daten wurden eigenständig im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit in Kooperation mit Frau Dr. Osada, wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Medizinische Informatik und Biomathematik der WWU Münster, analysiert. Wichtiges Hilfsmittel bei der Aufarbeitung der Rohdaten war die SAM-Analyse (Significance Analysis of Microarrays). Unter Verwendung der open source und open development Software „siggenes“ (Version 1.8.0) von Bioconductor, welche für die Analyse und zum Verständnis von genomischen Daten entwickelt wurde, konnten signifikant unterschiedlich exprimierte Gene bestimmt und die FDR (false discovery rate) geschätzt werden [56]. Mittels „siggenes“ wurden die 20 Gene identifiziert, die trotz der Bedingungen die FDR unter 12% und die Anzahl der falsch positiven Gene unter 3 zu halten, den signifikantesten Unterschied in ihrer Genexpression aufwiesen. Diese Gene wurden den 12 oben genannten Funktionsgruppen zugeordnet.

3. Ergebnisse

3.1. Biomolekulare Interaktionsanalysen

3.1.1. Validierung und Qualitätskontrolle der Methodik

Standardabweichung des Testsystems

Um eine hohe Aussagekraft der Ergebnisse zu erreichen, wurden Erythrozytenkonzentrate von drei unterschiedlichen Spendern der Blutgruppe 0 Rh(D)positiv verwendet. Jeder Messvorgang wurde dreimal durchgeführt, so dass stets eine nur geringfügige Standardabweichung erreicht werden konnte. Nachfolgend sind in Tabelle 3 Messergebnisse der mit Plasma durchgeführten Kontrollversuche gezeigt. In diesem Beispiel wurde Plasma zusammen mit RBC einer bestimmten Lagerdauer als Ligand auf die Oberfläche einer Carboxylat-Küvette aufgebracht, auf der zuvor HSaVEC immobilisiert wurden. Die relative Standardabweichung betrug in der Regel weniger als 20% vom Mittelwert der Bindungsintensitäten. Die durchschnittliche Standardabweichung betrug 13,28%.

Tabelle 3: Beispiel für Standardabweichungen anhand von Messungen mit Plasma als Analyt an HSaVEC, immobilisiert auf einer Carboxylat-Küvette

Lagerdauer	EK	1. Messvorgang			2. Messvorgang			3. Messvorgang			Mittelwert der Differenzen	Standardabweichung (in %)
		Baseline	Dissoziationsmaximum	Differenz	Baseline	Dissoziationsmaximum	Differenz	Baseline	Dissoziationsmaximum	Differenz		
Tag 1	EK 1	127,15	304,35	177,2	225,27	356,08	130,81	267,32	428,25	160,93	156,31	15,03
	EK 2	56,05	127,76	71,71	62,18	134,71	72,53	67,75	147,17	79,42	74,55	5,67
	EK 3	46,86	114,77	67,91	76,64	131,05	54,41	108,91	153,77	44,86	55,73	20,77
Tag 7	EK 1	18,41	91,83	73,42	1,8	77,47	75,67	24,48	89,25	64,77	71,29	8,07
	EK 2	37,08	95,76	58,68	37,88	85,3	47,42	63,17	93,4	30,23	45,44	31,53
	EK 3	81,93	127,82	45,89	74,07	137,69	63,62	109,13	152,62	43,49	51,00	21,98
Tag 14	EK 1	-24,47	64,07	88,54	4,15	88,78	84,63	28,72	99,98	71,26	81,48	11,12
	EK 2	52,66	58,48	5,82	1,83	-4,35	-6,18	39,55	29,32	-10,23	-3,53	-
	EK 3	37,46	111,64	74,18	34,65	115,8	81,15	44,84	125,34	80,5	78,61	4,89
Tag 21	EK 1	49,52	137,06	87,54	57,13	144,22	87,09	74,06	156,08	82,02	85,55	3,6
	EK 2	42,42	95,16	52,74	40,05	107,63	67,58	38,03	108,59	70,56	63,63	15,01
	EK 3	63,07	129	65,93	73,65	138,8	65,15	68,26	143,59	75,33	68,80	8,2
Tag 28	EK 1	100,09	139,12	39,03	70,15	114,97	44,82	-1,34	54,18	55,52	46,46	18,01
	EK 2	104,05	151,35	47,3	109,65	168,33	58,68	113,91	170,36	56,45	54,14	11,13
	EK 3	38,71	113,38	74,67	28,79	120,54	91,75	30,65	122,63	91,98	86,13	11,52

Mitführen einer internen Qualitätskontrolle über den gesamten Untersuchungszeitraum

Zur internen Qualitätskontrolle und zur Beurteilung der Tagesschwankungen der Assays wurde ein Plasmapool bestehend aus Plasmen von 10 Spendern der Blutgruppe 0 Rh(D)positiv eingesetzt. Dieser Pool wurde zu Beginn der Versuchsreihen in einer ausreichend großen Menge hergestellt und in Aliquots kryokonserviert. Dieser Plasmapool garantierte Reproduzierbarkeit während des gesamten Untersuchungszeitraumes.

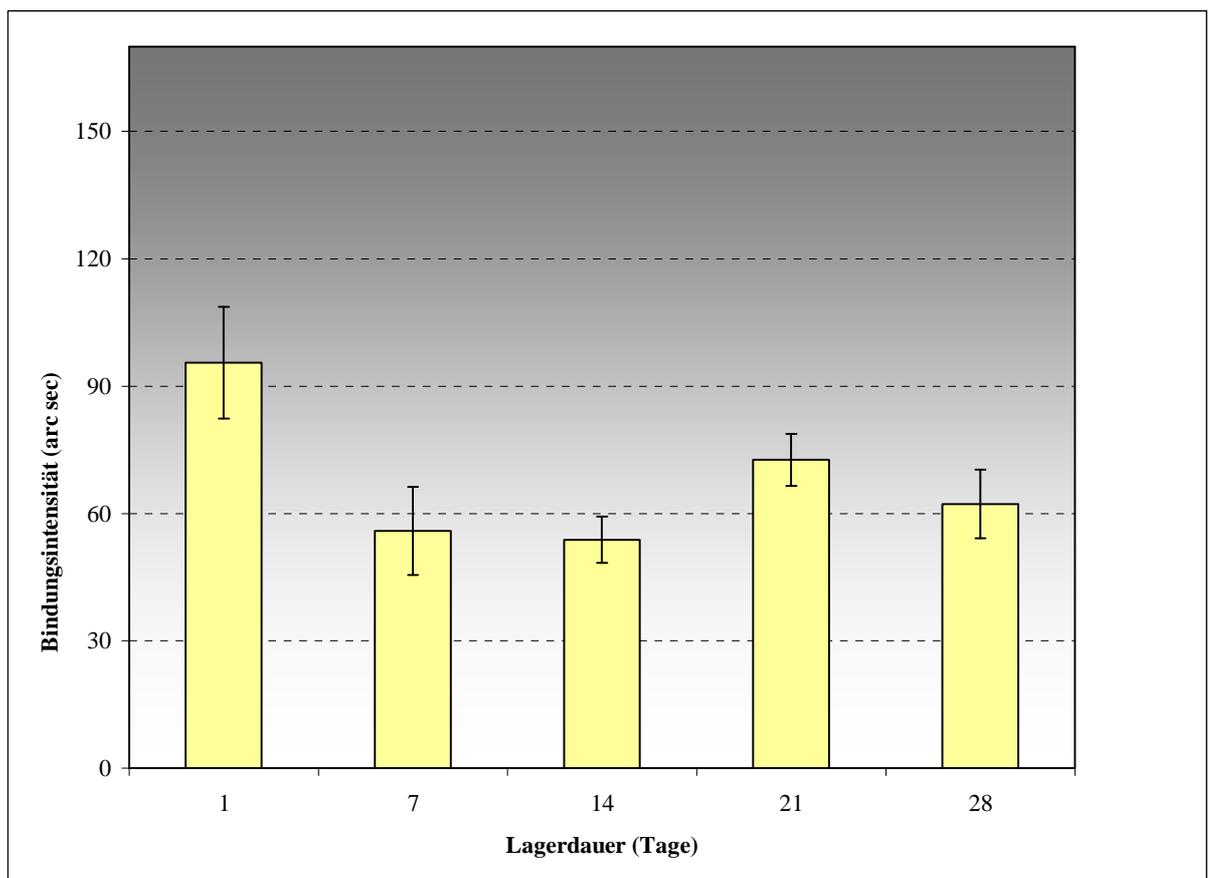


Abbildung 9: Ergebnisse der Kontrollmessungen mit Plasma zu verschiedenen Zeitpunkten der Lagerdauer an einer mit HSaVEC beschichteten Küvette

Abbildung 9 zeigt exemplarisch an der HSaVEC-Küvette die Ergebnisse der Kontrollmessungen mit dem Plasmapool als Analyt, anhand derer eine suffiziente Bindung der RBC an eine intakte Küvettenbeschichtung und Vergleichbarkeit der Messungen bis zum Abschluss der Messreihen nachgewiesen werden konnte. Eine geringe Schwankung der Bindung über die Zeit, wie sie in Abbildung 9 dargestellt ist, war bei dem geplanten Untersuchungsdesign

nicht vermeidbar, ließ sich aber durch die Verwendung des Plasmapools bei der Darstellung der Ergebnisse eliminieren, indem die Bindung der RBC in Gegenwart des Standardplasmapools an die Küvettenbeschichtung zu jedem Zeitpunkt mit gemessen und auf 100% gesetzt wurde.

Wahl des Untersuchungsmediums: HBS, Plasma, Vollblut

Klassische Protokolle der Adhäsionsmessung gelagerter RBC an EC untersuchen die Adhäsionsfähigkeit in Gegenwart von HBS [59]. HBS ist ein artifizielles Medium, das die *in vivo* Bedingungen nicht ausreichend reflektiert. In der Phase der Validierung der hier beschriebenen Messungen der Adhäsion mittels IAsys®-Technologie wurden neben HBS als Medium auch Plasma und frisch entnommenes Vollblut der Blutgruppe 0 Rh(D)positiv eingesetzt. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Adhäsionsfähigkeit in HBS über den Lagerungszeitraum anders verhält als die Adhäsionsfähigkeit in einem physiologischen Medium. Die in der Validierung gezeigten Messungen (siehe Abbildung 10) zeigten insgesamt keinen signifikanten Unterschied der Lagerfähigkeit in Plasma oder Vollblut.

Da die klassische Transfusionssituation die ist, dass gelagerte Erythrozyten in das Medium Vollblut hinein appliziert werden, wurde im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit entschieden, als Untersuchungsmedium HBS und Vollblut zu wählen. Das bedeutet, dass im Fall von HBS ein definiertes Volumen (120 µl) gelagerter RBC, eingestellt auf eine Konzentration von 4×10^9 /ml (in 120 µl HBS gelöst) und im Fall von Vollblut ein definiertes Volumen (120 µl) gelagerter RBC, eingestellt auf eine Konzentration von 4×10^9 /ml (in 120 µl Vollblut gelöst) auf die Küvettenbeschichtung gegeben wurden.

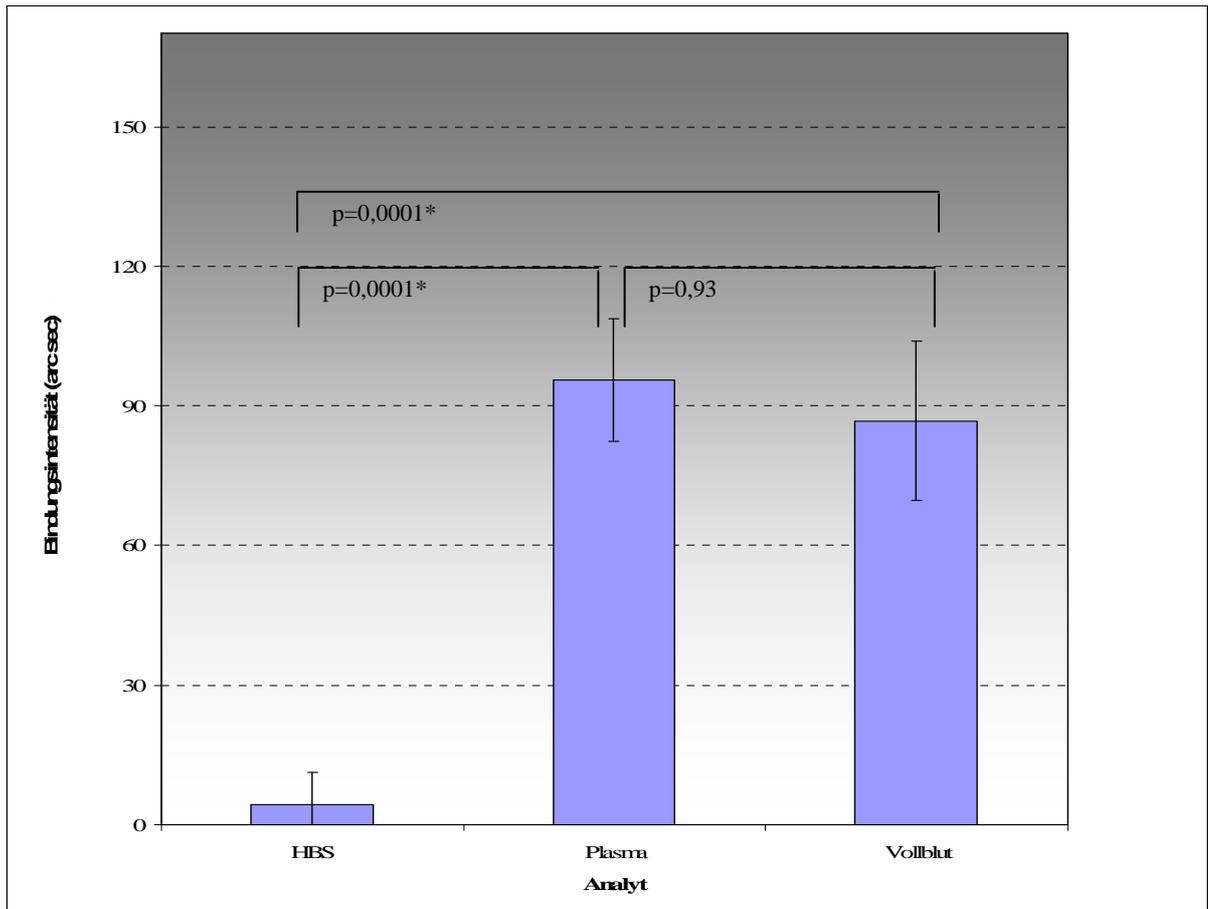


Abbildung 10: Ergebnisse der Messungen mit unterschiedlichen Analyten an einer mit HSaVEC beschichteten Küvette

(mit * gekennzeichnete p-values sind statistisch signifikant, $p < 0,05$).

3.1.2. Ergebnisse der IAsys®-Messungen

Die Tabellen 4-13 fassen die Messergebnisse der biomolekularen Interaktionsanalysen zusammen und stellen die Bindungsunterschiede anhand ihrer statistischen Signifikanz dar.

Tabelle 4: Bindungsintensitäten und Standardabweichungen unterschiedlicher APC und EC mit 1 Tag und 7 Tage alten RBC in HBS und Vollblut

Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Bindungsintensität sind gelb unterlegt. Angaben sind Mittelwerte in arc sec.

Ligand	Analyt	Mittelwert (MW) EK 1-3 Lagerdauer Tag 1	Standardabweichung	Mittelwert (MW) EK 1-3 Lagerdauer Tag 7	Standardabweichung	MW Tag 1 vs. MW Tag 7 p-value
Treg	HBS	12,41	4,28	1,5	2,59	0,144
	Vollblut	17,07	10,09	13,41	12,61	0,208
DC	HBS	32,91	8,11	7,85	2,65	0,075
	Vollblut	76,89	16,63	22,2	7,14	0,008
Monozyten	HBS	10,28	0,81	0,68	1,18	0,109
	Vollblut	95,22	13,02	26,74	7,04	0,859
HAoEC	HBS	6,87	4,77	1,74	5	0,138
	Vollblut	81,08	10,48	100,73	10,66	0,021
HSa-VEC	HBS	4,31	6,86	1,52	2,64	0,317
	Vollblut	86,79	17,06	97,34	13,11	0,314
HDMEC	HBS	0,83	1,34	2,96	2,08	0,593
	Vollblut	145,06	9,05	97,33	12,51	0,086

Tabelle 5: Bindungsintensitäten und Standardabweichungen unterschiedlicher APC und EC mit 1 und 14 Tage alten RBC in HBS und Vollblut

Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Bindungsintensität sind gelb unterlegt. Angaben sind Mittelwerte in arc sec.

Ligand	Analyt	Mittelwert (MW) EK 1-3 Lagerdauer Tag 1	Standardabweichung	Mittelwert (MW) EK 1-3 Lagerdauer Tag 14	Standardabweichung	MW Tag 1 vs. MW Tag 14 p-value
Treg	HBS	12,41	4,28	0,93	1,61	0,144
	Vollblut	17,07	10,09	26,86	0,43	0,066
DC	HBS	32,91	8,11	1,8	1,89	0,176
	Vollblut	76,89	16,63	46,3	8,94	0,086
Monozyten	HBS	10,28	0,81	0,07	0,11	0,109
	Vollblut	95,22	13,02	36,61	7,4	0,26
HAoEC	HBS	6,87	4,77	4,93	8,55	0,225
	Vollblut	81,08	10,48	92,05	20,03	0,953
HSa-VEC	HBS	4,31	6,86	0,06	0,11	1
	Vollblut	86,79	17,06	85,28	13,22	0,515
HDMEC	HBS	0,83	1,34	0,92	1,59	0,316
	Vollblut	145,06	9,05	119,26	18,17	0,139

Tabelle 6: Bindungsintensitäten und Standardabweichungen unterschiedlicher APC und EC mit 1 und 21 Tage alten RBC in HBS und Vollblut

Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Bindungsintensität sind gelb unterlegt. Angaben sind Mittelwerte in arc sec.

Ligand	Analyt	Mittelwert (MW) EK 1-3 Lagerdauer Tag 1	Standardabweichung	Mittelwert (MW) EK 1-3 Lagerdauer Tag 21	Standardabweichung	MW Tag 1 vs. MW Tag 21 p-value
Treg	HBS	12,41	4,28	4,25	7,37	0,225
	Vollblut	17,07	10,09	42,17	8,37	0,066
DC	HBS	32,91	8,11	5,39	9,33	0,116
	Vollblut	76,89	16,63	32,32	13,77	0,008
Monozyten	HBS	10,28	0,81	2,67	4,63	0,144
	Vollblut	95,22	13,02	45,29	18,29	0,31
HAoEC	HBS	6,87	4,77	3,27	5,66	0,08
	Vollblut	81,08	10,48	124,24	15,3	0,015
HSa-VEC	HBS	4,31	6,86	3,22	5,57	0,18
	Vollblut	86,79	17,06	53,4	7,32	0,008
HDMEC	HBS	0,83	1,34	3,75	6,51	0,285
	Vollblut	145,06	9,05	44,74	7,11	0,008

Tabelle 7: Bindungsintensitäten und Standardabweichungen unterschiedlicher APC und EC mit 1 und 28 Tage alten RBC in HBS und Vollblut

Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Bindungsintensität sind gelb unterlegt. Angaben sind Mittelwerte in arc sec.

Ligand	Analyt	Mittelwert (MW) EK 1-3 Lagerdauer Tag 1	Standardabweichung	Mittelwert (MW) EK 1-3 Lagerdauer Tag 28	Standardabweichung	MW Tag 1 vs. MW Tag 28 p-value
Treg	HBS	12,41	4,28	9,31	11,02	0,499
	Vollblut	17,07	10,09	13,88	7,89	0,078
DC	HBS	32,91	8,11	6,24	3,08	0,214
	Vollblut	76,89	16,63	5,65	3,35	0,008
Mono-Zyten	HBS	10,28	0,81	3,15	4,06	0,345
	Vollblut	95,22	13,02	0,1	0	0,028
HAoEC	HBS	6,87	4,77	3,62	6,26	0,08
	Vollblut	81,08	10,48	89,91	5,91	0,953
HSaVEC	HBS	4,31	6,86	3,56	2,56	0,068
	Vollblut	86,79	17,06	63,75	12,05	0,374
HDMEC	HBS	0,83	1,34	9,32	14,46	0,5
	Vollblut	145,06	9,05	39,58	12,19	0,008

Tabelle 8: Bindungsintensitäten und Standardabweichungen unterschiedlicher APC und EC mit 7 und 14 Tage alten RBC in HBS und Vollblut

Angaben sind Mittelwerte in arc sec.

Ligand	Analyt	Mittelwert (MW) EK 1-3 Lagerdauer Tag 7	Standardabweichung	Mittelwert (MW) EK 1-3 Lagerdauer Tag 14	Standardabweichung	MW Tag 7 vs. MW Tag 14 p-value
Treg	HBS	1,5	2,59	0,93	1,61	0,715
	Vollblut	13,41	12,61	26,86	0,43	0,484
DC	HBS	7,85	2,65	1,8	1,89	0,173
	Vollblut	22,2	7,14	46,3	8,94	0,11
Monozyten	HBS	0,68	1,18	0,07	0,11	0,317
	Vollblut	26,74	7,04	36,61	7,4	0,263
HAoEC	HBS	1,74	5	4,93	8,55	0,273
	Vollblut	100,73	10,66	92,05	20,03	0,767
HSa-VEC	HBS	1,52	2,64	0,06	0,11	0,317
	Vollblut	97,34	13,11	85,28	13,22	0,051
HDMEC	HBS	2,96	2,08	0,92	1,59	1
	Vollblut	97,33	12,51	119,26	18,17	0,173

Tabelle 9: Bindungsintensitäten und Standardabweichungen unterschiedlicher APC und EC mit 7 und 21 Tage alten RBC in HBS und Vollblut

Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Bindungsintensität sind gelb unterlegt. Angaben sind Mittelwerte in arc sec.

Ligand	Analyt	Mittelwert (MW) EK 1-3 Lagerdauer Tag 7	Standardabweichung	Mittelwert (MW) EK 1-3 Lagerdauer Tag 21	Standardabweichung	MW Tag 7 vs. MW Tag 21 p-value
Treg	HBS	1,5	2,59	4,25	7,37	0,5
	Vollblut	13,41	12,61	42,17	8,37	0,028
DC	HBS	7,85	2,65	5,39	9,33	0,6
	Vollblut	22,2	7,14	32,32	13,77	0,374
Monozyten	HBS	0,68	1,18	2,67	4,63	0,593
	Vollblut	26,74	7,04	45,29	18,29	0,139
HAoEC	HBS	1,74	5	3,27	5,66	0,715
	Vollblut	100,73	10,66	124,24	15,3	0,066
HSa-VEC	HBS	1,52	2,64	3,22	5,57	0,18
	Vollblut	97,34	13,11	53,4	7,32	0,008
HDMEC	HBS	2,96	2,08	3,75	6,51	0,593
	Vollblut	97,33	12,51	44,74	7,11	0,008

Tabelle 10: Bindungsintensitäten und Standardabweichungen unterschiedlicher APC und EC mit 7 und 28 Tage alten RBC in HBS und Vollblut

Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Bindungsintensität sind gelb unterlegt. Angaben sind Mittelwerte in arc sec.

Ligand	Analyt	Mittelwert (MW) EK 1-3 Lagerdauer Tag 7	Standardabweichung	Mittelwert (MW) EK 1-3 Lagerdauer Tag 28	Standardabweichung	MW Tag 7 vs. MW Tag 28 p-value
Treg	HBS	1,5	2,59	9,31	11,02	0,075
	Vollblut	13,41	12,61	13,88	7,89	0,441
DC	HBS	7,85	2,65	6,24	3,08	0,6
	Vollblut	22,2	7,14	5,65	3,35	0,015
Monozyten	HBS	0,68	1,18	3,15	4,06	0,593
	Vollblut	26,74	7,04	0,1	0	0,012
HAoEC	HBS	1,74	5	3,62	6,26	0,715
	Vollblut	100,73	10,66	89,91	5,91	0,374
HSa-VEC	HBS	1,52	2,64	3,56	2,56	0,715
	Vollblut	97,34	13,11	63,75	12,05	0,139
HDMEC	HBS	2,96	2,08	9,32	14,46	0,893
	Vollblut	97,33	12,51	39,58	12,19	0,008

Tabelle 11: Bindungsintensitäten und Standardabweichungen unterschiedlicher APC und EC mit 14 und 21 Tage alten RBC in HBS und Vollblut

Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Bindungsintensität sind gelb unterlegt. Angaben sind Mittelwerte in arc sec.

Ligand	Analyt	Mittelwert (MW) EK 1-3 Lagerdauer Tag 14	Standardabweichung	Mittelwert (MW) EK 1-3 Lagerdauer Tag 21	Standardabweichung	MW Tag 14 vs. MW Tag 21 p-value
Treg	HBS	0,93	1,61	4,25	7,37	0,109
	Vollblut	26,86	0,43	42,17	8,37	0,018
DC	HBS	1,8	1,89	5,39	9,33	0,686
	Vollblut	46,3	8,94	32,32	13,77	0,314
Monozyten	HBS	0,07	0,11	2,67	4,63	0,18
	Vollblut	36,61	7,4	45,29	18,29	0,139
HAoEC	HBS	4,93	8,55	3,27	5,66	0,109
	Vollblut	92,05	20,03	124,24	15,3	0,374
HSa-VEC	HBS	0,06	0,11	3,22	5,57	0,18
	Vollblut	85,28	13,22	53,4	7,32	0,515
HDMEC	HBS	0,92	1,59	3,75	6,51	0,285
	Vollblut	119,26	18,17	44,74	7,11	0,008

Tabelle 12: Bindungsintensitäten und Standardabweichungen unterschiedlicher APC und EC mit 14 und 28 Tage alten RBC in HBS und Vollblut

Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Bindungsintensität sind gelb unterlegt. Angaben sind Mittelwerte in arc sec.

Ligand	Analyt	Mittelwert (MW) EK 1-3 Lagerdauer Tag 14	Standardabweichung	Mittelwert (MW) EK 1-3 Lagerdauer Tag 28	Standardabweichung	MW Tag 14 vs. MW Tag 28 p-value
Treg	HBS	0,93	1,61	9,31	11,02	0,043
	Vollblut	26,86	0,43	13,88	7,89	0,043
DC	HBS	1,8	1,89	6,24	3,08	0,08
	Vollblut	46,3	8,94	5,65	3,35	0,028
Monozyten	HBS	0,07	0,11	3,15	4,06	0,18
	Vollblut	36,61	7,4	0,1	0	0,028
HAoEC	HBS	4,93	8,55	3,62	6,26	0,109
	Vollblut	92,05	20,03	89,91	5,91	0,086
HSa-VEC	HBS	0,06	0,11	3,56	2,56	0,068
	Vollblut	85,28	13,22	63,75	12,05	0,953
HDMEC	HBS	0,92	1,59	9,32	14,46	0,715
	Vollblut	119,26	18,17	39,58	12,19	0,008

Tabelle 13: Bindungsintensitäten und Standardabweichungen unterschiedlicher APC und EC mit 21 und 28 Tage alten RBC in HBS und Vollblut

Signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) der Bindungsintensität sind gelb unterlegt. Angaben sind Mittelwerte in arc sec.

Ligand	Analyt	Mittelwert (MW) EK 1-3 Lagerdauer Tag 21	Standardabweichung	Mittelwert (MW) EK 1-3 Lagerdauer Tag 28	Standardabweichung	MW Tag 21 vs. MW Tag 28 p-value
Treg	HBS	4,25	7,37	9,31	11,02	0,08
	Vollblut	42,17	8,37	13,88	7,89	0,05
DC	HBS	5,39	9,33	6,24	3,08	0,893
	Vollblut	32,32	13,77	5,65	3,35	0,051
Monozyten	HBS	2,67	4,63	3,15	4,06	1
	Vollblut	45,29	18,29	0,1	0	0,018
HAoEC	HBS	3,27	5,66	3,62	6,26	0,593
	Vollblut	124,24	15,3	89,91	5,91	0,139
HSa-VEC	HBS	3,22	5,57	3,56	2,56	1
	Vollblut	53,4	7,32	63,75	12,05	0,678
HDMEC	HBS	3,75	6,51	9,32	14,46	0,465
	Vollblut	44,74	7,11	39,58	12,19	0,594

Zusammenfassend lässt sich feststellen:

Die Bindungsfähigkeit der Erythrozyten an die immobilisierten Liganden ist an Tag 1 in HBS grundsätzlich niedriger als in Vollblut. Die erniedrigte Bindungsfähigkeit in HBS ist statistisch signifikant für Monozyten ($p=0,0023$), HAoEC ($p=0,0006$), HSaVEC ($p=0,0001$) und für HDMEC ($p=0,0001$). Sie ist an Tag 1 in HBS nicht statistisch signifikant im Fall der Bindung an Treg ($p=0,2247$) und an DC ($p=0,0546$). Im Vergleich zu Tag 1 stellt sich die Bindungsfähigkeit der RBC an Tag 28 in der Regel als vermindert dar, sowohl in HBS als

auch in Vollblut. Ausnahmen sind in HBS die Bindung an HDMEC und in Vollblut die Bindung an HAoEC. In diesen Fällen bleibt die Bindung unter Berücksichtigung der Methodenvariabilität stabil. Der Unterschied der Bindung zwischen HBS und Vollblut an Tag 28 ist statistisch signifikant für EC aber nicht für klassische APC. Diese statistischen Aussagen wurden unter Verwendung des Two-Sample t-Tests (verbundene Stichproben) erhoben (siehe Abbildungen 11-16).

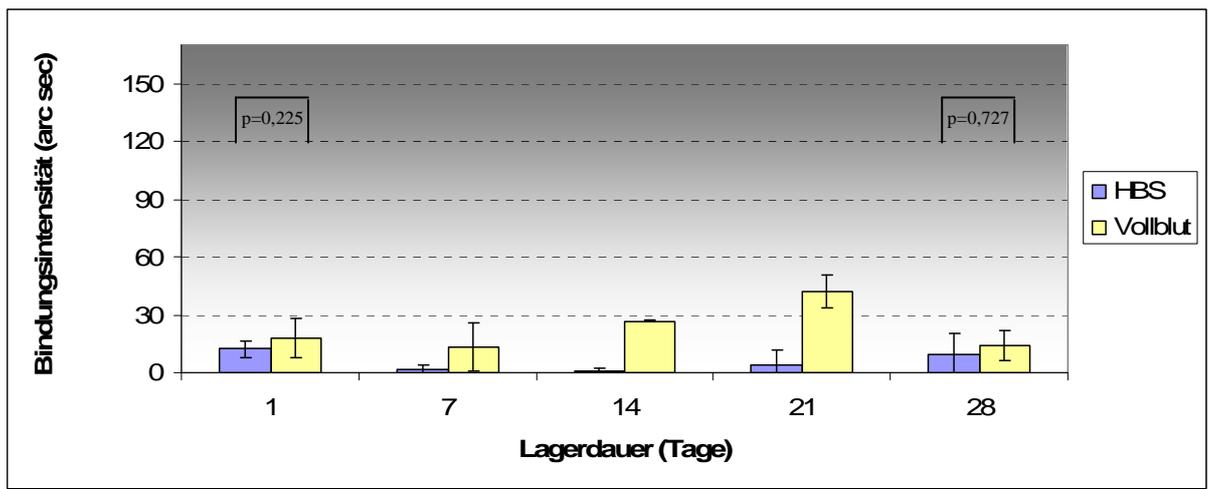


Abbildung 11: Vergleich der Bindungsintensitäten von RBC an Treg im Medium HBS und Vollblut an unterschiedlichen Tagen der Lagerdauer

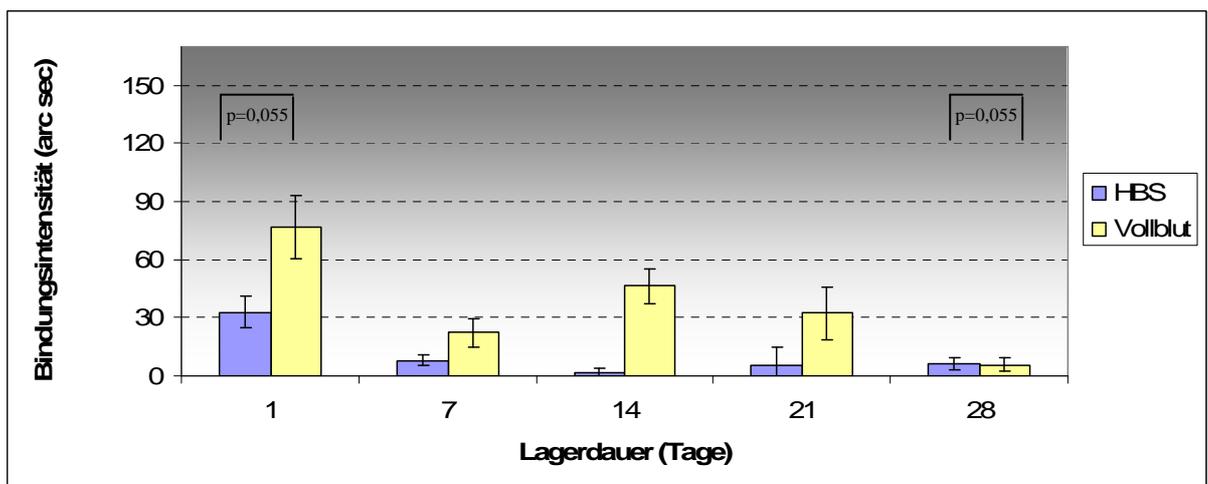


Abbildung 12: Vergleich der Bindungsintensitäten von RBC an DC im Medium HBS und Vollblut an unterschiedlichen Tagen der Lagerdauer

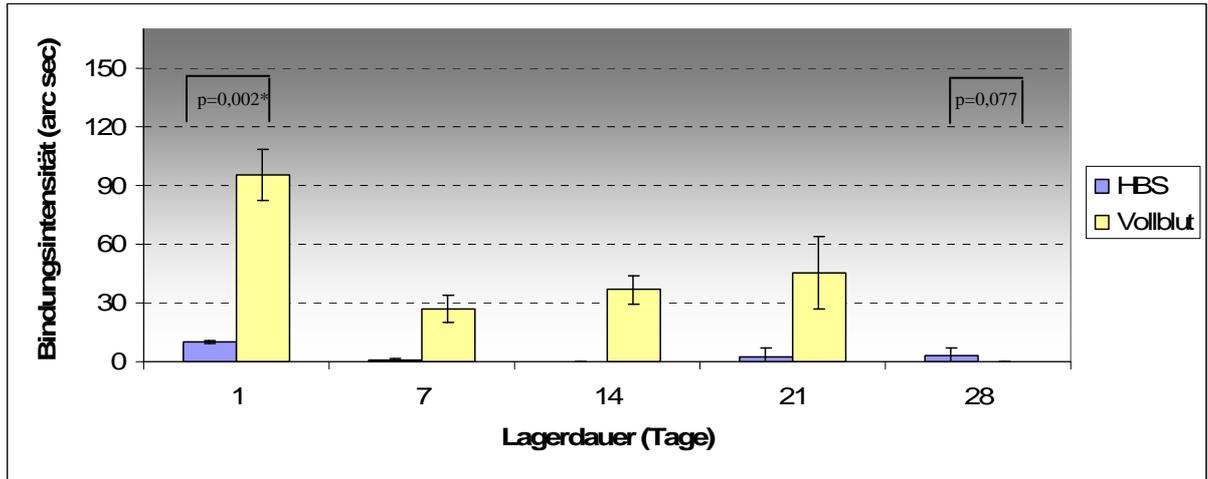


Abbildung 13: Vergleich der Bindungsintensitäten von RBC an Monozyten im Medium HBS und Vollblut an unterschiedlichen Tagen der Lagerdauer

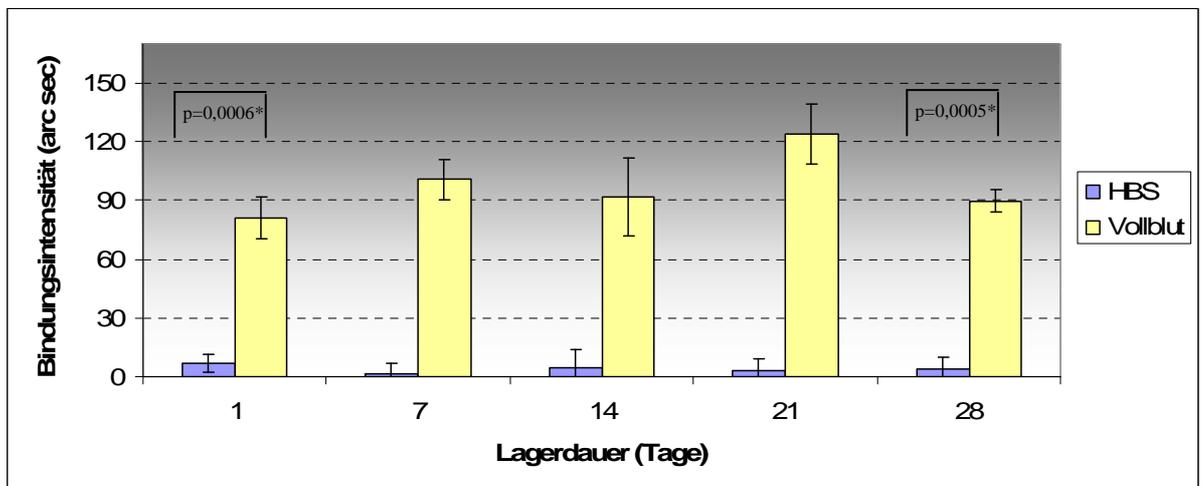


Abbildung 14: Vergleich der Bindungsintensitäten von RBC an HAoEC im Medium HBS und Vollblut an unterschiedlichen Tagen der Lagerdauer

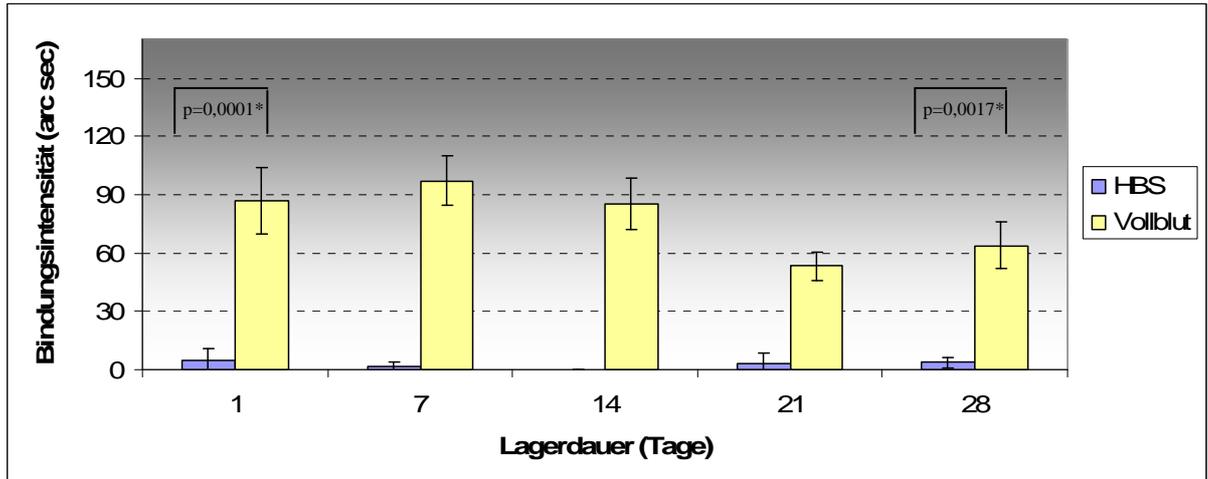


Abbildung 15: Vergleich der Bindungsintensitäten von RBC an HSAVEC im Medium HBS und Vollblut an unterschiedlichen Tagen der Lagerdauer

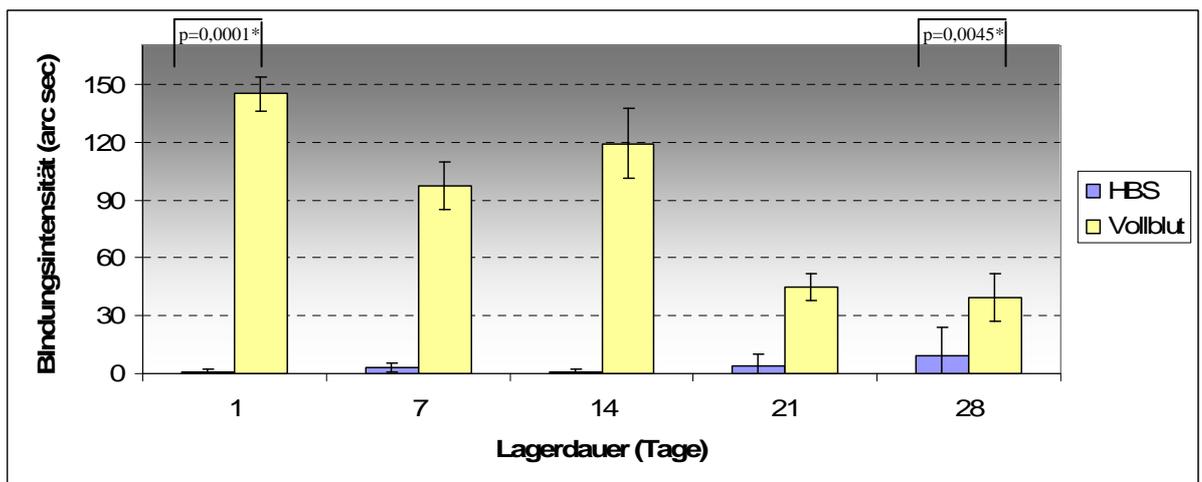


Abbildung 16: Vergleich der Bindungsintensitäten von RBC an HDMEC im Medium HBS und Vollblut an unterschiedlichen Tagen der Lagerdauer

Die Interaktion gelagerter Erythrozyten in Gegenwart von HBS im Vergleich Tag 1 und Tag 28 ist an keiner Kuvettenoberfläche signifikant verändert (siehe Abbildung 17).

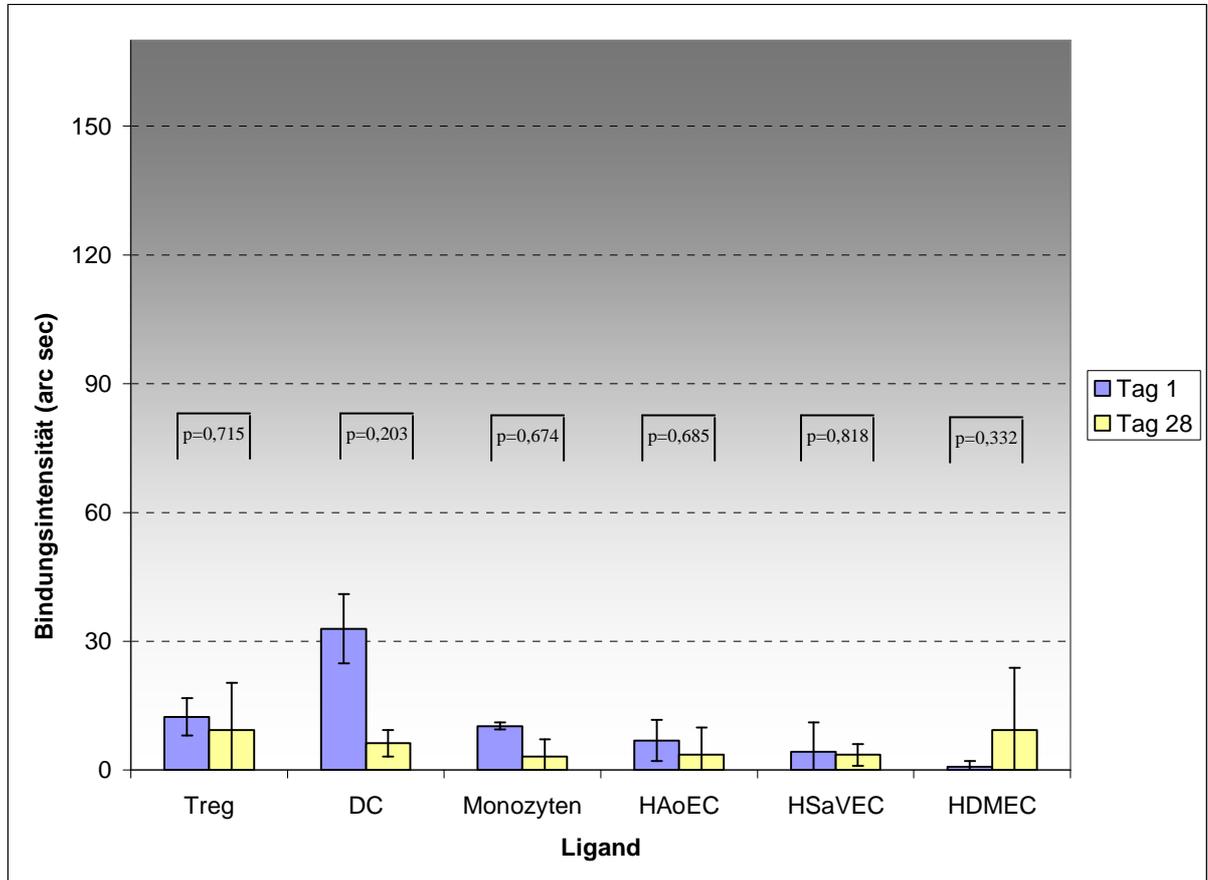


Abbildung 17: Vergleich der Bindungsintensitäten von RBC an verschiedenen Liganden im Medium HBS am Tag 1 und Tag 28 der Lagerdauer

Die Interaktion gelagerter Erythrozyten mit DC des peripheren Blutes und Monozyten sowie mit HDMEC in Gegenwart von Vollblut im Vergleich Tag 1 und Tag 28 nimmt statistisch signifikant ab (siehe Abbildung 18).

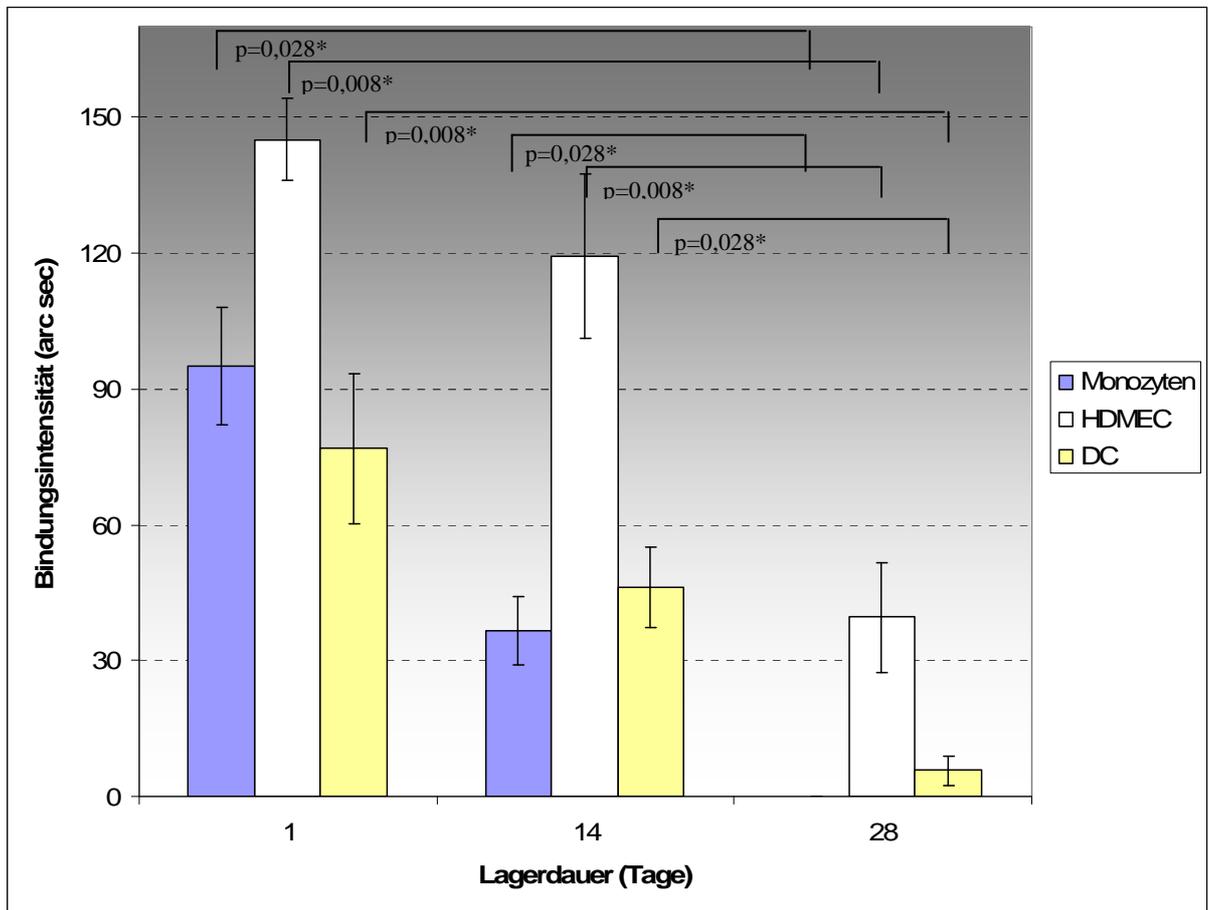


Abbildung 18: Vergleich der Bindungsintensitäten von RBC an Monozyten, HDMEC und DC im Medium Vollblut am Tag 1, 14 und 28 der Lagerdauer

(mit * gekennzeichnete p-values sind statistisch signifikant, $p < 0,05$)

Die Interaktion gelagerter Erythrozyten mit regulatorischen T-Zellen, HAoEC und HSaVEC in Gegenwart von Vollblut im Vergleich Tag 1 und Tag 28 nimmt ab, die Minderung der Interaktion erreicht unter den hier eingesetzten Untersuchungsbedingungen jedoch keine statistische Signifikanz (siehe Abbildung 19).

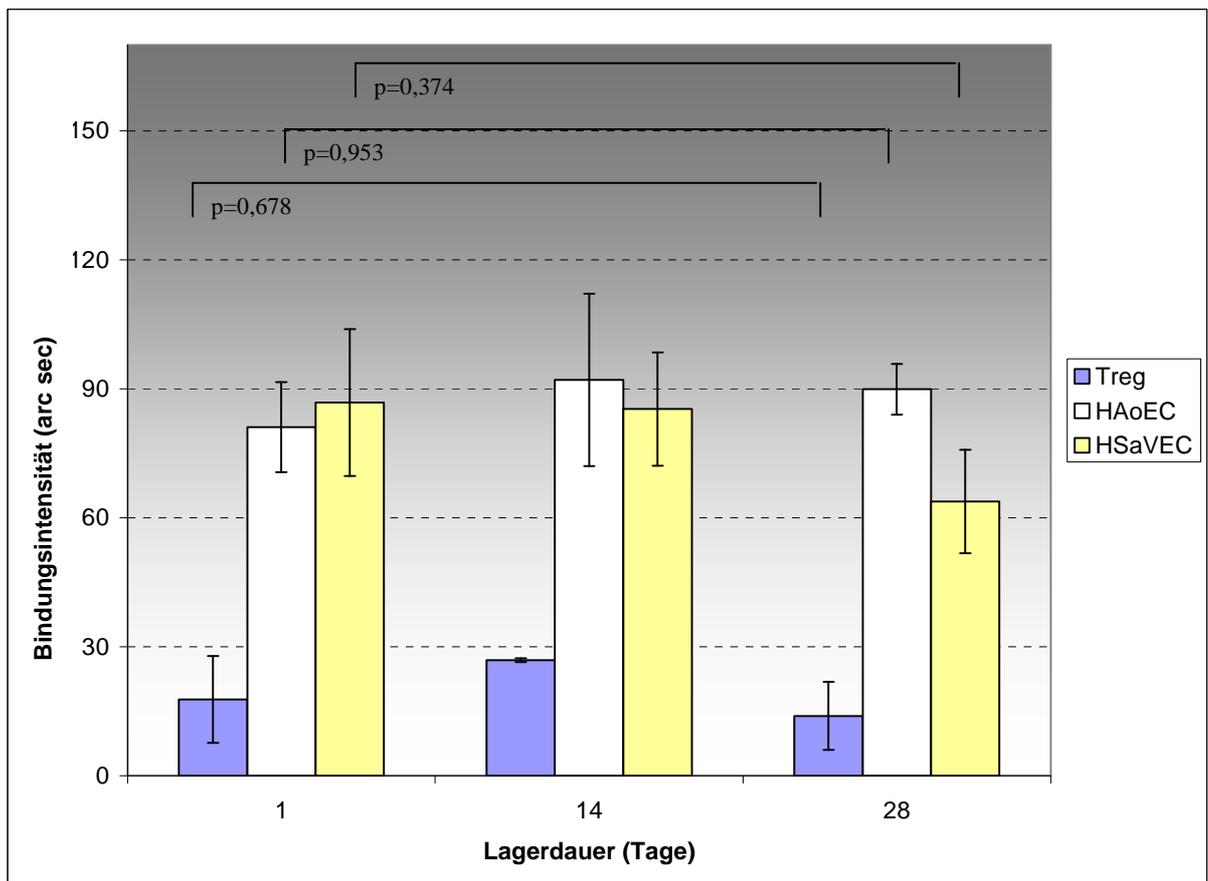


Abbildung 19: Vergleich der Bindungsintensitäten von RBC an Treg, HAoEC und HSaVEC im Medium Vollblut am Tag 1, 14 und 28 der Lagerdauer

3.2. Genexpressionsanalysen

Die Tabellen 14-17 sind eine Zusammenfassung aller im Rahmen der Dissertation erarbeiteten Daten der Genexpressionsprofile. Die Tabellen 18-21 stellen die Ergebnisse der SAM-Analyse mit der Software „siggenes“ dar.

Das Ausmaß der Genexpression in Monozyten und EC wird unter *in vitro* Bedingungen davon beeinflusst, ob die Interaktion mit frischen oder mit 42 Tage gelagerten RBC stattfindet (Tabelle 14). Die differentielle Genexpression in Monozyten und EC stellt sich bei Interaktionen mit alten RBC als vermindert dar. Bei Versuchen mit Monozyten wurde sie um ca. 24% reduziert, Untersuchungen mit EC ergaben einen Rückgang um ca. 5%.

Aus Tabelle 14 lässt sich entnehmen, dass EC mehr exprimieren als Monozyten (bei Interaktionen mit 21 Tage alten RBC 70% mehr, mit 42 Tage alten RBC 113% mehr). Das bedeutet, dass Monozyten gegen die Interaktion mit RBC unabhängig von der Lagerdauer grundsätzlich resistenter sind als EC, welche empfindlicher auf die Interaktion mit RBC reagieren.

Tabelle 14: Differentielle Genexpression

Gene, die detektiert wurden (inklusive Werte nach $< \pm 2$ -fach differentieller Expression), wurden 100% gleichgesetzt.

Arrays \ Anzahl der Gene	Gesamt	Differentiell detektiert (< ± 2 -fach)	± 2 -fach differentiell	± 5 -fach differentiell
1.Array Monozyten RBC Tag 21 vs. Tag 1	1.064	560 = 100%	7 = 1,25%	0
2.Array Monozyten RBC Tag 42 vs. Tag 1	1.064	426 = 100%	4 = 0,94%	0
3.Array Endothelzellen RBC Tag 21 vs. Tag 1	1.064	950 = 100%	38 = 4%	3 = 0,32%
4.Array Endothelzellen RBC Tag 42 vs. Tag 1	1.064	907 = 100%	26 = 2,87%	3 = 0,33%

In die folgenden Tabellen wurden nur die Gene aufgenommen, die entweder >2-fach induziert (rote Markierung) oder <0,5-fach reprimiert (grüne Markierung) worden sind. Alle Gene sind nach einer Lagerdauer von 21 oder 42 Tagen im Vergleich zu Tag 1 als Kontrollgruppe > ±2-fach reguliert worden. Gene, die mehreren Funktionsgruppen zugeordnet werden konnten, wurden bei der Darstellung der Summe der induzierten oder reprimierten Gene nur einfach gezählt.

Aus **Tabelle 15** lässt sich entnehmen, dass Gene aus den Funktionsgruppen „Zellzyklus und DNA-Reparatur“ und „DNA-Metabolismus“ bei Monozyten nach Interaktion mit 21 und 42 alten RBC nicht bzw. nicht relevant reguliert werden. Gene aus der Funktionsgruppe des Komplementsystems werden nach Interaktion mit 21 und 42 Tage alten RBC weder bei EC noch bei Monozyten relevant reguliert. Das Gen SCYA2 (aus der Funktionsgruppe „cytokin-signalisierend“) wurde als einziges sowohl in EC als auch in Monozyten reprimiert. Die Repression erfolgte nach Interaktion mit 21 Tage alten RBC. Nach Interaktion mit 42 Tage alten RBC war keine relevante Regulation mehr messbar.

In der Analyse der Interaktion von 21 und 42 Tage gelagerten RBC mit Monozyten (siehe **Tabelle 16**) zeigt sich, dass die Lagerdauer der RBC einen differentiellen Einfluss auf die Induktion und Repression von Genen hat. Die Interaktion von Monozyten mit 21 Tage gelagerten RBC führt ausschließlich zu einer Induktion (n=6). An Tag 42 der Lagerdauer hingegen bewirken die RBC keine Induktion mehr. Die Interaktion führt jedoch zu einer Repression von Genen (n=4).

Wie man in **Tabelle 17** erkennt, führt die Interaktion von EC mit 42 Tage alten RBC zu einem Rückgang der regulierten Gene um 50% von n=26 auf n=13. Jedoch ist die Regulation der Genexpression vermutlich stabiler und nachhaltiger, wie beispielsweise am Gen „TRADD“ zu erkennen ist. Das Gen, das Strukturen codiert, welche an „Apoptose“ und „zellulärem Stress“ beteiligt sind, wurde sowohl an Tag 21 als auch an Tag 42 >2fach differentiell induziert.

Tabelle 15: Funktionszuordnung zellspezifisch regulierter Gene in Monozyten und Endothelzellen

Das grün markierte Gen „SCYA2“ wird als einziges Gen sowohl in Monozyten als auch in Endothelzellen differenziell reguliert. Es wird nur an Tag 21 und nicht an Tag 42 der Lagerdauer differenziell reguliert.

Zellspezifisch regulierte Gene von Monozyten und Endothelzellen		Monozyten		Endothelzellen	
		Induzierte Gene (n=6)	Reprimierte Gene (n=5)	Induzierte Gene (n=19)	Reprimierte Gene (n=19)
Funktionsgruppen					
I	Cytokine signalling (n=14)	(n=3) VEGF SOCS3 IL1RN	(n=2) CXCL3 SCYA2	(n=2) IL6 TGFB2	(n=8) IL8 TNFC IL3RA CXCR3 BMP2 CXCL1 VEGC SCYA2
II	Apoptosis/ Inflammation (n=6)	SOCS3	FLASH	TRADD	(n=3) TNFC IKBA BNIP3L
III	Cell cycle (n=4)	-	-	(n=3) CDKN1A CCND3 KSR1	PLEKHC1
IV	DNA repair and metabolism (n=1)	-	-	BRCA2	-
V	Extracellular matrix (n=7)	-	MMP19	(n=4) ITGB4 COL8A1 BGN SPARC	(n=2) PAI1 MMP1
VI	Stress (n=8)	SOCS3	CXCL3	TRADD	(n=5) CXCL1 HSPCA HSPA4 IKBA BNIP3L
VII	Acute phase (n=1)	THBD	-	-	-
VIII	Complement system (n=0)	-	-	-	-
IX	General signal transduction (n=17)	(n=3) SOCS3 MAP2K3 IL1RN	(n=2) MMP19 FLASH	(n=7) BRCA2 RASA1 SHC1 TGFB2 KSR1 PRKCZ CBLB	(n=5) CXCR3 PLA2G4 MMP1 IKBA PLEKHC1
X	Surface marker (n=8)	THBD	CD58	(n=3) ITGB4 CD34 TM4SF2	(n=3) IL3RA ICAM1 CXCR3
XI	Protein degradation (n=3)	-	MMP19	CBLB	MMP1
XII	Transcription factors (n=6)	FOS	-	(n=2) FOSB FOSL2	(n=3) CEBPB IKBA IRF1

Tabelle 16: Funktionszuordnung in Abhängigkeit von der Lagerdauer ausschließlich in Monozyten regulierter Gene

In Monozyten sind Gene entweder an Tag 21 oder an Tag 42 der Lagerdauer exprimiert worden, kein Gen ist sowohl an Tag 21 als auch an Tag 42 exprimiert worden.

Substratspezifisch regulierte Gene von Monozyten		RBC Lagerdauer Tag 21		RBC Lagerdauer Tag 42	
		Induzierte Gene (n=6)	Reprimierte Gene (n=0)	Induzierte Gene (n=0)	Reprimierte Gene (n=4)
Funktionsgruppen					
I	Cytokine signalling (n=4)	(n=3) VEGF SOCS3 IL1RN	-	-	CXCL3
II	Apoptosis/Inflammation (n=2)	SOCS3	-	-	FLASH
III	Cell cycle (n=0)	-	-	-	-
IV	DNA repair and metabolism (n=0)	-	-	-	-
V	Extracellular matrix (n=1)	-	-	-	MMP19
VI	Stress (n=2)	SOCS3	-	-	CXCL3
VII	Acute phase (n=1)	THBD	-	-	-
VIII	Complement system (n=0)	-	-	-	-
IX	General signal transduction (n=5)	(n=3) SOCS3 MAP2K3 IL1RN	-	-	(n=2) MMP19 FLASH
X	Surface marker (n=2)	THBD	-	-	CD58
XI	Protein degradation (n=1)	-	-	-	MMP19
XII	Transcription factors (n=1)	FOS	-	-	-

Tabelle 17: Funktionszuordnung in Abhängigkeit von der Lagerdauer ausschließlich in Endothelzellen regulierter Gene

Das rot markierte Gen „TRADD“ ist als einziges sowohl an Tag 21 als auch an Tag 42 >2fach differentiell induziert worden.

Substratspezifisch regulierte Gene von Endothelzellen		RBC Lagerdauer Tag 21		RBC Lagerdauer Tag 42	
		Induzierte Gene (n=11)	Reprimierte Gene (n=15)	Induzierte Gene (n=10)	Reprimierte Gene (n=3)
I	Cytokine signalling (n=8)	(n=2) IL6 TGFBR2	(n=6) TNFC IL3RA CXCR3 BMP2 VEGC SCYA2	CXCL1	IL8
II	Apoptosis/ Inflammation (n=5)	TRADD	(n=3) TNFC IKBA BNIP3L	TRADD	-
III	Cell cycle (n=4)	(n=2) CDKN1A KSR1	PLEKHC1	CCND3	-
IV	DNA repair and metabolism (n=1)	BRCA2	-	-	-
V	Extracellular matrix (n=6)	SPARC	MMP1	(n=3) ITGB4 COL8A1 BGN	PAI1
VI	Stress (n=7)	TRADD	(n=4) HSPCA HSPA4 IKBA BNIP3L	(n=2) TRADD CXCL1	-
VII	Acute phase (n=0)	-	-	-	-
VIII	Complement system (n=0)	-	-	-	-
IX	General signal transduction (n=12)	(n=6) BRCA2 SHC1 TGFBR2 KSR1 PRKCZ CBLB	(n=4) CXCR3 MMP1 IKBA PLEKHC1	RASA1	PLA2G4
X	Surface marker (n=6)	TM4SF2	(n=3) IL3RA ICAM1 CXCR3	(n=2) ITGB4 CD34	-
XI	Protein degradation (n=2)	CBLB	MMP1	-	-
XII	Transcription factors (n=5)	-	(n=3) CEBPB IKBA IRF1	(n=2) FOSB FOSL2	-

Die Tabellen 18-21 zeigen, welche 20 Gene jeweils von Monozyten und Endothelzellen mit der höchsten Signifikanz durch die Interaktion mit gelagerten RBC in der Expression beeinflusst wurden. Man erkennt, dass die Interaktion von Endothelzellen und Monozyten mit 21 und 42 Tage alten RBC besonders die Expression von Genen signifikant reguliert, die funktional an der „zellulären Signaltransduktion“ sowie am „zellulären Stress“ beteiligt sind. Gene, die Proteine des „zellulären Stresses“ codieren, werden zudem mit steigender Lagerdauer sowohl in APC als auch in EC stärker reguliert.

Zusätzlich werden nach Interaktionen von Monozyten mit 21 und 42 Tage alten RBC (siehe Tabelle 20) Gene der Funktionsgruppen „Apoptose und Entzündung“ sowie „Cytokine und ihre Rezeptoren“ besonders häufig signifikant reguliert.

Experimente von Endothelzellen mit 21 und 42 Tage gelagerten RBC (siehe Tabelle 21) machen deutlich, dass außerdem mehr Gene in den Funktionsgruppen „Transkriptionsfaktoren“ und „Extrazelluläre Matrix“ signifikant reguliert werden.

Tabelle 18: 20 am signifikantesten regulierte Gene und die Signalquotienten von Monozyten nach Interaktion mit 21 und 42 Tage alten RBC

Genname	Monozyten, RBC Tag 21 vs. Tag 1	Monozyten, RBC Tag 42 vs. Tag 1
IL2RA	1,41	0,54
HSPA1A	1,08	1,76
CCL20	1,63	0,86
ITGB2	0,54	1,17
MMP9	0,54	1,15
TRADD	1,75	1,12
ZMDA1	1,25	0,69
LKHA	0,7	1,24
CD81	0,78	1,36
CTSD	1,11	1,67
BAG3	1,28	1,8
IL8	1,24	0,75
MIP2B	0,97	0,49
EBI2	1,26	0,77
ABIN3	1,1	0,61
IKBE	0,81	1,28
BAG1	0,96	1,48
FRA2	1,23	0,79
ATF4	1,47	1,05
MMP18	0,86	0,42

Tabelle 19: 20 am signifikantesten regulierte Gene und die Signalquotienten von Endothelzellen nach Interaktion mit 21 und 42 Tage alten RBC

Genname	Endothelzellen, RBC Tag 21 vs. Tag 1	Endothelzellen, RBC Tag 42 vs. Tag 1
COL8A1	0,56	2,16
GRO1	0,87	2,5
GADD153	1,72	0,7
HSP105	0,52	1,42
JUN	0,51	1,32
HES1	1,01	1,76
FOS1	3,06	2,05
RHOIP3	0,64	1,38
TM4SF2	2,24	1,39
SPRY1	0,54	1,24
BARD1	0,63	1,38
COL4A1	0,61	1,33
MOBLAK	1,07	1,94
ZF9	0,6	1,25
COL4A2	0,69	1,39
CYR61	0,82	1,5
SB135	1,04	2,23
SP3	0,86	1,5
HSPA6	0,56	1,18
BIP	0,66	1,26

Tabelle 20: Verteilung der 20 Gene, die am signifikantesten durch die Interaktion von Monozyten mit 21 und 42 Tage alten RBC reguliert wurden innerhalb der Funktionsgruppen

n>20, da einige Gene mehreren Funktionsgruppen zugeordnet werden können.

Funktionsgruppen		Signifikante Gene n=37	Monozyten RBC Tag 21 n=19	Monozyten RBC Tag 42 n=18
I	Cytokine signalling	n=5	n=5 IL2RA CCL20 ZMDA1 IL8 MIP2B	n=0
II	Apoptosis/ Inflammation	n=5	n=2 ABIN3 TRADD	n=3 BAG1 BAG3 IKBE
III	Cell cycle	n=1	n=1 ABIN3	n=0
IV	DNA repair and metabolism	n=0	n=0	n=0
V	Extracellular matrix	n=3	n=1 MMP18	n=2 ITGB2 MMP9
VI	Stress	n=6	n=2 MIP2B TRADD	n=4 BAG1 BAG3 HSPA1A IKBE
VII	Acute phase	n=0	n=0	n=0
VIII	Complement system	n=0	n=0	n=0
IX	General signal transduction	n=8	n=4 ABIN3 EBI2 MMP18 TRADD	n=4 BAG1 BAG3 IKBE MMP9
X	Surface marker	n=3	n=1 IL2RA	n=2 CD81 ITGB2
XI	Protein degradation	n=3	n=1 MMP18	n=2 MMP9 BAG1
XII	Transcription factors	n=3	n=2 ATF4 FOSL2	n=1 IKBE

Tabelle 21: Verteilung der 20 Gene, die am signifikantesten durch die Interaktion von Endothelzellen mit 21 und 42 Tage alten RBC reguliert wurden innerhalb der Funktionsgruppen

n>20, da einige Gene mehreren Funktionsgruppen zugeordnet werden können.

Funktionsgruppen		signifikante Gene n=21	Endothelzellen RBC Tag 21 n=3	Endothelzellen RBC Tag 42 n=18
I	Cytokine signalling	n=1	n=0	n=1 GRO1
II	Apoptosis/ Inflammation	n=0	n=0	n=0
III	Cell cycle	n=1	n=0	n=1 MOBLAK
IV	DNA repair and metabolism	n=1	n=0	n=1 BARD1
V	Extracellular matrix	n=3	n=0	n=3 COL8A1 COL4A1 COL4A2
VI	Stress	n=4	n=0	n=4 GRO1 HSP105 HSPA6 BIP
VII	Acute phase	n=0	n=0	n=0
VIII	Complement system	n=0	n=0	n=0
IX	General signal transduction	n=4	n=1 GADD153	n=3 BARD1 RHOIP3 SPRY1
X	Surface marker	n=1	n=1 TM4SF2	n=0
XI	Protein degradation	n=1	n=0	n=1 BARD1
XII	Transcription factors	n=5	n=1 FOS	n=4 HES1 JUN SP3 ZF9

4. Diskussion

Das leukozytendepletierte Erythrozytenkonzentrat ist derzeit eines der wichtigsten Therapeutika in der modernen Transfusionsmedizin, welche seit der Einführung der Therapie mit allogenen Blutkomponenten einerseits sicherer für den Patienten wurde und andererseits effizienter gegen die knappen Blutressourcen agieren kann [42]. Bei weitgehender Beherrschung der klassischen transfusionsassoziierten Infektionsrisiken (HIV, HBV, HCV) gewinnen immunologische Nebenwirkungen zunehmend an Bedeutung [60]. Eine transfusionsassoziierte Autoimmun- bzw. Alloimmunantwort gegen Erythrozytenantigene hat Konsequenzen für weitere Transfusionen bei beispielsweise akutem Blutverlust, Hämotherapien bei chronischen Anämien oder Schwangerschaften.

Neuere Studien lassen die Vermutung zu, dass auch gelagerte bzw. gealterte Erythrozytenpräparationen Einfluss auf immunologische Reaktionen nehmen können, z.B. führt die Apoptose neutrophiler Granulozyten in gelagerten EK zu einer Immunsuppression beim Empfänger [5]. Die multiplen Veränderungen an den Erythrozyten während einer Lagerung außerhalb des Organismus werden in der Literatur als Lagerungsschaden zusammengefasst. Derzeit werden EK je nach Stabilisator-Lösung bis zu 49 Tage gelagert, bevor sie transfundiert werden. Eine niederländische 5-Jahres-Studie zeigt, dass die Lagerdauer durchschnittlich $19,4 \pm 7$ Tage beträgt, wobei 37% aller transfundierten EK älter als drei Wochen sind [47]. Dabei kann man beobachten, dass transfundierte RBC, die kürzer als zwei Wochen gelagert wurden, *in vivo* größtenteils überleben, während länger gelagerte RBC innerhalb von 24h nach Transfusion verstärkt abgebaut wurden [41]. Diese Daten gewinnen an Relevanz im Hinblick auf ein schwerkrankes Patientenkollektiv, wie es im Bereich der Intensivmedizin versorgt werden muss. Hier konnten Purdy et al. sogar eine höhere Mortalitätsrate nach Transfusionen mit 17-25 Tage altem Blut nachweisen, die vermutlich mit der Lagerdauer der EK assoziiert ist und deren Ursache mitunter in der erschwerten Sauerstoffabgabe durch die RBC liegt [45, 64, 65].

Insbesondere bei Erythrozyten ist zusätzlich zu berücksichtigen, dass sie bereits in ihrem physiologischen Milieu in ständigem Kontakt zu antigenpräsentierenden Zellen und zu Endothelzellen, die unter bestimmten Umständen ebenfalls Antigene präsentieren können, stehen [52]. Vor diesem Hintergrund ist die Beeinflussung der RBC-APC-Interaktion und der RBC-EC-Interaktion im peripheren Blut durch gelagerte Erythrozyten in der Literatur nicht hinreichend beschrieben und könnte für das weitere Verständnis der Mechanismen der Antigen-

präsentation sowie für die Qualität und Logistik der Blutprodukte von Bedeutung sein. Daher beschäftigt sich diese Arbeit im Wesentlichen mit zwei Fragen:

1. Lässt sich *in vitro* ein Einfluss der Erythrozytenlagerung auf Interaktionen hämotherapeutisch angewandter RBC-Präparationen mit APC und mit EC nachweisen?
2. Ist der Einfluss der Erythrozytenlagerung auf Interaktionen hämotherapeutisch angewandter RBC-Präparationen mit APC und mit EC von funktioneller Relevanz?

Die Grundvoraussetzung für die Realisierung dieser Arbeit war zunächst die verlässliche und reproduzierbare Etablierung und Validierung eines experimentellen Systems, das es ermöglicht die funktionelle Wirkung von EK unterschiedlicher Lagerdauern auf Erythrozyten-Zell-Interaktionen und das Genexpressionsprofil dieser antigenpräsentierenden oder zur Antigenpräsentation befähigten Zellen in Abhängigkeit von der Interaktion mit den EK zu messen. Die in dieser Dissertation verwendete Methode verknüpft die biomolekulare Interaktionsanalyse mit der Genexpressionsanalyse mittels cDNA-Chips.

Die biomolekulare Interaktionsanalyse ermöglicht es, markierungsfrei und zeitaufgelöst die Bindung von Biomolekülen zu messen. Einer der beiden Interaktionspartner wird auf der Sensoroberfläche einer Küvette immobilisiert und kann nach einem bestimmten Schema repetitierend mit dem zweiten, sich in der Lösung befindlichen Interaktionspartner in Kontakt gebracht werden. Die Bindungsreaktion kann online auf einem Bildschirm verfolgt werden. In dieser Arbeit wurden klassische antigenpräsentierende Zellen wie dendritische Zellen, regulatorische T-Zellen und Monozyten verwendet sowie prinzipiell zur Antigenpräsentation befähigte Zellen wie Endothelzellen. Die Zellen wurden in offenen Küvetten eines IAsys® Single-Well-Gerätes auf Carboxylat- oder Aminosilanoberflächen immobilisiert, so dass die Interaktion zwischen dem Analyten, also in HBS, Plasma oder Vollblut gelösten RBC eines definierten Alters und den Zellen herbeigeführt werden konnte.

Für die Genexpressionsanalysen wurden cDNA-Chips der Firma Memorec verwendet. Zunächst erfolgte die Interaktion zwischen RBC verschiedener Lagerdauern und den APC in Gegenwart von Plasma, anschließend wurde die RNA der Zielzellen präpariert und revers transkribiert. Nach der Markierung der cDNA mit Fluoreszenzfarbstoffen wurden die Microarrays hybridisiert, gescannt und schließlich computergestützt analysiert.

Als Zielzellen der lagerdauerabhängigen RBC-Zell-Interaktion wurden für die biomolekulare Interaktionsanalyse professionelle antigenpräsentierende Zellen wie Monozyten, regulatorische T-Zellen und dendritische Zellen sowie prinzipiell zur Antigenpräsentation befähigte Endothelzellen (aortale, venöse und mikrovaskuläre EC) verwendet. Für die Genexpressionsanalyse wurden Monozyten und mikrovaskuläre EC genutzt. Die Wahl fiel auf die klassischen APC, die an einer Immunantwort auf Proteinantigene relevant beteiligt sind, da die Antigenpräsentation von Proteinantigenen in der Immunologie am besten untersucht ist. Insbesondere Monozyten ermöglichen eine einfache experimentelle Handhabung, da sie verfügbar und relativ schnell aus Buffy coats isolierbar sind. Kürzlich veröffentlichte Daten zeigen, dass Monozyten in verschiedenen Subpopulationen vorkommen können und vermutlich auch verschieden auf Infektionen reagieren, so dass hier weitergehende Untersuchungen der Interaktion von Monozyten mit gelagerten RBC von Interesse sind, um mögliche Konsequenzen eines Lagerungsschadens auf anti-erythrozytäre Auto- und Alloimmunisierungen zu erkennen [61].

Der spezialisierte Untertyp der $CD4^+CD25^+$ -regulatorischen T-Zellen hat die Aufgabe, die Aktivität anderer T-Zellen zu hemmen und so ein "Überschießen" der Immunreaktion zu verhindern. Durch die kürzliche Identifikation von Neuropilin-1 als einen Oberflächenmarker auf $CD4^+CD25^+$ -regulatorischen T-Zellen kann man diese gezielt isolieren und von anderen T-Zellen unterscheiden [8]. Es konnte nachgewiesen werden, dass bei bestimmten Autoimmunerkrankungen die Anzahl dieser ausdifferenzierten Treg reduziert ist, so dass die autoreaktiven T-Zellen verstärkt agieren können [58]. Ob auch durch eine erhöhte Lagerdauer und einen damit einhergehenden möglichen Lagerungsschaden der EK die Interaktion zwischen RBC und Treg verändert wird und somit Auswirkungen auf Autoimmunreaktionen hat, ist bislang noch nicht experimentell angegangen worden.

Neuere Untersuchungen zeigen, dass dendritische Zellen nicht nur in peripheren lymphatischen Geweben und als Langerhans-Zellen in der Epidermis vorkommen, sondern auch 0,1-1,0% aller PBMC im peripheren Blut bilden [26, 54]. Durch eine Selektin-vermittelte Interaktion mit dem Gefäßendothel können sie ins periphere Gewebe auswandern. Obwohl ihre Isolierung aus dem peripheren Blut seit kurzem möglich ist, ist ihre Funktion dort noch unklar [49]. Schakel et al. konnten jedoch eine Subpopulation dendritischer Zellen im peripheren Blut nachweisen, die die Fähigkeit zur Phagozytose opsonierter Erythrozyten besitzt [54]. Man kann also vermuten, dass DC im peripheren Blut als APC für Erythrozyten-Antigene fungieren und eine wichtige Rolle in der anti-erythrozytären Immunreaktion spielen könnten.

Diese Rolle könnte im gleichen Ausmaß modifiziert werden, wie sich die Erythrozyten mit steigender Lagerdauer verändern. Es wurde bisher jedoch noch kein Ansatz unternommen, um diese Hypothese experimentell zu klären.

In den vergangenen Jahren ist der Nachweis gelungen, dass Endothelzellen Antigene präsentieren können. Vaskuläre Endothelzellen der Plazenta konnten Fc- oder Complement-Rezeptor-vermittelt IgG internalisieren und ein neues Molekül auf der Zellmembran präsentieren [22]. In einem *in vivo* Experiment an Mäusen konnte die Antigenpräsentation von Endothelzellen im Rahmen der Transplantatabstoßung gezeigt werden, so dass die Vermutung begründet ist, dass Endothel nicht nur für die Rekrutierung von Immunzellen sondern auch für das aktive Auslösen einer Immunreaktion verantwortlich ist [51, 52]. Im Gefäßsystem kommt es zu einem ständigen physiologischen Kontakt zwischen Erythrozyten und Endothelzellen, der im hochspezialisierten mikrovaskulären Bereich besonders eng ist. Hier stellt sich die Frage, ob die RBC-EC-Interaktion nicht durch die Auswirkungen eines Lagerungsschadens auf beispielsweise die RBC-Membran beeinflusst wird, insbesondere, da die Rolle der RBC im Immunsystem selbst zu einem relevanten Teil unerforscht ist [3, 12].

4.1. Lässt sich *in vitro* ein Einfluss der Erythrozytenlagerung auf Interaktionen hämotherapeutisch angewandter RBC-Präparationen mit APC und mit EC nachweisen?

Die im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Daten lassen sich wie folgt kondensieren: Die Bindungsfähigkeit gelagerter Erythrozyten mit DC, Monozyten und HDMEC in Gegenwart von Vollblut im Vergleich von Tag 1 und Tag 28 nimmt statistisch signifikant ab. Die Interaktion gelagerter Erythrozyten mit Treg, HAoEC und HSaVEC in Gegenwart von Vollblut im Vergleich von Tag 1 und Tag 28 nimmt ab, erreicht jedoch keine statistische Signifikanz. Die Bindungsfähigkeit der RBC in HBS im Vergleich von Tag 1 zu Tag 28 stellt sich in der Regel als vermindert dar, ohne statistisch signifikant zu sein. An Tag 1 ist die Bindungsfähigkeit der RBC an alle immobilisierten Liganden in HBS grundsätzlich niedriger als in Vollblut. Die erniedrigte Bindungsfähigkeit in HBS an Tag 1 ist statistisch signifikant für Monozyten, HAoEC, HSaVEC und für HDMEC und nicht statistisch signifikant im Fall der Bindung an Treg und an DC. Der Unterschied der Bindung zwischen HBS und Vollblut an Tag 28 ist statistisch signifikant für EC aber nicht für klassische APC.

Zusammenfassend lässt sich *in vitro* ein signifikanter Einfluss der Erythrozytenlagerung auf Interaktionen hämotherapeutisch angewandter RBC-Präparationen mit APC und EC nachweisen: 28 Tage gelagerte EK supprimieren im Medium Vollblut signifikant die Interaktion von RBC mit DC, Monozyten und HDMEC. Im Medium HBS lässt sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Bindungsintensität im Vergleich von Tag 1 zu Tag 28 feststellen.

Die Ergebnisse stehen zum Teil im Widerspruch zu den Angaben der klassischen Literatur aber auch zu einigen neueren Untersuchungen, die keine signifikante Veränderung der Bindungsintensität von gelagerten RBC zeigen [2, 38]. Diese Studien jedoch untersuchen die Adhäsionsfähigkeit in Gegenwart des artifiziellen Mediums HBS, das die *in vivo*-Konditionen nur unzureichend wiedergibt. Es ist zu vermuten, dass sich die Adhäsion in physiologischer Umgebung, wie sie die Medien Plasma oder Vollblut besser schaffen, anders verhält und die signifikant niedrigere Bindungsintensität begründet. Warum die Interaktion von RBC mit Treg, HAoEC und HSaVEC nicht signifikant supprimiert wurde, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Möglicherweise spielt der Kontakt zwischen HDMEC und RBC eine Rolle, da er in mikrovaskulären Gefäßen enger ist als in Arterien oder Venen. Insgesamt ist die verminderte Bindungsintensität der gelagerten RBC vermutlich auf den Alterungsprozess der Erythrozyten zurückzuführen, der mit irreversiblen Formveränderungen, verminderter Verformbarkeit und biochemischen Veränderungen sowohl an der Zellmembran als auch intrazellulär einhergeht [5, 6].

4.2. Ist der Einfluss der Erythrozytenlagerung auf Interaktionen hämotherapeutisch angewandter RBC-Präparationen mit APC und EC von funktioneller Relevanz?

Die erhobenen Daten zeigen einen funktionell signifikanten Einfluss der Erythrozytenlagerung auf Interaktionen hämotherapeutisch angewandter RBC-Präparationen mit antigenpräsentierenden und prinzipiell zur Antigenpräsentation befähigten Zellen. Zudem ermöglicht der für diese Arbeit etablierte Versuchsaufbau im Grundsatz die Identifikation von Markergenen, die für die untersuchte RBC-APC- und RBC-EC-Interaktion charakteristisch sind. Die Auswertung der 20 Gene, die mit höchster Signifikanz durch 21 und 42 Tage alte RBC reguliert werden, zeigt, dass RBC sowohl bereits nach einer Lagerdauer von 21 Tagen als auch nach 42 Tagen sowohl in APC als auch in EC im besonderen Ausmaß Gene regulieren, die an der „zellulären Signaltransduktion“ beteiligt sind. Die Interaktion von APC und EC mit

gelagerten RBC führt außerdem mit steigender Lagerdauer zu einem Anstieg der Regulierung von „zellulären Stress“-Genen. Desweiteren ist bemerkenswert, dass Monozyten nach 21 und 42 Tagen Lagerdauer etwa gleich stark reguliert werden, während die Regulation von EC nach 42 Tagen Lagerdauer deutlich ansteigt. Eine mögliche Erklärung könnte in einer höheren Sensibilität der Endothelzellen gegenüber gelagerten RBC liegen.

Die intakte Funktion eines Organismus beruht auf koordinierten Signalkaskaden, so dass jeder Eingriff in dieses ausgeklügelte System zu einem pathologischen Prozess führen kann. Die Gabe von gelagerten EK kann ein solcher Eingriff sein. Die verstärkte Regulation von Genen, die an der „zellulären Signaltransduktion“ beteiligt sind, kann in direkter Korrelation zur erhöhten Regulation von Genen des „zellulären Stresses“ stehen. Studien haben nachgewiesen, dass die Lagerung von RBC zu einer oxidativen Schädigung zellulärer Bestandteile führt. Dieser zelluläre, oxidative Stress kann über die Aktivierung zellulärer Signalkaskaden zum Zelltod führen [34].

Einen anderen interessanten Aspekt bietet das Gen TRADD, welches Strukturen des „zellulären Stresses“ und der „Apoptose“ codiert und ein ausschlaggebender Mediator für intrazelluläre Antworten des TNF-Rezeptors 1 (TNFR 1) ist. Von TRADD wird vermutet, das Protein zu sein, welches über das Überleben oder die Apoptose einer Zelle entscheidet [67]. Weitere Untersuchungen mit diesem Gen wären interessant, um möglicherweise reproduzierbare Qualitätskontrollen zu entwickeln. Hier ist insbesondere die Übertragbarkeit von Untersuchungsergebnissen von Monozyten auf EC von Interesse, da Monozyten im Vergleich zu EC relativ einfach zu handhaben sind.

Die Forschung in der Hämotherapie zielt unvermindert darauf ab, die Qualität der Blutprodukte im Hinblick auf ihre klinische Wirksamkeit erhöhen. Gerade unter diesem Aspekt wird seit einigen Jahren wieder vermehrt der Punkt der Lagerung der EK diskutiert. Ziel muss es sein, einerseits möglichst frische Blutprodukte zur Verfügung zu haben, andererseits die Logistik der Vorratshaltung von Blut so zu gestalten, dass sowohl Versorgungsspitzen sicher abgefangen werden können als auch die Verfallsrate von Blutprodukten so klein wie möglich gehalten wird. Ein Ansatz zur Erreichung dieses Ziels ist, die Blutversorgung auf eine regionalbasierte, klinikintegrierte Versorgungsstruktur auszurichten, so dass „on demand“ produziert werden kann. Moderne Apherese-Technologien bieten hier gute Möglichkeiten [10, 14]. Eine andere Strategie dieses Ziel zu erreichen, besteht darin, die Vorratshaltung der EK zu vereinfachen und zu begrenzen, indem RBC *in vitro* so modifiziert werden, dass sie ihre

antigenen und immunogenen Eigenschaften verlieren und universal transfundierbar werden [7, 23]. Hier zeigen neueste Experimente bereits in konkreten Ansätzen, dass ABO-Blutgruppen-Antigene enzymatisch über bakterielle Glycosidasen von der RBC-Zelloberfläche entfernt werden können [46].

4.3. Zusammenfassung und Ausblick

Mit Hilfe der Daten, die im Rahmen dieser Dissertation erarbeitet wurden, können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

- Die Interaktion von RBC mit DC, Monozyten und HDMEC wird im Medium Vollblut durch steigende Lagerdauer der Erythrozyten signifikant supprimiert.
- Im Medium HBS lässt sich mit steigender Lagerdauer keine signifikante Abnahme der Bindungsintensität von RBC mit APC oder EC feststellen.
- 1 Tag gelagerte RBC interagieren im Medium HBS signifikant schwächer mit Monozyten und EC als in Vollblut.
- Die Interaktion von gelagerten EK mit Endothelzellen und antigenpräsentierenden Zellen induziert charakteristische Genexpressionsprofile.
- Es wurde ein Versuchsdesign etabliert, welches prinzipiell geeignet ist, verschiedene Markergene für RBC-Zell-Interaktionen zu identifizieren, die sowohl immunologisch als auch hämorheologisch relevant sind.

Der entwickelte experimentelle Ansatz ist somit prinzipiell dazu geeignet:

- den Einfluss der Lagerdauer von EK auf RBC-Zell-Interaktionen zu beschreiben,
- den Einfluss der Lagerdauer von EK auf Genexpressionsprofile von Monozyten und mikrovaskulären Endothelzellen zu analysieren,
- Markergene für RBC-Zell-Interaktionen zu identifizieren und
- Qualitätskontrollen für Blutprodukte zu entwickeln.

Anhang**A. Lebenslauf****Persönliche Daten**

Name: Natalie Martha Haarmann (geb. Bienek)
Geburtsdatum: 23. April 1978
Geburtsort: Königshütte, Oberschlesien
Eltern: Martin Bienek, Organisationsprogrammierer
Barbara Bienek (geb. Moczigemba), Hausfrau
Familienstand: verheiratet, keine Kinder

Schullaufbahn

1985 – 1988 Grundschole Nr. 3, Königshütte
1988 Freiligrath-Grundschole, Dortmund
1988 – 1989 Elsa-Brändström-Grundschole, Dortmund
1989 – 1998 Mallinckrodt-Gymnasium, Dortmund

Studium und Beruf

04.1999 Studienbeginn der Zahnmedizin
Westfälische Wilhelms-Universität, Münster
09.2001 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
09.2002 Zahnärztliche Vorprüfung
07.2005 Approbation als Zahnärztin
09.2005 – heute Anstellung als Ausbildungsassistentin

Münster, 17.12.07

Natalie Haarmann

B. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Sibrowski, Direktor des Institutes für Transfusionsmedizin an der Universität Münster für die Überlassung des interessanten Themas und die Möglichkeit, die Labore und Materialien des Institutes zu nutzen.

Weiterhin bedanke ich mich ganz besonders bei Frau Prim. Prof. Dr. Dorothea Stahl, deren Betreuung von Beginn an außergewöhnlich intensiv und engagiert gewesen ist, für ihre wertvolle Hilfe, ihr stets offenes Ohr und ihr persönliches Interesse am Erfolg dieser Dissertation.

Bei Frau Dr. Nani Osada möchte ich mich für ihre fachliche Kompetenz und freundliche Begleitung des statistischen Teils der Arbeit bedanken.

Desweiteren sei den Mitarbeitern in der Blutspende, der Blutbank und im Transfusionsinstitut gedankt, die mich bei der Etablierung und Durchführung der Experimente stets hilfsbereit unterstützten.

Dank gebührt auch meinen Mit-Doktoranden Astrid Hellwig, Rietje Rautmann und Katharina Mahncke für den kollegialen Austausch und das tolle Arbeitsklima.

Schließlich möchte ich mich von Herzen bei meiner Familie bedanken, die mich während meiner ganzen akademischen Ausbildung liebevoll und tatkräftig unterstützt hat. Meinem Mann Alexander danke ich außerdem für seine Hilfe bei der formalen Umsetzung der schriftlichen Arbeit und seine grenzenlose Geduld.

Literaturverzeichnis

- [1] Anniss A, Proteomic analysis of supernatants of stored red blood cell products, *Transfusion* 2005, 45: 1.426-1.433
- [2] Anniss A, Variable adhesion of different red blood cell products to activated vascular endothelium under flow conditions, *Am J Hematol* 2006, Nov. 28 (Epub ahead of print)
- [3] Arosa F et al, Red Blood Cells as Modulators of T Cell Growth and Survival. *Current Pharmaceutical Design* 2004, 10: 191-201
- [4] Batista F, B Cells acquire antigen from target cells after synapse formation, *Nature* 2001, 411: 489-494
- [5] Baumann, C: *Bluttransfusionen: Einflüsse auf Immunsystem und Mikrozirkulation*, Eckardt, Forst, Burchardi, *Intensivmedizin* 2005
- [6] Berezina T, Influence of storage on red blood cell rheological properties, *J Surg Res* 2002, 102(1): 6-12
- [7] Blajchman M, Clinical and Molecular Basis of Transfusion-Induced Immunomodulation: Summary of the Proceedings of a State-of-the-Art Conference, *Transfusion Medicine Reviews* 2001, 15(2): 108-135
- [8] Bruder D, Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells, *Eur J Immunol* 2004, 34(3): 623-630
- [9] Bundesministerium der Justiz, Bekanntmachung Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie). *Novelle* 2005: 18
- [10] Burgstaler E, Blood Component Collection by Apheresis, *Journal of Clinical Apheresis* 2005
- [11] Carrasco Y, B Cell recognition of membrane-bound antigen: an exquisite way of sensing ligands, *Curr Opin Immunol* 2006, 18: 286-291
- [12] Chen Y, Membrane deformation of unfixed erythrocytes in air with time lapse investigated by tapping mode atomic force microscopy, *Elsevier/Micron* 2005
- [13] Choi J, T Lymphocyte-Endothelial Cell Interactions, *Annu Rev Immunol* 2004, 22: 683-709

- [14] Cobain T, Fresh Blood Product Manufacture, Issue and Use: A Chain of Diminishing Returns?, *Transfusion Medicine Reviews* 2004, 18(4): 279-292
- [15] Cristini V, Computer Modelling of Red Blood Cell Rheology in the Microcirculation: A Brief Overview, *Annals of Biomedical Engineering* 2005; 33: 1.724-1.727
- [16] Culleton B, Impact of anemia on hospitalization and mortality in older adults, *Blood* 2006, 107: 3.841-3.846
- [17] Dzik S, Apoptosis, Transforming growth factor- β , and the immunosuppressive effect of transfusion, *Transfusion* 2002, 42: 1.221-1.223
- [18] Eckstein R, *Immunhämatologie und Transfusionsmedizin* 2001: 80 f
- [19] Ehrly A, *Therapeutische Hämorheologie* 1989
- [20] Ernst E, *Hämorheologie Theorie, Klinik, Therapie* 1989
- [21] Eugster M, The influence of the haematocrit on primary haemostasis in vitro, *Thromb Haemost* 2005, 94(6): 1.213-1.218
- [22] Gafencu A, Investigation of IgG receptors expressed on the surface of human placental endothelial cells, *Placenta* 2003, 24(6): 664-676
- [23] Garraty G, Progress in Modulating the RBC Membrane To Produce Transfusable Universal / Stealth Donor RBCs, *Transfusion Medicine Reviews* 2004, 18(4): 245-256
- [24] Ghitescu L, Robert M, Diversity in Unity: the biochemical composition of the endothelial cell surface varies between the vascular beds, *Microsc Res Tech* 2002, 57: 381-389
- [25] Hanigan W, Cold blood and clinical research during World War I, *Mil Med* 1996, 161(7): 392-400
- [26] Hart DN, Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997, 90(9): 3.245-3.287
- [27] Hess J, An update on solutions for red cell storage, *Vox sang* 2006, 49(2): 86-91
- [28] Hessel E, Cell surface alterations during blood-storage characterized by artificial aggregation of washed red blood cells, *Vox sang* 1985, 49(2): 86-91
- [29] Hick C, *Physiologie* 2000: 16 f

- [30] Hirashima M, Gene-trap expression screening to identify endothelial-specific genes, *Blood* 2004, 104: 711-718
- [31] Hriczenko B, Effect of nitric oxide and nitric oxide donors on red blood cell oxygen transport, *Br J Haematol* 2000, 110(2): 412-419
- [32] Janeway C, Travers P, *Immunologie* 2002
- [33] Kim H, Temporal effect of hemoglobin resuscitation on sepsis survival, *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2004, 32(3): 401-411
- [34] Kriebardis A, Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells, *J Cell Mol Med* 2007, 11(1):148-155
- [35] Latini G, Di-2-ethylhexyl phthalate and endocrine disruption: a review, *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2004, 1: 37-40
- [36] Latini G, Potential hazards of exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate in babies: a review *Biol Neonate* 2000, 78: 269-276
- [37] Löffler G, *Basiswissen Biochemie* 2003
- [38] Luk C, WBC reduction reduces storage-associated RBC adhesion to human vascular endothelial cells under conditions of continuous flow in vitro, *Transfusion* 2003, 43: 151-156
- [39] Marik E, Effect of stored-blood transfusion on oxygen delivery in patients with sepsis, *JAMA* 1993, 269(23): 3.024-3.029
- [40] Marschner J, Oxygen release kinetics in healthy subjects and diabetic patients. I: The role of 2,3-diphosphoglycerate, *Int J Clin Pharmacol Ther* 1994, 32(10): 533-535
- [41] Mollison P, Engelfriet C, Contreras M, *Blood Transfusion in Clinical Medicine*, 1987
- [42] Mueller-Eckhardt C, Kiefel V, *Transfusionsmedizin* 2004: 342
- [43] Myhre B, Preservation of red cell antigens during storage of blood with different anticoagulants, *Transfusion* 1984, 24(6): 499-501
- [44] Neuhof H, Actions and interactions of mediator systems and mediators in the pathogenesis of ARDS and multiorgan failure, *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 1991, 95: 7-13
- [45] Purdy F, Association of mortality with age of blood transfused in septic ICU patients, *Can J Anaesth* 1997, 44(12): 1.256-1.261

- [46] Qiyong P, Bacterial glycosidases for the production of universal red blood cells, *Nat Biotechnol* 2007, 25(4): 454-464
- [47] Raat N, The age of stored red blood cell concentrates at the time of transfusion, *Transfusion Medicine* 2005, 15: 419-423
- [48] Ramakrishnan S, Evaluation of hemorheological risk factor profile in plasmacytoma patients, *Clin Hemorheol Microcirc* 1999, 20(1): 11-19
- [49] Robert C, Interaction of dendritic cells with skin endothelium: A new perspective on immunosurveillance, *J Exp Med* 1999, 189(4): 627-636
- [50] Rohen J-W, Lütje-Drecoll E, *funktionelle Histologie* 2000
- [51] Roseblatt M, Functional Consequences of Immune Cell Adhesion to Endothelial Cells, *Current Pharmaceutical Design* 2004, 10: 109-120
- [52] Rothermel A, Endothelial cells present antigens in vivo, *BMC Immunology* 2004
- [53] Schäfer B, *Immunologie und Immunpathologie* 2002
- [54] Schakel K, A novel dendritic cell population in human blood: one-step immunomagnetic isolation by a specific mAb (M-DC8) and in vitro priming of cytotoxic T lymphocytes, *Eur J Immunol* 1998, 28(12): 4.084-4.093
- [55] Schechter A, Hemoglobin and the Paracrine and Endocrine Functions of Nitric Oxide, *The New England Journal of Medicine* 2003, 348: 1.483-1.485
- [56] Schwender H, Identifying differentially expressed genes with siggenes, 2006: 1-15
- [57] Scott K: Biopreservation of red Blood Cells: Past, Present and Future, *Transfusion Medicine Reviews* 2005, 19: 127-142
- [58] Solomou E, Deficient CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T regulatory cells in acquired aplastic anemia, *Blood* 2007, Apr. 26 (Epub ahead of print)
- [59] Sparrow R, Red blood cell age determines the impact of storage an leukocyte burden on cell adhesion molecules, glycophorin A and the release of annexin V, *Transfus Apher Sci* 2006, 34:15-23
- [60] Stainsby D, 6 Years of shot reporting – its influence on UK blood safety, *Transfus Apher Sci* 2004, 31: 123-131
- [61] Strauss-Ayali D, Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection, *J Leukoc Biol* 2007, May 2 (Epub ahead of print)

-
- [62] Streubel B, Lymphoma-Specific Genetic Aberrations in Microvascular Endothelial Cells in B-Cell Lymphomas, *N Engl J Med* 2004, 351: 250-259
- [63] Sun C, Particulate Nature of Blood Determines Macroscopic Rheology: A 2-D Lattice Boltzmann Analysis, *Biophysical Journal* 2005, 88: 1.635-1.645
- [64] Tinmouth A, The Clinical Consequences of the Red Cell Storage Lesion, *Transfusion Medicine Reviews* 2001, 15(2): 91-107
- [65] Tsai A, Microvascular perfusion upon exchange transfusion with stored red blood cells in normovolemic anemic conditions, *Transfusion* 2004, 44(11): 1.626-1.634
- [66] Vorstand und wissenschaftlicher Beirat der Bundesärztekammer: Leitlinien zu Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten, 2003: 7 ff
- [67] Zheng L, Competitive control of independent programs of tumor necrosis factor receptor-induced cell death by TRADD and RIP1, *Mol Cell Biol* 2006, 26(9):3.505-3.513