

**Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Transfusionsmedizin
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
- Direktor Univ.-Prof. Dr. Dr. Sibrowski -**

**Erythrozytäre Blutgruppen-Polymorphismen – Pathogenetisch relevanter
Faktor für mikrovaskuläre inflammatorische Prozesse? Pilotstudie am
Modell des mikroangiopathischen Schlaganfalls**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Riedl-Seifert, Teresa
aus Kassel

2011

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität

Dekan: Univ. - Prof. Dr. med. Schmitz

1. Berichterstatter: Univ. - Prof. Dr. Dr. med. Sibrowski
2. Berichterstatter: PD. Dr. med. Cassens

Tag der mündlichen Prüfung 23.03.2011

**Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Transfusionsmedizin der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
- Direktor Univ.-Prof. Dr. Dr. Sibrowski –
Referent: Univ. - Prof. Dr. Dr. med. Sibrowski
Coreferent: PD Dr. med. Cassens**

ZUSAMMENFASSUNG

Erythrozytäre Blutgruppen-Polymorphismen – Pathogenetisch relevanter Faktor für mikrovaskuläre inflammatorische Prozesse? Pilotstudie am Modell des mikroangiopathischen Schlaganfalls

Riedl-Seifert, Teresa

Aktuelle Forschungen zeigen zunehmend, dass erythrozytäre immunogene Polymorphismen, die als Blutgruppenantigene bei der Auswahl von Erythrozytenkonzentraten zur Transfusion eine wichtige Rolle spielen, auch funktionell bei Zell-Zell Interaktionen und bei Entzündungsreaktionen relevant sein können. Soweit die Funktionen bisher bekannt sind, fungieren einige der Blutgruppen-Antigene als Immunmediatoren, Chemokinrezeptoren oder Adhäsionsmoleküle. Die Expression bestimmter Blutgruppen-Polymorphismen könnte daher pathogenetisch relevanter Faktor für mikrovaskuläre inflammatorische Prozesse sein. Am Modell des mikroangiopathischen Schlaganfalls, dem pathogenetisch eine zerebrale Mikroangiopathie mit entzündlicher Komponente zu Grunde liegt, wurde in der vorgelegten Arbeit als Pilotprojekt die Allelverteilung definierter erythrozytärer Blutgruppen-Polymorphismen mit bekannter immunologischer Funktion im Vergleich zur Allelverteilung bei gesunden Probanden untersucht.

Zur Klärung der Fragestellung wurden im vorliegenden Pilotprojekt DNA Proben von 76 Patienten mit mikroangiopathischem Schlaganfall aus dem westfälischen Schlaganfallregister im Hinblick auf die Allelverteilung definierter erythrozytärer Blutgruppen-Polymorphismen untersucht. Die Ergebnisse wurden mit den Typisierungsergebnissen eines gesunden Probandenkollektivs verglichen. Als Kontrollkollektiv wurden gesunde Blutspender der Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Münster untersucht. Die folgenden Blutgruppen-Polymorphismen wurden untersucht: Duffy (FY), Indian (IN), Cromer (CROM), Lutheran (LU) sowie das Protein CD47. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR-SSP, zur Visualisierung der Amplifikate wurde eine horizontale Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels Kreuztabelle und Fisher Exakt Test.

Für die Polymorphismen in den Blutgruppenantigenensystemen Indian (IN), Cromer (CROM), Lutheran (LU) sowie für das Protein CD47 ergaben sich für das, in diesen Pilotprojekteingesetzten Patientenkollektivs, keinen signifikanten Unterschied sowohl in der Genotypverteilung als auch in der Allelverteilung. Anhand des eingesetzten Patientenkollektivs lässt sich jedoch ein Trend mit grenzwertiger statistischer Signifikanz hinsichtlich der Verteilung der Allele, die die Duffy Antigene determinieren, nachweisen: Patienten mit mikroangiopathischem Schlaganfall exprimieren das Duffy A Allel häufiger und das Duffy B Allel weniger häufig im Vergleich zu einem Kollektiv hinsichtlich Alter und Geschlecht gematchter gesunder Probanden (Fisher Exakt Test $p=0,067$).

Die vorgelegte Arbeit stellt in Form eines Pilotprojektes erstmals zur Diskussion, dass erythrozytäre Blutgruppen-Polymorphismen bei der Pathogenese mikroangiopathischer Prozesse Berücksichtigung finden sollten: Das als Rezeptor für proinflammatorische Chemokine sowohl bei der akuten als auch der chronischen Entzündungsreaktion bekannte Duffy Protein zeigt eine andere Allelverteilung bei Patienten mit mikroangiopathischem Schlaganfall als bei einem gesunden Kontrollkollektiv. Diese Patienten weisen das FYB Allel seltener auf als gesunde Probanden. Eine unterschiedliche Funktion z.B. in Form einer sich unterscheidenden Affinität zu Chemokinen und dadurch geänderten Clearance von proinflammatorischer Chemokine zwischen Duffy A und Duffy B Phänotypen ist bisher in der Literatur nicht beschrieben. Die vorgelegten Daten lassen für weiterführende funktionelle Studien an Untersuchungsmaterial von Patienten mit mikroangiopathischem Schlaganfall die Arbeitshypothese zu, dass eine reduzierte FYB Expression auf Erythrozyten mit einer reduzierten Clearance proinflammatorischer Chemokine und in der Folge mit einer aggravierten Entzündungsreaktion assoziiert ist. Zusammenfassend bietet das vorgelegte Pilotprojekt eine Rationale, Allelverteilung und Expression der Polymorphismen des Duffy Blutgruppensystems bei der Diskussion der Pathogenese mikroangiopathischer Prozesse zukünftig als pathogenetischen Risikofaktor mit einzubeziehen und durch umfangreichere Studien auch unter Berücksichtigung anderer Bevölkerungspopulationen abzusichern, nicht zuletzt auch im Hinblick auf Optionen der Prävention und Therapie mikrovaskulärer inflammatorischer Prozesse.

1	EINLEITUNG	1
1.1	Blutgruppen-Polymorphismen und ihre funktionelle Bedeutung	1
1.2	Mikroangiopathischer Schlaganfall	9
1.3	Fragestellung der Arbeit:	15
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	Aufbereitung des Probenmaterials	16
2.2	Vorbereitung und Durchführung der PCR	18
2.3	Ergebniserfassung und -auswertung	23
3	ERGEBNISSE	24
3.1	Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system Duffy	24
3.2	Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system Indian 1	25
3.3	Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system Indian 2	27
3.4	Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system Indian 3	29
3.5	Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system Indian 4	31
3.6	Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system Indian 5	33
3.7	Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system Indian 6	35
3.8	Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system CD 47 1	37
3.9	Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system CD 47 2	39
3.10	Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system CD 47 3	41
3.11	Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system Cromer	43
3.12	Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system Lutheran 1	45
3.13	Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system Lutheran 2	47
3.14	Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system Lutheran 3	49
3.15	Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system Lutheran 4	51
3.16	Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system Lutheran 5	53
3.17	Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system Lutheran 6	55
4	DISKUSSION	58
4.1	Einfluss der Expression der Duffy-Proteine auf die Clearance	

	proinflammatorischer Chemokine	58
4.2	Die Bedeutung proinflammatorischer Chemokine für die Entstehung des mikroangiopathischen Schlaganfalls	60
4.3	Die Bedeutung des erythrozytären Duffy Blutgruppenpolymorphismus für mikrovaskuläre inflammatorische Prozesse	61
4.4	Zusammenfassung und Perspektive	61
5	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	63
6	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	64
7	TABELLENVERZEICHNIS	66
8	LITERATURVERZEICHNIS	68

1 Einleitung

1.1 Blutgruppen-Polymorphismen und ihre funktionelle Bedeutung

Erythrozytäre Blutgruppenantigene sind immunogene Polymorphismen der Erythrozytenmembran, die im Regelfall durch die Induktion einer humoralen Immunantwort (Antikörper) gegen den immunogenen Polymorphismus bei Exposition eines für den immunogenen Polymorphismus negativen Probanden nach Kontakt mit Fremdblut entdeckt wurden.

Auf diese Weise wurden zahlreiche erythrozytäre Antigene beschrieben, die Antikörper induzieren können. Sie wurden in unterschiedliche Blutgruppenantigenensysteme zusammengefasst. Viele dieser Antigene sind Teile von Membranglykoproteinen, die nicht nur auf Erythrozyten sondern auch auf anderen Geweben ausgeprägt werden. Den serologisch beschriebenen antigenen Polymorphismen konnten zunehmend auch die korrespondierenden Punktmutationen auf molekularer Ebene zugeordnet werden. Ob diese Punktmutation und die zugehörigen antigenen Polymorphismen allerdings funktionelle physiologische und pathophysiologische Bedeutung haben, ist allenfalls ansatzweise für einzelne Polymorphismen bekannt. Die Membranproteine oder Glykoproteine, die diese antigenen Polymorphismen tragen, haben jedoch sehr vielfältige physiologische Funktionen. Durch Strukturanalysen, Untersuchung von Null-Varianten und Knock-out Tiermodellen konnten in den letzten Jahren diese Funktionen zunehmend verstanden werden. [8,9].

Die Funktion erythrozytärer Membranglykoproteine, die Blutgruppenpolymorphismen tragen, lassen sich nach dem bisherigen Kenntnisstand in fünf verschiedene Kategorien zusammenfassen [17, 96, 97]:

- Rezeptoren für Chemokine, Viren, Parasiten oder Bakterien (Duffy)
- Enzyme
- Adhäsionsmoleküle (Indian, Lutheran, CD47)
- Transportmoleküle und Ionenkanäle
- Strukturproteine der Zellmembran

Diese Einteilung ist nicht endgültig und wird durch neuere Erkenntnisse immer wieder erweitert werden. Manche Proteine erfüllen auch mehrere der genannten Funktionen [9].

In der folgenden Arbeit wurden im Hinblick auf die Fragestellung und ihrer bisher bekannten physiologischen Funktion die folgenden Blutgruppenantigensysteme untersucht: Duffy, Indian, Cromer, Lutheran und CD47.

Diese Blutgruppenantigensysteme sollen nun im Folgenden detaillierter dargestellt werden.

1.1.1 Duffy

1950 wurde erstmals ein bis dahin unbekannter Antikörper im Serum eines mehrfach transfundierten Mr. Duffy gefunden. So wurde dieser neu gefundene Antikörper nach ihm benannt und die letzten beiden Buchstaben seines Namens Fy dienten zur Bezeichnung des korrespondierenden Antigens, Duffy. Der Antikörper wurde als Anti-Fy^a bezeichnet. Ein Jahr später wurde der Anti-Fy^b Antikörper identifiziert. In den folgenden Jahren konnte Dank genauerer Analysemethoden auch die molekulare Struktur des Duffy-Antigens beschrieben werden: Das Duffy Protein wird auf dem Chromosom 1 q22-q23 codiert, als ein relativ kurzes Gen, das aus 1,521 kb besteht und 2 Exons enthält. Das erste Exon ist sehr kurz und codiert nur für die ersten sieben Aminosäuren des Glykoproteins. Es kommt in vier verschiedenen Allel Ausführungen vor: FYA, FYB, FY0 und FYX. FYA und FYB verhalten sich codominant. Die Allele kodieren für fünf verschiedene Phänotypen: Fy^{a+b-}, Fy^{a-b+}, Fy^{a+b+}, Fy^{a-b-} und Fy^{bweak}. Der FYA / FYB Polymorphismus basiert auf einer Punktmutation (single nucleotide polymorphism, SNP), der zu einem Austausch des Nukleotids G gegen A an der Stelle 125 im Exon 2 führt, daraus folgt ein Austausch der Aminosäure Gly durch Asp an der Position 42 der Aminosäuresequenz, welche auf dem N terminalen extrazellulären Ende liegt [86].

Das FY0 Allel kodiert den Fy^{a-b-} Phänotyp. Es entsteht durch eine Mutation des FYB Allels in der GATA box an Position -33. Hier kommt es zum Austausch von T

gegen C. Diese Mutation verhindert eine Transkription des FY Genes in Erythrozyten, nicht aber in anderen Geweben [83, 99].

Die Duffy-Antigene liegen auf einem Glykoprotein, das sieben Transmembrandomänen hat, wie ein G-Protein gebundener Rezeptor. Dieses transmembrane Protein hat neben seiner Antigenen Eigenschaft zwei weitere Bedeutungen: Zum einen dient es auf Erythrozyten als Rezeptor für Plasmodium vivax und Plasmodium knowlesi, was ihm eine zentrale Bedeutung in der Pathogenese der Malaria gibt. Zum anderen ist es ein Rezeptor für Chemokine. Es bindet sowohl CC – Chemokine wie RANTES und MCP-1, als auch CXC – Chemokine z. B. IL8 oder gSA. Daher wurde das Duffy Protein auch als „Duffy Antigen/ Receptor for Chemokines“ (DARC) bezeichnet.

DARC wird auf Erythrozyten, Endothelzellen der post-kapillären Venolen, Purkinje Zellen im Cerebellum und vermutlich auch auf Epithel Zellen in der Niere exprimiert [9].

DARC ist verantwortlich für die Adhäsion von Plasmodium vivax an die Erythrozyten. Die Merozoiten von Plasmodium vivax dringen in die Erythrozyten ein über eine Bindung zwischen DARC auf der Erythrozytenmembran und dem Gegenrezeptor an den Plasmodien (PvDBP). Daher haben Fy(a-b-) Individuen einen Selektionsvorteil in Endemiegebieten der Malaria. So kommt es, dass ca. 95% der Afrikaner in Endemiegebieten den Fy(a-b-) Phänotyp haben und ca. 70% der Afroamerikaner. Die genauen Kopplungswege und Mechanismen der Invasion der Merozoiten in den Erythrozyten sind Gegenstand der Forschung [10].

Anfang 1990 wurde für das Duffyantigen das erste Mal seine Funktion als Chemokinrezeptor (z.B. IL-8) beschrieben. Dem DARC Protein fehlt die Asp-Arg-Tyr Sequenz an der zweiten intrazellulären Schleife, so kommt es nicht wie bei den ähnlich aufgebauten G-gebundenen Proteinen zu einer Signalübertragung. Daher gibt es die Forderung, DARC nicht als Rezeptor zu bezeichnen, sondern als Chemokin - bindendes – Protein [69]. Die Chemokine binden mit einer hohen Affinität an den Rezeptor und werden in die Zelle aufgenommen. So fungieren Erythrozyten als „Sammelbehälter“ für Chemokine und limitieren z.B. die Aktivierung von Neutrophilen durch IL-8. Diese Funktion konnte an Fy^{a-b-} Mäusen nachgewiesen werden, bei denen nach einer intraperitonealen Injektion von

Lipopolysacchariden eine erhöhte Anzahl von Makrophagen und Mastzellen im Gewebe nachgewiesen werden konnte. Dagegen wurden weniger Leukozyten gefunden [21,45]. In einer anderen Untersuchung wurde die Chemokinkonzentration bei Duffy positiven und negativen Personen nach einer Endotoxingabe gemessen. Duffy positive Personen hatten eine signifikant höhere Konzentration von Erythrozyten-gebundenen MCP-1, IL-8 und GRO α [67].

So scheint das DARC Protein eine regulative Funktion im Bereich der Entzündungsreaktion zu haben [61,88].

Für verschiedene Krankheiten bestehen Unterschiede in Häufigkeit, Verlauf und Sterblichkeit der Erkrankung zwischen Afroamerikanern und Amerikanern europäischer Herkunft. Vor dem Hintergrund der Tatsache, dass ca. 95% der Westafrikaner und 70% der Afroamerikaner Duffy negativ sind, im Gegensatz zu der kaukasischen Bevölkerung, wo fast 100% entweder den Duffy A, Duffy B oder Duffy AB Phänotyp besitzen, wird untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen den Krankheiten und der besonderen Verteilung des Duffy Antigen gibt. Für zum Beispiel den Prostata tumor besteht bei Afroamerikanern eine höhere Inzidenz und doppelt so hohe Mortalität im Vergleich zu Amerikanern europäischer Herkunft. Vor diesem klinischen Hintergrund wurde am Tiermodell ein unterschiedlicher Krankheitsverlauf des Prostata tumors bei Duffy positiven und Duffy negativen Mäusen untersucht. Bei den Duffy negativen Mäusen konnte ein signifikant erhöhter Spiegel von angiogenetischen CXC Chemokinen nachgewiesen werden und ein verstärktes Wachstum des Prostata Tumors. Auf diese Weise beeinflusst DARC die Angiogenese in Prostata tumoren [93].

Bei der Übertragung der Daten aus dem Tiermodell auf den Menschen muss allerdings bedacht werden, dass die verwendeten Duffy defizienten Mäuse DARC weder auf den Erythrozyten noch auf anderen Geweben exprimieren. Bei Duffy negativen Menschen DARC nur nicht auf den Erythrozyten exprimiert, allerdings weiterhin auf den Endothelzell.

Es ist weiterhin unklar, wie lange die Erythrozyten die Chemokine binden und ob und wie sie intrazellulär verstoffwechselt werden.

Wie oben dargestellt, scheint das DARC Protein eine Rolle in der Rekrutierung von Leukozyten bei der Entzündung zu haben.

Leukozyten müssen, um den extravasalen Raum der Entzündung zu erreichen, das Endothel passieren. Dafür kommt es zunächst zu einem Rollen entlang der Gefäßwand bis eine feste Adhäsion zwischen Endothelzellen und Leukozyt entsteht. Dieser Vorgang wird über Cytokine induziert. Diese Cytokine entstehen extravasal am Ort der Entzündung und können entweder interzellulär in die Blutbahn diffundieren oder aktiv über venöse Endothelzellen aufgenommen und transzellulär transportiert werden, um luminal präsentiert zu werden. DARC scheint dabei eine Rolle zu spielen und die Chemokine auf der Endotheloberfläche zu präsentieren [60]. Fest an der Oberfläche gebundene Chemokine sind eine Voraussetzung für die Leukozytenadhäsion. So beeinflusst die Expression von DARC auf der Endotheloberfläche die Einwanderung von Leukozyten in entzündetes Gewebe.

1.1.2 Indian Antigen (CD 44)

Das Indian Blutgruppenantigen liegt auf dem CD44 Protein. Das CD44 Gen befindet sich auf Chromosom 11 p13 mit einer Länge von 50 kbp. Es codiert für eine Standardform des Proteins mit einer Länge von 341 Aminosäuren, wobei die Länge des zytoplasmatischen Anteils variieren kann. Das Protein hat eine einzelne Transmembrandomäne mit 21 Aminosäuren. Es gibt einen IN1 / IN2 Polymorphismus, der auf einer Punktmutation von G zu C an der Position 252 in der DNA Sequenz in Exon 2 beruht [86]. Zwei weitere Antigene im Indian Blutgruppensystem konnten vor kurzem identifiziert werden und wurden IN 3 und IN 4 genannt [81]. Daneben gibt es durch alternatives splicing weitere Formen des Moleküls, die aber, soweit bisher bekannt, keine weiteren antigenen Strukturen hervorrufen [92].

Das Protein wird fast auf allen Zellen exprimiert, nicht jedoch auf Thrombozyten, Hepatozyten und Herzmuskelzellen.

Das CD44 Protein hat verschiedene Funktionen.

Es ist ein Rezeptor für Hyaluron, ein Protein der extrazellulären Matrix, das unter anderem in der Grundsubstanz des Bindegewebes enthalten ist [1]. Auch andere Komponenten der extrazellulären Matrix werden gebunden, z.B. Fibronectin,

Kollagen oder Laminin. Epithelzellen nutzen CD44 um sich auf der Basalmembran zu verankern, ebenso wie verschiedene Tumore diesen Rezeptor bei der Metastasierung gebrauchen [5].

Der CD44 Rezeptor spielt auch eine Rolle in Entzündungsprozessen. Es konnte nachgewiesen werden, dass er an der Einwanderung von Leukozyten in entzündetes Gewebe beteiligt ist, indem es die Leukozytenrollen entlang des Endothels vermittelt [80]. Bestimmte Liganden rufen eine Signalkaskade über CD44 hervor, die zur Freisetzung von Cytokinen und T-Zell Aktivierung führt.

So konnte nachgewiesen werden, dass bei Rheumatoider Arthritis die Expression von CD44 in der Synovialis um das Zehnfache erhöht ist im Vergleich zu Synovialisgewebe nach Trauma [43].

In neuesten Studien wurde CD44 als Phagozytoserezeptor beschrieben, über den die Phagozytose auch größerer Partikel vermittelt wird [101].

1.1.3 Cromer (CD55)

Das Cromer Antigen liegt auf dem decay accelerating factor (DAF; CD55), einem Membranglykoprotein mit GPI Anker [95]. Das Protein wird auf dem Chromosom 1 q32 verschlüsselt. Es enthält 11 Exons und hat eine Länge von ca. 40 kbp und ein Gewicht von ca. 70 kDa. Im Cromer Blutgruppensystem wurden bisher zehn verschiedene Antigene beschrieben [18]. Die verschiedenen Antigene beruhen meist auf Punktmutationen in dem Gen. Eine sehr seltene Variante ist der Nullphänotyp des Cromer Blutgruppensystems, der sogenannte Inab Phänotyp. Hierbei kommt es durch zwei Punktmutationen dazu, dass der größte Teil des DAF Proteins fehlt [19,64].

DAF ist ein Mitglied der Familie der komplementregulierenden Proteine (regulators of complement activation; RCA) [63]. Es hemmt die Komplementkaskade, indem es den Zerfall von C3 und C5 Konvertase beschleunigt und den klassischen und alternativen Weg der Komplementaktivierung beeinflusst [65,86]. Auf diese Weise schützt es körpereigenes Gewebe vor einer Schädigung durch das Komplementsystem. Daher kann man DAF auf Zellen finden, die in unmittelbarem Kontakt mit dem Plasma stehen, wie z.B. Erythrozyten, Leukozyten und

Thrombozyten, ebenso auf Endothelzellen und epithelialen Geweben. Die lösliche Form kann im Urin und Plasma nachgewiesen werden. In letzter Zeit konnte auch eine Beeinflussung von T-Zellen über das DAF Protein nachgewiesen werden. Dieser Zusammenhang zwischen Komplementsystem und zellulärer Immunität wird weiter erforscht [44,57].

DAF dient auch als Rezeptor für Bakterien, z.B. Escherichia coli, die das Dr Adhäsionsträger tragen [71] und für verschiedene Enteroviren [2,103].

Bei einer Dysfunktion des DAF auf der Erythrozytenmembran kommt es zu paroxysmaler nächtlicher Hämaturie, weil die Zellen sensitiver für eine Lyse durch das Komplementsystem sind [65].

1.1.4 Lutheran Antigen

Das Lutheran Antigen befindet sich auf zwei Proteinen [77], die durch alternatives splicing aus demselben Gen entstehen [84]. Dieses Gen liegt auf Chromosom 19q13.2- q13.3 mit einer Länge von ca. 12,5 kbp und enthält 15 Exons. Der Unterschied in diesen beiden Proteinen liegt in ihrer Länge des zytoplasmatischen Abschnittes, die extrazellulären Bereiche sind identisch. Das längere Protein wird als Lutheran Glycoprotein (LU) bezeichnet und besteht aus 597 Aminosäuren mit einem Gewicht von 78 kDa. Die kürzere Form heißt „basal cell adhesion molecule (B-CAM), setzt sich aus 557 Aminosäuren zusammen und hat ein Gewicht von 85 kDa [84]. Gemeinsam bilden diese beiden Proteine die CD239 Oberflächenstruktur. Das B-CAM/LU Molekül gehört zu der Gruppe der Immunglobulin –Superfamilien- Proteine (IgSF).

Bisher wurden 19 Antigene im Lutheran Blutgruppensystem entdeckt [16,28].

B-CAM/LU ist weit verbreitet und kommt unter anderem in Herz, Lunge, Leber, Gehirn, Niere und Pankreas vor. Besonders stark ist es unter anderem in den Arterienwänden des Gehirns, der Glomeruli, des Kolons und des Ileums exprimiert [4,78].

Das B-CAM Protein wird vermehrt bei epithelialen Tumoren und Basaliomen produziert [3,91].

Die Funktion von B-CAM/ LU als Lamininrezeptor auf Erythrozyten konnte das erste Mal bei der Sichelzellanämie nachgewiesen werden [100], da bei dieser Krankheit die Erythrozyten B-CAM / LU überexprimieren [107]. Der Rezeptor reagiert nur mit einer Untergruppe des Laminins, das eine 5 α Kette enthält. Dieses Laminin ist ein Hauptbestandteil der subendothelialen extrazellulären Matrix, der epithelialen Basalmembran und der Knochenmarkmatrix. Es scheint zwei unterschiedliche Bereiche des Rezeptors für die Bindung des Laminins zu geben, die unterschiedlich gut gebundenes bzw. gelöstes Laminin erkennen [27,108].

Es gibt Hinweise in verschiedenen Untersuchungen, dass B-CAM / LU bei der Sichelzellerkrankung auch eine Adhäsion zwischen Erythrozyten und Endothel direkt vermitteln kann ohne einen Kontakt zum Laminin [109]. Der Ligand auf der Endothelzelle und die genauen Bindungsverhältnisse sind noch nicht geklärt.

1.1.5 CD47

Das Protein CD47 wird auf dem Chromosom 3 an der Position q13.1-q13.2 verschlüsselt. Es wird zur Gruppe der Immunglobulin Superfamilie gezählt. CD47 ist ein 50kD Transmembranprotein, das einen extrazellulären Anteil mit einer Immunglobulin ähnlichen Domäne hat, fünf transmembrane Abschnitte und einen kurzen zytolplasmatischen Teil. Es gibt vier alternative Splicing-Formen des Proteins, die sich nur durch ihren intrazellulären Teil unterscheiden. Die unterschiedlichen Formen zeigen eine Gewebespezifität [87].

Erst später konnte nachgewiesen werden, dass CD47 identisch ist mit dem integrin associated protein (IAP). Es ist beteiligt an einem intrazellulären Anstieg von Calcium bei einem Kontakt mit der extrazellulären Matrix. Es wird ubiquitär exprimiert, auch auf der Erythrozytenmembran, die kein Integrin enthält. Auf Rh(null) Erythrozyten allerdings ist es nur vermindert exprimiert [62]. IAP, welches die zellbindende Domäne von Thrombospondin erkennt [36], aktiviert Thrombozyten [12], T-Zellen [98] und Neutrophile. Auf Thrombozyten verstärkt es die Adhäsion der Thrombozyten über eine G-Protein gebundene Signalübertragung [12,13]. Die Expression von CD47 auf der Oberfläche schützt die Erythrozyten vor dem Abbau durch Makrophagen in der Milz. Mit

zunehmendem Alter nimmt die Oberflächendichte von CD47 auf den Erythrozyten ab. Die Erythrozyten werden von den Makrophagen in der Milz nicht mehr als autologe Zellen erkannt und daher sukzessive eliminiert [56,75]. Für CD47 konnte somit nachgewiesen werden, dass es als „marker of self“ dem Immunsystem als Erkennungsstruktur für körpereigenes Gewebe dient [56].

Ein wichtiger Ligand für CD47 ist SIRP α (Signal regulatory protein). SIRP α gehört ebenso zu der Gruppe der Immunglobulin Superfamilie. Die Interaktion dieser beiden Proteine miteinander spielt eine wichtige Rolle für die Neutrophilen- und Monozytenmigration [22], für die Erkennung von apoptotischen Zellen durch Makrophagen [35], für die T-Zell Funktion [58] und für die Fusion von Makrophagen zu multinukleären Riesenzellen [39].

Bei der Sichelzell-Erkrankung wurde festgestellt, dass die Erythrozyten an Thrombospondin haften. Thrombospondin ist ein Glykoprotein, das zu den Adhäsionsproteinen zählt. Es kommt sowohl gelöst im Plasma als auch auf der Oberfläche von Thrombozyten und in der extrazellulären Matrix vor [54]. Thrombospondin-1 kann die über NO induzierte Relaxation von glatten Muskelzellen blocken, über eine Bindung mit CD47 [50,51]. So spielt Thrombospondin und sein Rezeptor CD47 eine Rolle in der Regulation des Blutflusses. Besonders bei arteriosklerotischen Gefäßen konnte das Outcome nach Ischämie verbessert werden durch Beeinflussung des TSP-1/ CD47 Komplexes [52].

1.2 Mikroangiopathischer Schlaganfall

1.2.1 Pathogenese des mikroangiopathischen Schlaganfalls

Als Mikrogefäße werden im Bereich des zerebralen Flussgebietes präkapilläre Arteriolen, Kapillaren und postkapilläre Arteriolen bezeichnet. Sie sind über ihren Durchmesser kleiner als 100 μ m definiert. Diese Gefäße weisen drei besondere Merkmale auf:

1. Die Kapillarendothelien in den zerebralen Gefäßen sind durch so genannte „tight junctions“ miteinander verbunden. Diese stellen eine

Permeabilitätsschranke dar und bilden so einen wichtigen Teil der Blut-Hirn-Schranke.

2. Die Basalmembran unter dem Endothel ist sehr dicht und dick. Sie besteht hauptsächlich aus Laminin und Kollagen Typ IV und ist Teil der extrazellulären Matrix.
3. Direkt an die Basalmembran des Endothels angrenzend liegt die Basalmembran der Glia limitans perivascularis, die aus Astrozytenfortsätzen gebildet wird. Über diese Verbindung kommt es zu einer interzellulären Signalübertragung.

Diese Komponenten bilden zusammen die Blut-Hirn-Schranke, über die es nur zu einem selektiven Stofftransport kommt. Die Entwicklung der „tight junctions“ wird durch die Anwesenheit der Astrozyten induziert, ebenso wie spezielle antigene Eigenschaften [49].

Durch diese enge Verbindung der einzelnen Komponenten kommt es zu einer Kommunikation zwischen Endothelzellen und Astrozyten. So kann der Blutfluss an die metabolischen Bedürfnisse des neuronalen Parenchyms angepasst werden [79]. Die Endothelzellen zeigen eine Spezialisierung entlang des mikrovaskulären Verlaufes. Die Anzahl der Aminosäure- und Glukose-Transporter variiert mit dem Durchmesser der Gefäße [68]. Rezeptoren für die Adhäsion und Invasion von Leukozyten sind hauptsächlich in den postkapillären Venolen exprimiert [23].

1.2.2 Mikrocirculation und Hämorrheologie

Die Mikrocirculation hat ihre physiologische Bedeutung in dem Transport von Sauerstoff und Nährstoffen zu dem Gewebe hin und Abtransport von Stoffwechselprodukten. Daneben kommt ihr eine zentrale Bedeutung zu bei der Regulation von Entzündungsprozessen. Während bei größeren Gefäßen die Fließeigenschaften des Blutes nach dem Hagen-Poiseulle`schen Gesetz beschrieben werden können, müssen mit abnehmendem Durchmesser der Gefäße verschiedene andere Effekte mit berücksichtigt werden. So scheint die Viskosität abzunehmen, wenn der Durchmesser unter 1mm beträgt (Fahraeus-

Lindqvist Effekt) [29]. Dieser Effekt hält an bis zu einem Durchmesser von ca. 8 μm , wo der Durchmesser gleich oder kleiner der Größe der Erythrozyten ist. Hier nimmt die Viskosität zu und ist abhängig von der Deformabilität der Erythrozyten. Die Abnahme der Viskosität in dem Bereich zwischen 1mm und 8 μm ist eine Folge der Verlagerung der Erythrozyten in die Mitte des Gefäßes, so dass eine zellfreie Schicht über dem Endothel entsteht.

In den letzten Jahren wurde die Vermutung gestützt, dass es auf der luminalen Seite des Endothel eine oberflächliche Schicht gibt (endothelial surface layer, ESL), die eine Dicke zwischen 0,5 bis 1 μm hat. Die genaue Funktion ist nicht bekannt, aber sie scheint Einfluss auf den mechanischen Stress der Erythrozyten in den Kapillaren, den Sauerstofftransport, die Koagulation und die Autoregulation des Gefäßtonus zu haben [82].

Eine endotheliale Dysfunktion ist Teil in der Pathogenese der Leukenzephalopathie und des mikroangiopathischen Schlaganfalls [66].

1.2.3 Postischämische Veränderungen

Durch eine zerebrale Ischämie werden zum einen das Hirnparenchym und zum anderen das vaskuläre System, insbesondere die Mikrogefäße, geschädigt.

Die Verschlechterung des zerebralen Blutflusses führt zu einer verminderten Zufuhr von Nährstoffen und Sauerstoff, wodurch die nötige Energie fehlt um die Ionengradienten aufrechtzuerhalten. Neurone und Gliazellen depolarisieren und es kommt zu einem Influx von Na^+ und Cl^- . Diesen folgt durch die osmotische Wirkung Wasser. Es entsteht ein Ödem, welches von außen auf die Gefäße drückt und die Perfusion weiter verschlechtert.

Durch die Elektrolytverschiebungen, speziell durch einen Anstieg des second messengers Ca^{2+} kommt es zu einer Initiierung von verschiedenen zytoplasmatischen und nukläeren Vorgängen. Unter anderem werden proteolytische Enzyme aktiviert, die Basalmembranbausteine wie Laminin oder Fibronectin und Kollagen Typ IV in den Mikrogefäßen abbauen. Daraus resultiert eine Blut-Hirn-Schranken Störung, die weiter zu einem Ödem und hämorrhagischen Komplikationen führt [38].

Es konnte gezeigt werden, dass bereits 30 Minuten nach einer Ischämie die Endothelzellen in dem Kapillarbett und die anliegenden Astrozyten anschwellen und somit das freie Lumen in den Kapillaren einschränken. Dies verschlechtert weiter die Perfusion in den betroffenen Gebieten [34].

Von den geschädigten Zellen des Hirnparenchyms werden Entzündungsmediatoren freigesetzt, wie z.B. platelet-activating Faktor, Interleukin 1 β oder tumour necrosis factor α (TNF α) [89]. Diese induzieren schon innerhalb der ersten Stunden nach Ischämiebeginn die Expression von unter anderem P-Selectin, E-Selektin und intercellulare adhesion molecule -1 (ICAM-1) [40,74]. Diese Adhäsionsrezeptoren interagieren mit komplementären Rezeptoren auf der Oberfläche von Neutrophilen und ermöglichen ihre Migration durch das Endothel. Die Neutrophilen sind die erste Population der Leukozyten, die in das infarzierte Gebiet einwandern. Sie setzen dort Entzündungsmediatoren und andere schädliche Substanzen frei [37]. Etwas später folgen auch Makrophagen und Monozyten in das geschädigte Gewebe. Fünf bis sieben Tage nach der Ischämie sind sie die überwiegenden Entzündungszellen dort. Diese Wanderung der Zellen wird über Chemokine, z.B. Interleukin 8 und Monocyte-chemoattractant Protein 1 (MCP-1) geleitet [53,105].

In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass das Infarktvolume n signifikant gemindert werden kann, wenn die Infiltration mit Neutrophilen verhindert wird [6,11,14,15,33,106].

1.2.4 Mikroangiopathie und mikroangiopathischer Schlaganfall

Die zerebrale Mikroangiopathie bildet eine eigene Untergruppe der ischämischen Schlaganfall Erkrankung im Rahmen der TOAST (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment) Klassifikation [41]. Sie verursacht ca. 25% der klinisch symptomatischen zerebralen ischämischen Insulte und ist die häufigste Ursache des vaskulär bedingten kognitiven Abbaus bis hin zur Demenz [73,90]. Klinisch kann die zerebrale Mikroangiopathie Verhaltensauffälligkeiten und neurologische Ausfälle verursachen. Häufig bleibt sie aber unerkant und ist nur über eine

zerebrale Bildgebung nachweisbar. Mit dem Alter steigt die Anzahl an klinisch unauffälligen Patienten unter der Bevölkerung mit radiologisch nachweisbaren Läsionen.

Schon früh wurden zwei unterschiedliche Formen aufgrund von neuropathologischen Studien vermutet [31], die mittlerweile auch durch die Bildgebung unterschieden werden können:

Zum einen sind die größeren perforierenden Arterien betroffen mit einem Durchmesser von 0,2 mm – 0,8 mm, wodurch einzelne größere lakunäre Infarkte hervorgerufen werden. Zum anderen gibt es eine diffusere Beteiligung der kleinsten perforierenden Arterien mit einem Durchmesser von 0,04 mm- 0,2 mm, die zu multiplen kleineren lakunären Infarkten führen. Diese Form führt außerdem zu einer flächigen chronischen Ischämie, die im CT und MRT nachweisbar ist und als Leukenzephalopathie bezeichnet wird. Neuropathologisch lässt sich in diesen Gebieten eine Gliosis und Demyelinisierung mit axonalem Verlust nachweisen [31].

Die mikroangiopathische Erkrankung der zerebralen Gefäße unterscheidet sich in ihren Risikofaktoren von der Makroangiopathie. Für Makroangiopathien wurde eine Assoziation mit myokardialem Infarkt, PAVK, Hypercholesterinämie und Rauchen nachgewiesen, für die Mikroangiopathie mit Hypertonie. Auch unter den zwei Subtypen der Mikroangiopathie wurden Unterschiede nachgewiesen. Patienten mit Leukenzephalopathie sind älter und leiden häufiger an Hypertonie. Bei Patienten mit lakunären Infarkten besteht ein Zusammenhang mit Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und Myokardinfarkt [55].

Neben diesen Risikofaktoren scheint es eine genetische Prädisposition für die Leukenzephalopathie zu geben. Es konnte in einer Zwillingsstudie an gesunden männlichen Zwillingen im Alter zwischen 68 und 79 Jahren eine Erblichkeit von 71% nachgewiesen werden [7]. Ebenso wurde eine relative Häufigkeit der zerebralen Mikroangiopathie bei schwarzen Patienten gefunden, die sich bisher nicht durch Umweltbedingungen erklären ließ [48].

Die Pathogenese der Erkrankung ist nicht vollständig aufgeklärt. Verschiedene Faktoren werden diskutiert, die einzeln oder in Kombination zu der Mikroangiopathie führen. Dazu zählen eine Verdickung der Gefäßwand, Störung

der Blut-Hirn Schranke, Verminderung der Perfusion und eine gestörte Vasomotorik [76].

Eine chronische Hypoperfusion und daraus folgende Ischämie führt zu der Leukenzephalopathie. Eine zentrale Rolle hierbei nimmt wahrscheinlich gerade bei den kleineren Gefäßen eine endotheliale Dysfunktion ein.

Das Endothel der zerebralen Gefäße reguliert über verschiedene Mechanismen den zerebralen Blutfluss und ist Teil der Blut-Hirn-Schranke. Eine wesentliche Steuerung hierfür erfolgt über die NO Freisetzung aus den Endothelzellen. Eine Störung dieser Steuerung führt zu einer verminderten Perfusion der weißen Substanz und einer gestörten Autoregulation [72]. Es konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden, dass diese Funktionen bei der Mikroangiopathie gestört sind. Histopathologisch konnte eine Aktivierung der Endothelzellen nachgewiesen werden, welche zu einer gesteigerten Permeabilität führt und eventuell schädlich auf das Parenchym wirkt. Eine Ischämie der zerebralen Endothelzellen führt zu einer erhöhten Expression und Freisetzung von proinflammatorische Cytokinen und Chemokinen (z.B. Il-1beta, IL-8 und MCP – 1), die wiederum die Adhäsion und Transmigration von Leukozyten hervorrufen [94]. Diese Interaktionen am Endothel der zerebralen Gefäße sind ein wesentlicher Teil in der Pathogenese des Parenchymschadens nach einer zerebralen Ischämie [47]. Es konnte im Tiermodell bei Ratten nachgewiesen werden, dass durch einen Interleukin-8 Rezeptorinhibitor sowohl die Infarktgröße nach einer Ischämie verringert als auch das neurologische Outcome verbessert werden konnte [33,102].

In vivo konnte eine Aktivierung und Schädigung des Endothels bei Patienten mit Mikroangiopathie über eine Erhöhung von bestimmten Plasmamarkern (ICAM1, Thrombomodulin, tissue factor and tissue factor pathway inhibitor) nachgewiesen werden. Hierbei konnte ein Unterschied in der Verteilung zwischen Patienten mit Leukenzephalopathie und einzelnen lakunären Infarkten gesehen werden. Diese Untersuchung legt nahe, dass eine chronische endotheliale Dysfunktion und prothrombotische Veränderungen eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Leukenzephalopathie spielen [42].

1.3 Fragestellung der Arbeit:

Sind erythrozytäre Blutgruppen-Polymorphismen ein pathogenetisch relevanter Faktor für mikrovaskuläre inflammatorische Prozesse?

Zusammenfassend zeigen aktuelle Forschungsergebnisse zunehmend, dass erythrozytäre immunogene Polymorphismen, die als Blutgruppenantigene in der Hämotherapie bei der Auswahl von Erythrozytenkonzentraten zur Transfusion eine wichtige Rolle spielen, auch funktionell bei Zell-Zell Interaktionen und bei Entzündungsreaktionen relevant sein können. Soweit die biologischen Funktionen bisher bekannt sind, fungieren einige der Blutgruppenantigene als Immunmediatoren, Chemokinrezeptoren oder Adhäsionsmoleküle. Die Expression bestimmter Blutgruppen-Polymorphismen könnte daher pathogenetisch relevanter Faktor für mikrovaskuläre inflammatorische Prozesse sein. Am Modell des mikroangiopathischen Schlaganfalls, dem pathogenetisch eine zerebrale Mikroangiopathie mit entzündlicher Komponente zu Grunde liegt, wurde in der vorgelegten Arbeit daher in Form eines Pilotprojektes untersucht, ob Patienten eine unterschiedliche Verteilung der Allele definierter erythrozytärer Blutgruppen-Polymorphismen mit bekannter immunologischer Funktion zeigen im Vergleich zu gesunden Probanden. Die folgenden Blutgruppen-Polymorphismen wurden untersucht: Duffy (FY), Indian (IN), Cromer (CROM), Lutheran (LU), sowie das Protein CD47.

2 Material und Methoden

2.1 Aufbereitung des Probenmaterials

2.1.1 Untersuchungsmaterialien

DNA von Patienten mit mikroangiopathischem Schlaganfall wurde in Form einer Kooperation mit der Klinik für Neurologie und dem Institut für Epidemiologie aus dem westfälischen Schlaganfallregister zur Verfügung gestellt. Blutproben für die Kontrollgruppe wurden im Blutspendedienst des Universitätsklinikums Münster von gesunden Spendern im Rahmen einer Blutspende gewonnen. Patientengruppe und anonymisierte Kontrollgruppe wurden nach Altersdurchschnitt und Geschlecht gematcht. Als Teil der Arbeit wurde die DNA aus dem Spenderblut isoliert und deren Konzentration bestimmt. Die einzelnen Protokolle hierzu sind unter 2.1.2 und 2.1.3 aufgeführt.

2.1.2 DNA Extraktion aus Spenderblutproben mittels GenoM – 6 System©

2.1.2.1 Gebrauchsmaterialien

Es wird zum Isolieren das GenoM – 6 System der Firma GenoVision, Wien, Österreich, eingesetzt mit dem dazu gehörenden GenoPrep™ Cartridge B Kit.

2.1.2.2 Reagenzien

350µl Buffycoat aus 10ml EDTA Blut, GenoPrep™ Cartridge B Kit der Firma GenoVision, Wien, Österreich.

2.1.2.3 Magnetpartikel- Isolierungsprinzip

In dem eingesetzten vollautomatischem DNA -Isolierungssystem werden in dem ersten Schritt die Zellen des Buffycoats lysiert. Diesem Lysat werden magnetische Partikel mit einem silikatischen Überzug zugesetzt, an denen die DNA haftet. Diese Partikel mit gebundener DNA werden mittels eines Magneten aus der Lösung gefiltert und dann in mehreren Schritten gewaschen. Die isolierte DNA wird in gereinigtem Wasser gelöst.

2.1.2.4 Durchführung

Das GenoPrep™ Cartridge B Kit wird in den GenoM -6 eingesetzt und mit 350µl des Spenderbuffycoats bestückt. Das vorprogrammierte Protokoll Nr. 2 wird gestartet mit einem Probenvolumen von 350µl und Elutionsvolumen von 200µl. Die DNA wird in 200µl Aqua bidest gelöst.

2.1.3 Messen der DNA Konzentration

2.1.3.1 Gebrauchsmaterialien

Gene Ray UV-Photometer, Biometra ,Göttingen, Deutschland.

2.1.3.2 Reagenzien

Aqua bidest, DNA in unbekannter Konzentration gelöst in Aqua bidest in einer Verdünnung 1:10.

2.1.3.3 Photometrisches Prinzip

Das Photometer wird durch eine Leermessung mit Aqua bidest bei einer Wellenlänge von 260nm geeicht. Die Extinktion einzelnen Spenderproben werden nacheinander bei 260nm und 280nm gemessen, die Ratio 260:280 (optimal: 1,6 - 2,0) berechnet und die Konzentration in ng/µl nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz errechnet.

2.1.4 Aufbereiten der Patientenproben

2.1.4.1 Gebrauchsmaterial

Eppendorf Reaktionsgefäße, 1,5ml Volumen, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, Schüttelgerät, Vortex, Heidolph, Schwabach, Deutschland

2.1.4.2 Reagenzien

DNA von Patienten mit mikroangiopathischem Schlaganfall aus dem westfälischen Schlaganfallregister, isoliert nach Higuchi und amplifiziert mit GenomPhi™ Amplification Kit, Amersham Biosciences, Freiberg, Deutschland; Aqua bidest.

2.1.4.3 Durchführung

Die amplifizierten und kondensierten DNA-Proben aus dem westfälischen Schlaganfallregister wurden mit 10µl Aqua bidest aufgefüllt und geschüttelt. Danach wird die Konzentration gemessen wie in 2.1.3 beschrieben.

2.2 Vorbereitung und Durchführung der PCR

2.2.1 Erstellen eines 2% Agarosegels

2.2.1.1 Gebrauchsmaterialien

Ethidiumbromid (EBr.) gekennzeichnete Arbeitsbereich, EBr. Gekennzeichnetes Becherglas und Messglas, Mikrowelle, Giessstand und Gelkämme, Firma Innotrain, Kronberg, Deutschland.

2.2.1.2 Reagenzien

Agarosegel-Pulver, Firma Innotrain, Kronberg, Deutschland.

Ethidiumbromid 0,07%, Tropfflasche, Firma Innotrain, Kronberg, Deutschland.

TRIS-Borat-EDTA-Puffer 10x (TBE-Puffer) Firma Innotrain, Kronberg, Deutschland.

- 10,78 g (89 mM) TRIS,
- 5,50 g (89 mM) Borsäure und
- 0,58 g (2 mM) EDTA

Aqua dest.

2.2.1.3 Durchführung

Bei der Herstellung spezielle Schutzhandschuhe tragen, nur am dafür gekennzeichneten Arbeitsplatz arbeiten und alle verwendeten Arbeitsgeräte an diesem belassen. Verdünnung des TBE-Puffers auf einfache Konzentration, 100ml TBE-Puffer + 900ml Aqua dest.; 2 gr. Agarosegel-Pulver in einem Becherglas auf 100ml mit einfachem TBE-Puffer auffüllen, die Lösung wird für 2Minuten aufgekocht. Drei Tropfen Ethidiumbromid in die Lösung geben und schwenken. Das flüssige Gel in den vorbereiteten Gießstand geben und die Gelkämme einsetzen. Das Gel bis zum Erstarren ruhen lassen.

2.2.2 Typisierung der Blutgruppen – Allele mittels PCR

2.2.2.1 Gebrauchsmaterialien

Thermocycler, GeneAmp 9600, Applied Biosystems, Foster City, U.S.A.

UV Lampe, Transilluminator TI2, Biometra, Göttingen, Deutschland

Agarose-Gel Siehe 2.5

2.2.2.2 Reagenzien

DNA aus Spenderblutproben siehe 2.1.2

DNA von Schlaganfallpatienten siehe 2.1.4

Taq-Polymerase (5U/μl), Promega, Madison, U.S.A.

Molekulargewichtsmarker, PCR markers, bp 50-1500, Fa. Pel-Freez.

Red-PCR, enthält dNTPs, Puffer, Magnesium, PCR-Verstärker, Innotrain, Kronberg, Deutschland.

PCR-SSP Primermix, enthält sequenzspezifische Primer und als interne Kontrolle das Gen des humanen Wachstumshormons mit einer bestimmten Länge, Zentralinstitut für Bluttransfusion und Immunologische Abteilung, Uniklinik Innsbruck.

Aqua dest

2.2.2.3 PCR-SSP – Prinzip

Die Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR) dient der Vervielfältigung definierter Genabschnitte (Targetsequenz) der DNA, um diese nachweisen zu können. Bei einer SSP (sequence specific priming) wird für jedes einzelne Merkmal ein eigener Ansatz mit allelspezifischen Primern durchgeführt.

Die Reaktion findet im Thermocycler statt, um die bestimmten Temperaturen für die jeweiligen Teilschritte der Reaktion zu gewährleisten. Im ersten Schritt wird die Doppelstrangstruktur der DNA durch Erhitzen auf 94°C aufgelöst - Denaturierung. An die einzelsträngige DNA legen sich nun bei einer Temperatur von 61°C - 65° C die Primer an. Diese definieren den Bereich, der von der Polymerase vervielfältigt werden soll. Im dritten Schritt generiert die hitzestabile Taq-Polymerase bei einer Temperatur von 72°C ab dem Bereich an dem der Primer anliegt einen komplementären DNA Abschnitt. So entsteht ein Doppelstrangstück. Dieser Zyklus wird mehrfach wiederholt, so dass die gesuchte Sequenz in Mehrfachkopie (Amplifikaten) vorliegt.

2.2.2.4 Durchführung

Es werden die Primer, für die in dieser Pilotstudie untersuchten Blutgruppenpolymorphismen bereitgestellt.

Blutgruppensystem	Abkürzung des Polymorphismus	Reference SNP ID (Lage im Gen)	Mut
Lutheran	LW 1	rs5030348 (Intron 1)	G / A
	LW 2	rs5498 (Exon 6)	A / G
	LW 3	rs 281437 (5´-NCR)	C / T
	LW 4	rs 2569693 (3´-NCR)	C / T
	LW 5	rs 281440 (3´-NCR)	G / A
	LW 6	rs 2228615 (Exon 5)	G / A
Cromer	CR 1	rs 1507760 (Intron 6)	C / T
Indian	IN 1	rs 2785172 (Intron 1)	G / A

	IN 2	rs 3794105 (Intron 2)	G / A
	IN 3	rs 7930724 (Intron 5)	A / G
	IN 4	rs 713330 (Intron 9)	C / T
	IN 5	rs 2421826 (Intron 12)	G / A
	IN 6	rs 2295756 (Intron 16)	T / C
CD47	CD471	rs 326341 (5´-NCR)	C / T
	CD472	rs 989305 (Intron 1)	T / A
	CD473	rs3804639 (Intron 2)	C / T
Duffy	Duffy A / B	rs12075 (Exon 2)	G / A
Duffy	Null	rs2814778	T / C

Tabelle 1-1: Untersuchten Blutgruppenpolymorphismen

Die Tabelle bezeichnet die in dieser Arbeit untersuchten Polymorphismen, ihre Identifikationsnummer im NCBI Entrez System und die zu Grunde liegende Punktmutation.

Die einzelnen Tubes werden mit je 1µl des Primermixes befüllt. Es werden parallel mehrere verschiedene Primer für eine DNA Probe angesetzt.

Eine Standardreaktion wird angesetzt mit:

- 1µl Primer-Mix
- 3µl red PCR, Innotrain
- 0,12 µl Taq-Polymerase
- 80 ng DNA (Lösung in Aqua bidest, Volumen abhängig von Konzentration)
- Ad 10 µl Aqua bidest

Die Tubes werden fest verschlossen und in den Thermocycler gestellt und das Programm gestartet.

PCR-Programm

1.	94° C			
	120sec.			
2.	94° C	65°C		10 Zyklen
	10 sec	60 sec		
3.	94°C	61°C	72°C	20 Zyklen
	10 sec.	50 sec.	30sec.	
4.	4°C			
	Unbegrenzt			

Zur Auswertung der PCR werden die Amplifikate mittels Agarose – Gelelektrophorese dargestellt. Herstellung des Gels siehe 2.5.

2.2.2.5 Geldetektions-Prinzip

Die entstandenen Amplifikate werden mittels Agarose-Gelelektrophorese dargestellt und ausgewertet. DNA bewegt sich wegen ihrer negativen Ladung im Spannungsfeld zur Anode. Je nach Größe des Fragments in unterschiedlicher Geschwindigkeit, so kann man DNA Fragmente nach ihrer Größe im elektrischen Feld auftrennen. Ethidiumbromid aus dem Gel lagert sich in die DNA ein und fluoresziert unter UV-Licht. So leuchten die Regionen mit einer hohen DNA Konzentration als Banden unter UV-Bestrahlung auf.

2.2.2.6 Geldetektion Durchführung

Das Gel wird in eine Laufkammer, die mit TBE Puffer gefüllt ist, gesetzt. Es sollte ca. 2mm hoch mit Puffer bedeckt sein. Die erste Tasche jeder Reihe wird mit 8 µl Molekulargewichtsmarker beladen. Pro Geltasche werden je 10 µl Amplifikate aus entsprechenden Tubes pipettiert. Die Kammer wird verschlossen und die Stromquelle angeschlossen. Die Laufzeit beträgt 30 Min bei einer Spannung von 100 Volt.

Anschließend wird das Gel auf die UV-Lampe gelegt und die Banden ausgewertet. Die Dokumentation erfolgt mit Polaroid Photos.

Im Rahmen der Dokumentation zeigte sich erhebliche Verunreinigungen bei einigen der untersuchten Patienten DNA Proben, weshalb diese nicht ausgewertet werden konnten und aus der Studien genommen werden mussten. Damit reduzierte sich die Anzahl der Patientenproben von 103 auf 76.

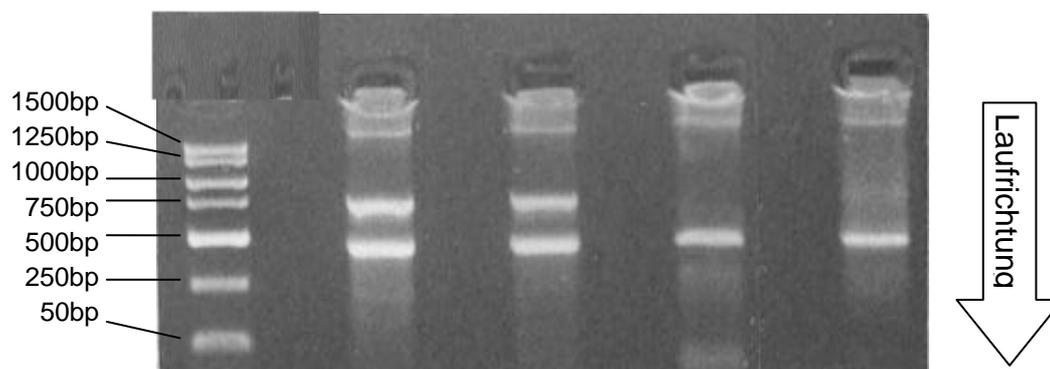


Abbildung 1.1: Beispiel Geldetektion

Auf der Abbildung zu erkennen ist beispielhaft eine PCR –SSP für das Duffy Antigen. In der ersten Spalte ist der Molekulargewichtsmarker aufgetrennt, in der zweiten Spalte ist das PCR-Produkt für den Duffy A Primer gelaufen, in der dritten Spalte für den Duffy B Primer, in der vierten für den Duffy null Primer, in der letzten für den Duffy b weak. Deutlich zu erkennen ist in der 2.-5. Spalte je eine Bande bei ca 430 bp, dies ist die in den PCR Ansätzen enthaltene interne Kontrolle. Es war also DNA in dem Ansatz und die PCR Reaktion ist abgelaufen. Die 2. und 3. Spalte zeigt eine weitere Bande bei ca 700 bp. Hier war die PCR Reaktion positiv für Duffy A und Duffy B. Der getestete Patient besitzt den Genotyp Fy A/ Fy B. Die Reaktionen in der 4. und 5. Spalte hingegen waren negativ.

2.3 Ergebniserfassung und -auswertung

2.3.1 Ergebniserfassung

Die Dokumentation der Einzelergebnisse und Summierung der einzelnen Merkmalsverteilungen fand in Word Excel[®] statt. Zur Berechnung wurden die Daten dann in das Programm SPSS[®] Version 15 von IBM[®] übertragen.

2.3.2 Statistische Auswertung

Die Statistische Auswertung fand im Programm SPSS[®] Version 15 von IBM[®] mit dem Fisher-Exakt Test statt.

3 Ergebnisse

3.1 Genotyp- und Allelverteilung im Antigenensystem Duffy

3.1.1 Genotypverteilung

Die Auswertung der PCR bezüglich des Duffy – Antigens ergab folgende Verteilung der Genotypen.

	Genotyp				
	Fy A / Fy A	Fy B / Fy B	Fy A / Fy B	Fy null	Fy b weak
Patienten n = 76	20	22	34	0	2
Spender n = 103	16	39	48	0	2

Tabelle3-1 Duffy Genotypverteilung

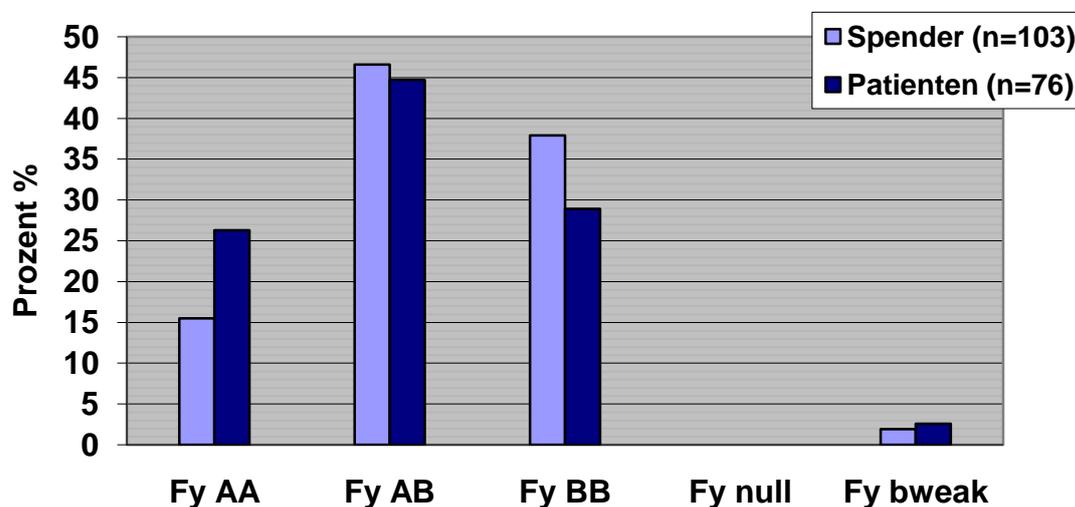


Abbildung 3.1 Duffy Genotypverteilung

In der Abbildung ist die Verteilung der Patienten und Spender Genotypen nebeneinander aufgetragen. Zur besseren Vergleichbarkeit sind hier die prozentualen Verteilungen dargestellt.

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p=0,282$.

3.1.2 Allelverteilung

Aus der Verteilung der Genotypen, ließ sich folgende Allelhäufigkeit berechnen.

	Allel	
	A	B
Patienten	74	78
Spender	80	126

Tabelle 3-2 Duffy Allelverteilung

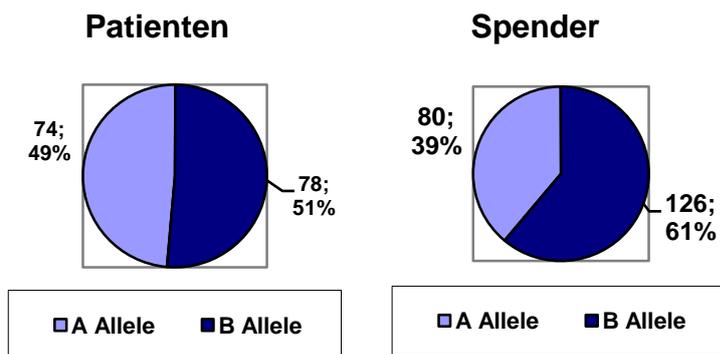


Abbildung 3.2 Duffy Allelverteilung

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p=0,067$.

3.2 Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system Indian 1

3.2.1 Genotypverteilung

Die Auswertung der PCR bezüglich des Indian 1 – Antigens ergab folgende Verteilung der Genotypen.

	Genotyp		
	Indian 1 G / G	Indian 1 G / A	Indian 1 A / A
Patienten n = 76	11	30	35
Spender n = 102	21	43	38

Tabelle 3-3 Indian 1 Genotypverteilung

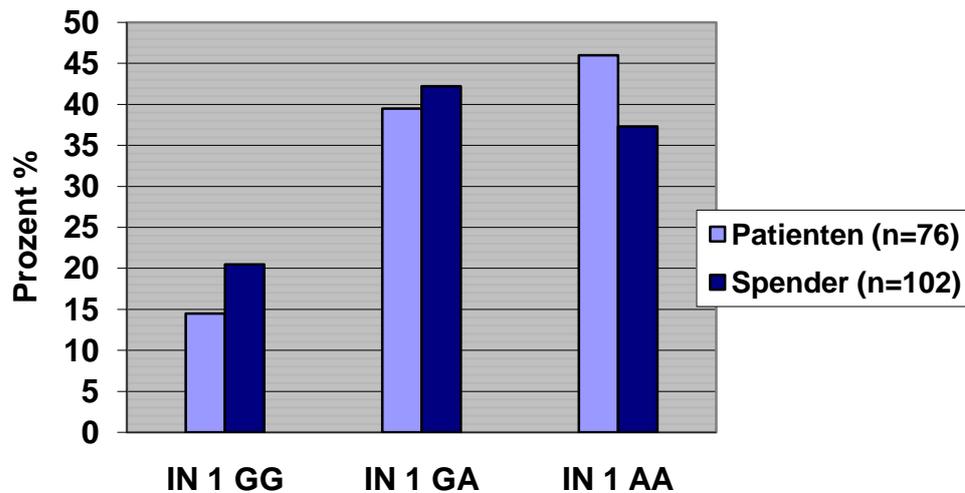


Abbildung 3.3 Indian 1 Genotypverteilung

In der Abbildung ist die Verteilung der Patienten und Spender Genotypen nebeneinander aufgetragen. Zur besseren Vergleichbarkeit sind hier die prozentualen Verteilungen dargestellt.

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p=0,427$.

3.2.2 Allelverteilung

Aus der Verteilung der Genotypen, ließ sich folgende Allelhäufigkeit berechnen.

	Allel	
	G	A
Patienten	52	100
Spender	85	119

Tabelle 3-4 Indian 1 Allelverteilung

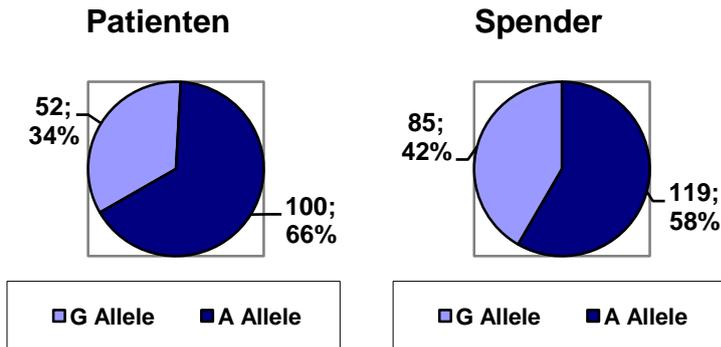


Abbildung 3.4 Indian 1 Allelverteilung

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p=0,186$.

3.3 Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system Indian 2

3.3.1 Genotypverteilung

Die Auswertung der PCR bezüglich des Indian 2 – Antigens ergab folgende Verteilung der Genotypen.

	Genotyp		
	Indian 2 G / G	Indian 2 G / A	Indian 2 A / A
Patienten n = 76	52	23	1
Spender n = 102	75	26	1

Tabelle 3-5 Indian 2 Genotypverteilung

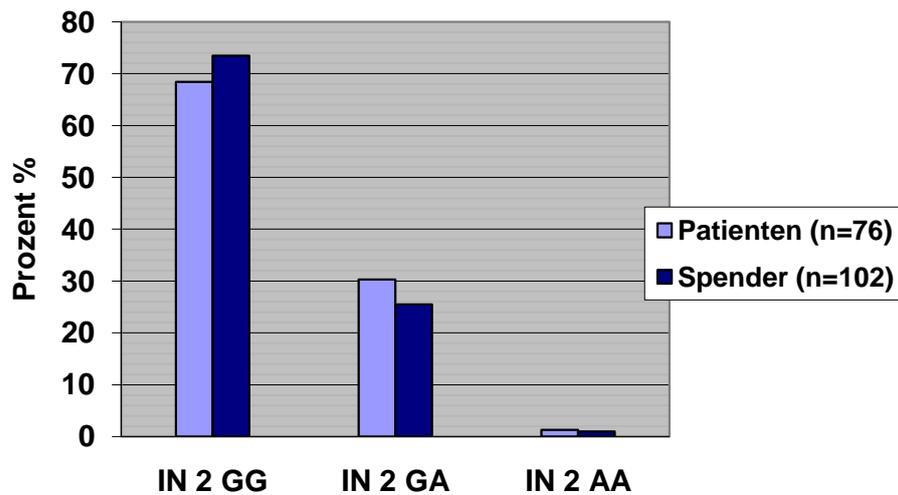


Abbildung 3.5 Indian 2 Genotypverteilung

In der Abbildung ist die Verteilung der Patienten und Spender Genotypen nebeneinander aufgetragen. Zur besseren Vergleichbarkeit sind hier die prozentualen Verteilungen dargestellt.

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p=0,754$.

3.3.2 Allelverteilung

Aus der Verteilung der Genotypen, ließ sich folgende Allelhäufigkeit berechnen.

	Allel	
	G	A
Patienten	127	25
Spender	176	28

Tabelle 3-6 Indian 2 Allelverteilung

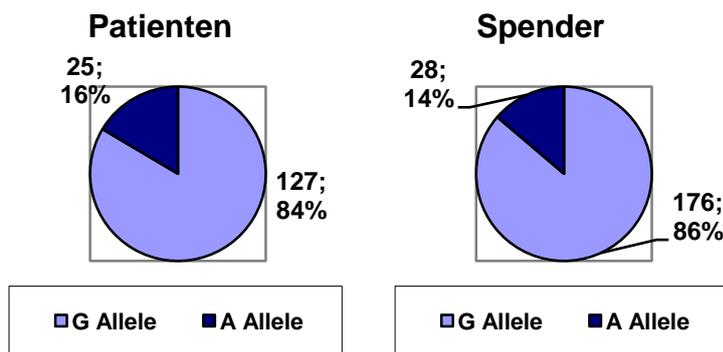


Abbildung 3.6 Indian 2 Allelverteilung

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p=0,548$.

3.4 Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system Indian 3

3.4.1 Genotypverteilung

Die Auswertung der PCR bezüglich des Indian 3 – Antigens ergab folgende Verteilung der Genotypen.

	Genotyp		
	Indian 3 A / A	Indian 3 G / A	Indian 3 G / G
Patienten n = 76	5	34	37
Spender n = 102	9	42	51

Tabelle 3-7 Indian 3 Genotypverteilung

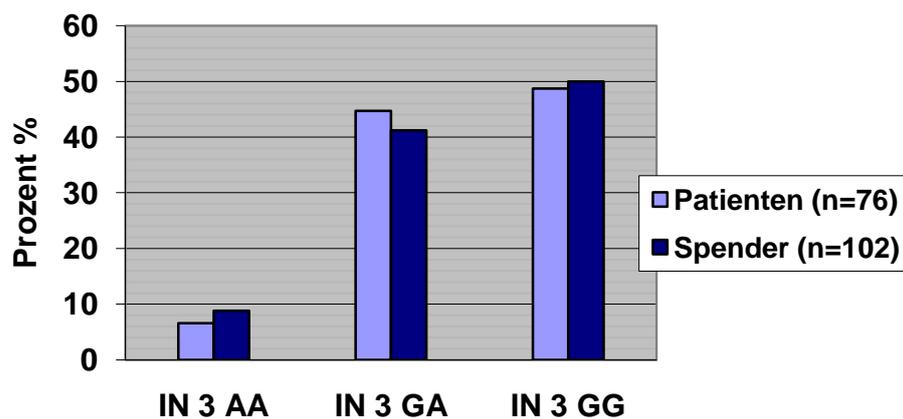


Abbildung 3.7 Indian 3 Genotypverteilung

In der Abbildung ist die Verteilung der Patienten und Spender Genotypen nebeneinander aufgetragen. Zur besseren Vergleichbarkeit sind hier die prozentualen Verteilungen dargestellt.

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p = 0,807$.

3.4.2 Allelverteilung

Aus der Verteilung der Genotypen, ließ sich folgende Allelhäufigkeit berechnen.

	Allel	
	G	A
Patienten	108	44
Spender	144	60

Tabelle 3-8 Indian 3 Allelverteilung

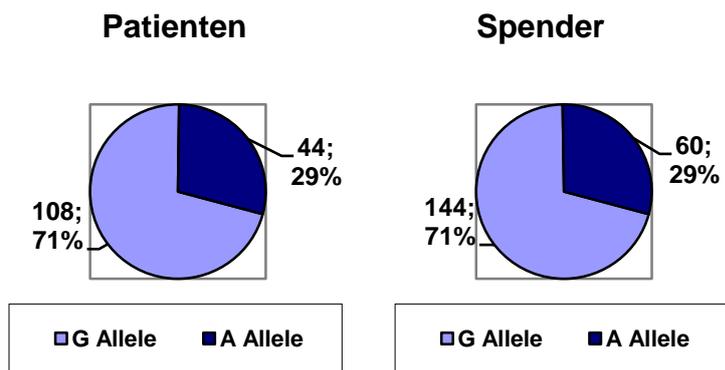


Abbildung 3.8 Indian 3 Allelverteilung

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p > 0,999$.

3.5 Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system Indian 4

3.5.1 Genotypverteilung

Die Auswertung der PCR bezüglich des Indian 4 – Antigens ergab folgende Verteilung der Genotypen.

	Genotyp		
	Indian 4 C / C	Indian 4 C / T	Indian 4 T / T
Patienten n = 76	9	34	33
Spender n = 102	14	51	37

Tabelle 3-9 Indian 4 Genotypverteilung

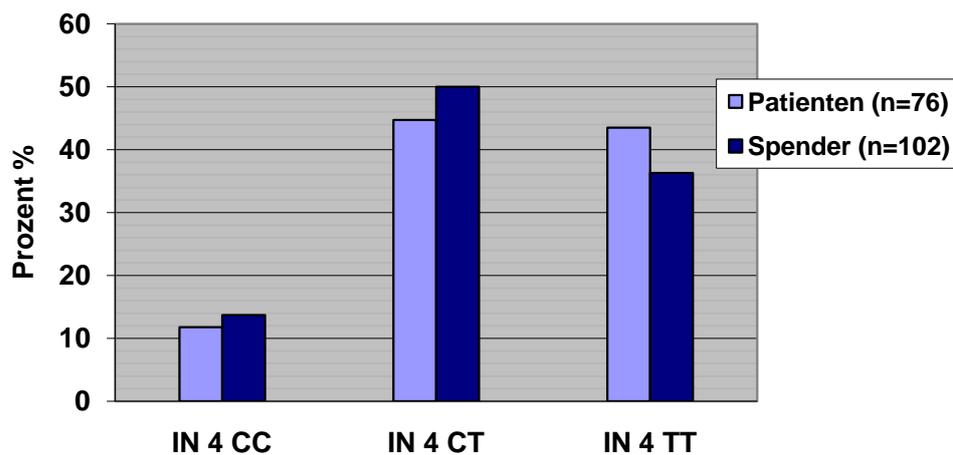


Abbildung 3.9 Indian 4 Genotypverteilung

In der Abbildung ist die Verteilung der Patienten und Spender Genotypen nebeneinander aufgetragen. Zur besseren vergleichbarkeit sind hier die prozentualen Verteilungen dargestellt.

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p=0,645$.

3.5.2 Allelverteilung

Aus der Verteilung der Genotypen, ließ sich folgende Allelhäufigkeit berechnen.

	Allel	
	C	T
Patienten	52	100
Spender	79	125

Tabelle 3-10 Indian 4 Allelverteilung

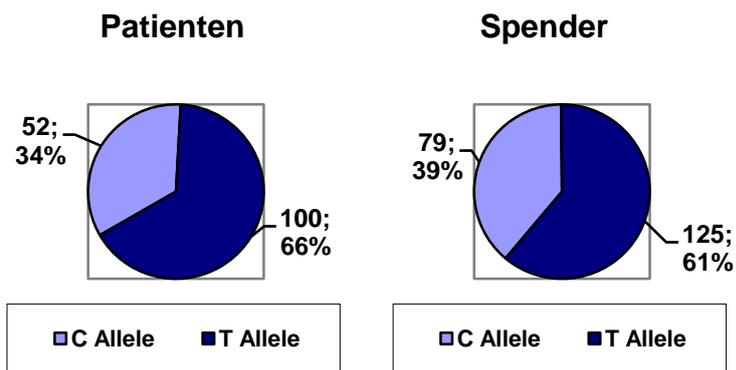


Abbildung 3.10 Indian 4 Allelverteilung

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p=0,437$.

3.6 Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system Indian 5

3.6.1 Genotypverteilung

Die Auswertung der PCR bezüglich des Indian 5 – Antigens ergab folgende Verteilung der Genotypen.

	Genotyp		
	Indian 5 G / G	Indian 5 G / A	Indian 5 A / A
Patienten n = 76	11	37	28
Spender n = 102	19	42	41

Tabelle 3-11 Indian 5 Genotypverteilung

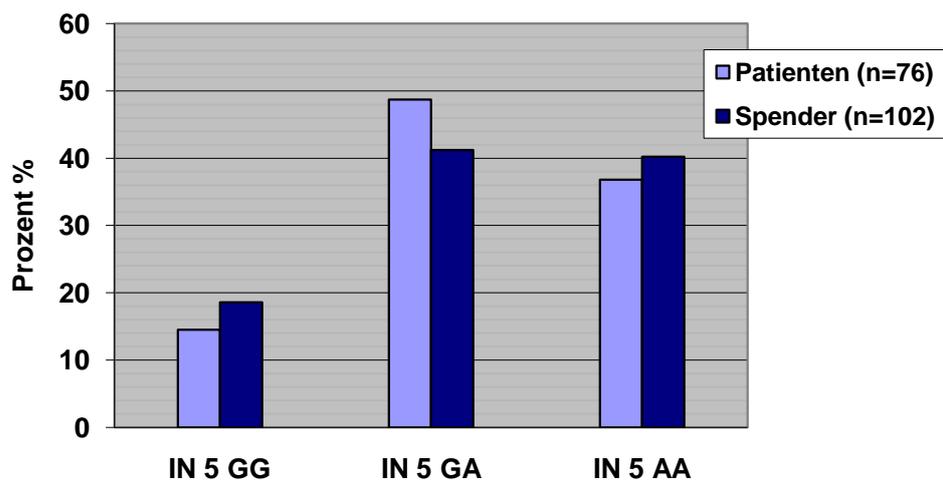


Abbildung 3.11 Indian 5 Genotypverteilung

In der Abbildung ist die Verteilung der Patienten und Spender Genotypen nebeneinander aufgetragen. Zur besseren Vergleichbarkeit sind hier die prozentualen Verteilungen dargestellt.

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p=0,588$.

3.6.2 Allelverteilung

Aus der Verteilung der Genotypen, ließ sich folgende Allelhäufigkeit berechnen.

	Allel	
	G	A
Patienten	59	93
Spender	80	124

Tabelle 3-12 Indian 5 Allelverteilung

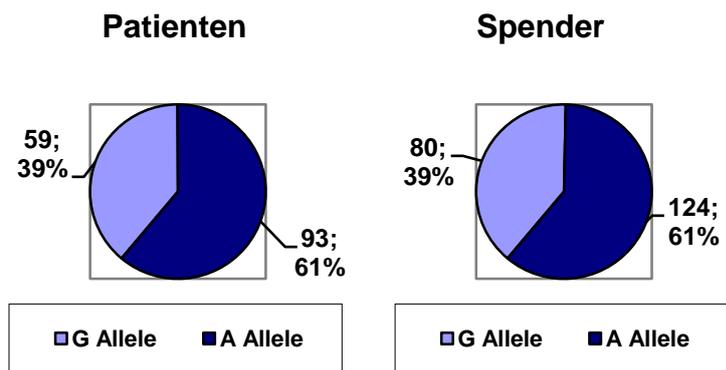


Abbildung 3.12 Indian 5 Allelverteilung

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p > 0,999$.

3.7 Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system Indian 6

3.7.1 Genotypverteilung

Die Auswertung der PCR bezüglich des Indian 6 – Antigens ergab folgende Verteilung der Genotypen.

	Genotyp		
	Indian 6 T / T	Indian 6 T / C	Indian 6 C / C
Patienten n = 76	26	38	12
Spender n = 102	37	44	21

Tabelle 3-13 Indian 6 Genotypverteilung

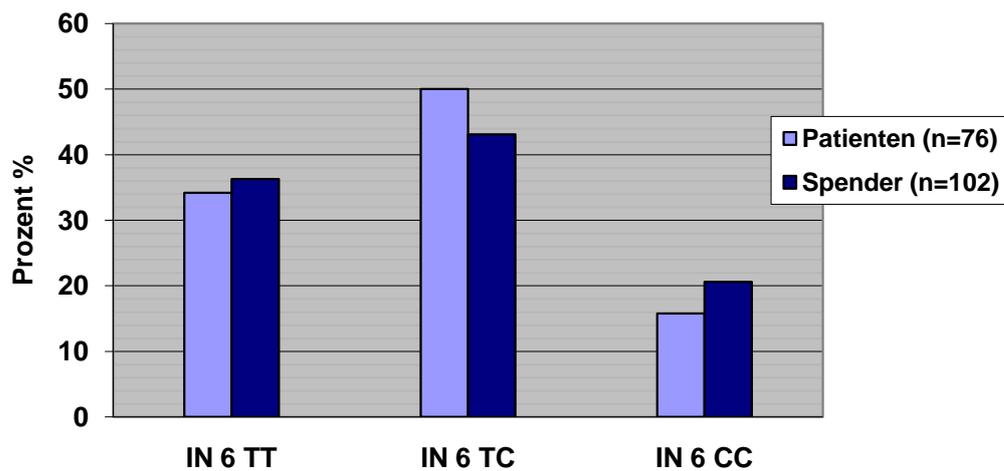


Abbildung 3.13 Indian 6 Genotypverteilung

In der Abbildung ist die Verteilung der Patienten und Spender Genotypen nebeneinander aufgetragen. Zur besseren Vergleichbarkeit sind hier die prozentualen Verteilungen dargestellt.

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p=0,595$.

3.7.2 Allelverteilung

Aus der Verteilung der Genotypen, ließ sich folgende Allelhäufigkeit berechnen.

	Allel	
	C	T
Patienten	62	90
Spender	86	118

Tabelle 3-14 Indian 6 Allelverteilung

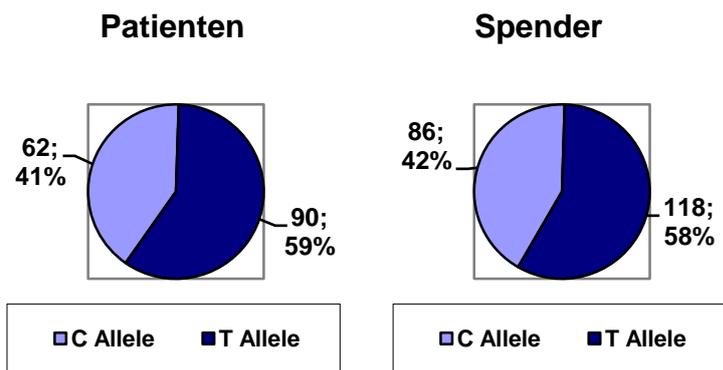


Abbildung 3.14 Indian 6 Allelverteilung

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p=0,828$.

3.8 Genotyp- und Allelverteilung im Antigenensystem CD 47 1

3.8.1 Genotypverteilung

Die Auswertung der PCR bezüglich des CD47 1 – Antigens ergab folgende Verteilung der Genotypen.

	Genotyp		
	CD47 1 C / C	CD47 1 C / T	CD47 1 T / T
Patienten n = 76	21	46	9
Spender n = 102	32	56	14

Tabelle 3-15 CD47 1 Genotypverteilung

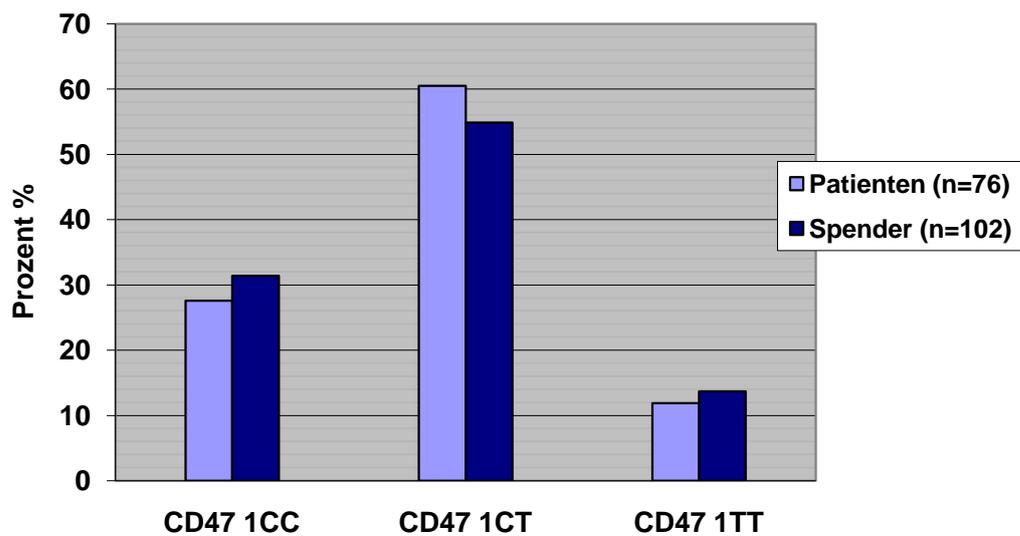


Abbildung 3.15 CD47 1 Genotypverteilung

In der Abbildung ist die Verteilung der Patienten und Spender Genotypen nebeneinander aufgetragen. Zur besseren Vergleichbarkeit sind hier die prozentualen Verteilungen dargestellt.

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p=0,784$.

3.8.2 Allelverteilung

Aus der Verteilung der Genotypen, ließ sich folgende Allelhäufigkeit berechnen.

	Allel	
	C	T
Patienten	88	64
Spender	120	84

Tabelle 3-16 CD47 1 Allelverteilung

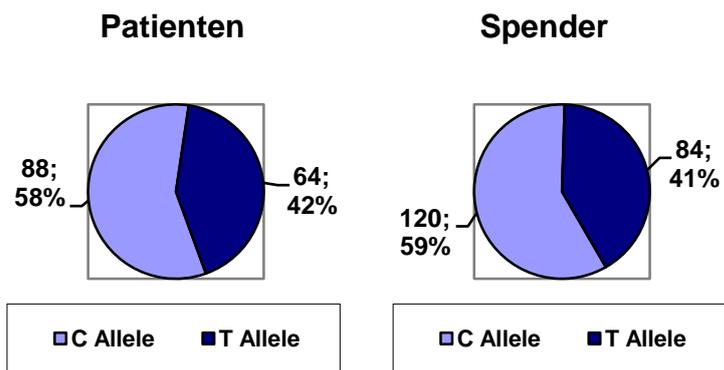


Abbildung 3.16 CD47 1 Allelverteilung

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p=0,914$.

3.9 Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system CD 47 2

3.9.1 Genotypverteilung

Die Auswertung der PCR bezüglich des CD47 2 – Antigens ergab folgende Verteilung der Genotypen.

	Genotyp		
	CD47 2 T / T	CD47 2 T / A	CD47 2 A / A
Patienten n = 76	24	43	9
Spender n = 102	26	62	14

Tabelle 3-17 CD47 2 Genotypverteilung

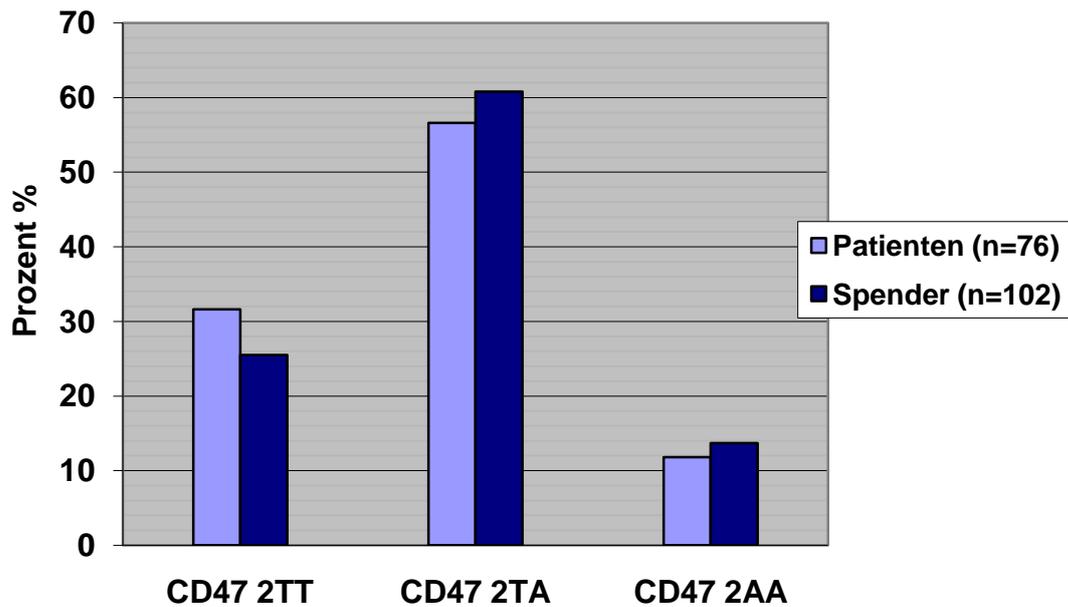


Abbildung 3.17 CD47 2 Allelverteilung

In der Abbildung ist die Verteilung der Patienten und Spender Genotypen nebeneinander aufgetragen. Zur besseren Vergleichbarkeit sind hier die prozentualen Verteilungen dargestellt.

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p=0,659$.

3.9.2 Allelverteilung

Aus der Verteilung der Genotypen, ließ sich folgende Allelhäufigkeit berechnen.

	Allel	
	A	T
Patienten	61	91
Spender	90	114

Tabelle 3-18 CD47 2 Allelverteilung

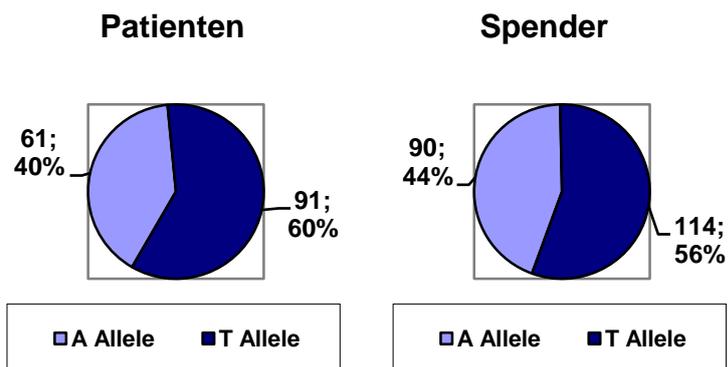


Abbildung 3.18 CD47 2 Allelverteilung

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p=0,516$.

3.10 Genotyp- und Allelverteilung im Antigenensystem CD 47 3

3.10.1 Genotypverteilung

Die Auswertung der PCR bezüglich des CD47 3 – Antigens ergab folgende Verteilung der Genotypen.

	Genotyp		
	CD47 3 C / C	CD47 3 C / T	CD47 3 T / T
Patienten n = 76	32	41	3
Spender n = 102	39	57	6

Tabelle 3-19 CD47 3 Genotypverteilung

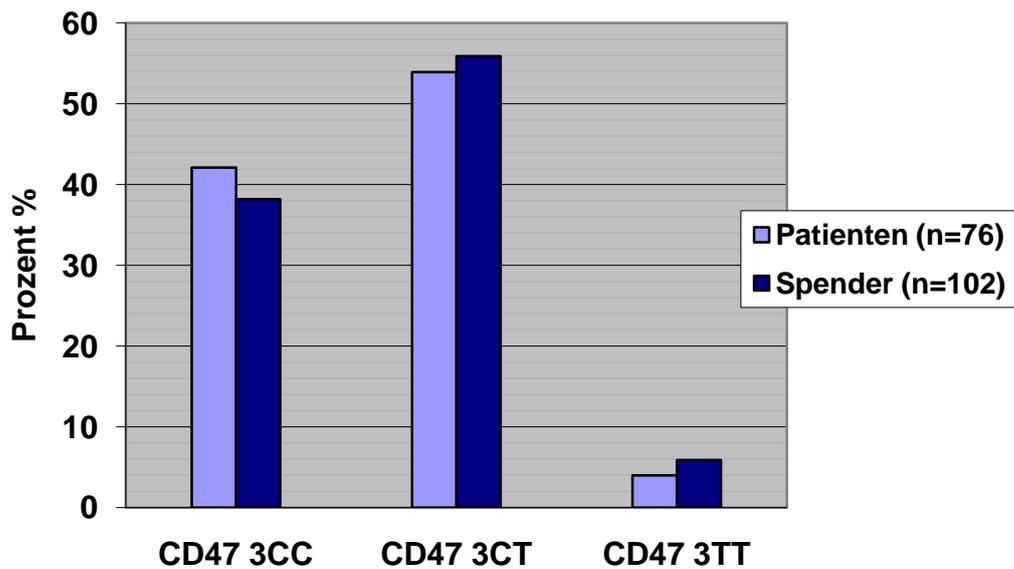


Abbildung 3.19 CD47 3 Genotypverteilung

In der Abbildung ist die Verteilung der Patienten und Spender Genotypen nebeneinander aufgetragen. Zur besseren Vergleichbarkeit sind hier die prozentualen Verteilungen dargestellt.

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p=0,817$.

3.10.2 Allelverteilung

Aus der Verteilung der Genotypen, ließ sich folgende Allelhäufigkeit berechnen.

	Allel	
	C	T
Patienten	105	47
Spender	135	69

Tabelle 3-20 CD47 3 Allelverteilung

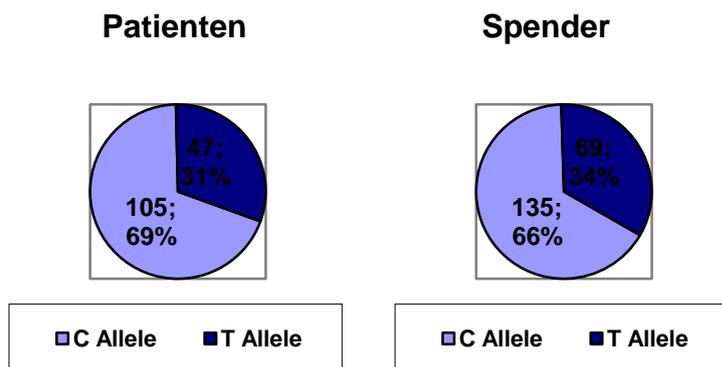


Abbildung 3.20 CD47 3 Allelverteilung

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p=0,570$.

3.11 Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system Cromer

3.11.1 Genotypverteilung

Die Auswertung der PCR bezüglich des Cromer – Antigens ergab folgende Verteilung der Genotypen.

	Genotyp		
	Cromer C / C	Cromer C / T	Cromer T / T
Patienten n = 76	9	36	31
Spender n = 91	11	41	39

Tabelle 3-21 Cromer Genotypverteilung

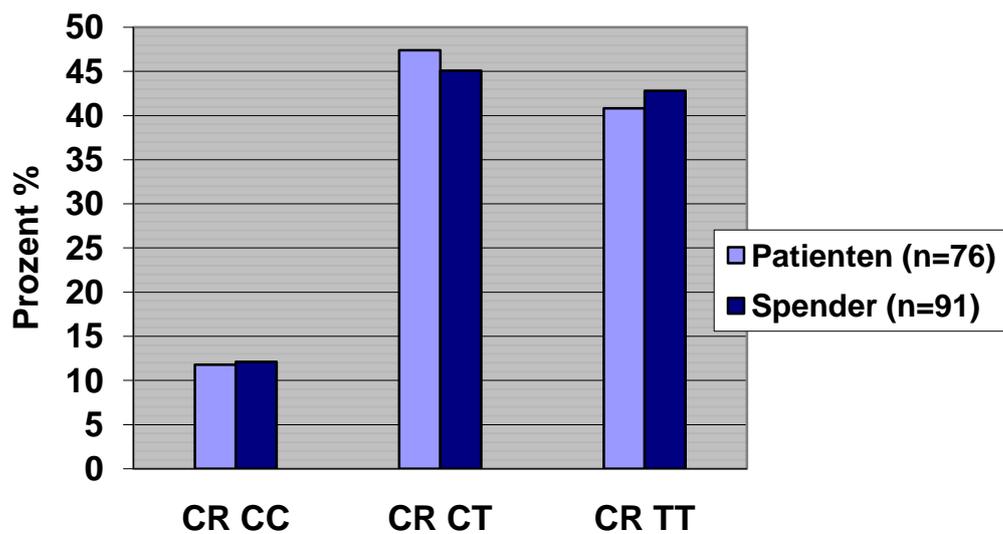


Abbildung 3.21 Cromer Genotypverteilung

In der Abbildung ist die Verteilung der Patienten und Spender Genotypen nebeneinander aufgetragen. Zur besseren Vergleichbarkeit sind hier die prozentualen Verteilungen dargestellt.

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p = 0,975$.

3.11.2 Allelverteilung

Aus der Verteilung der Genotypen, ließ sich folgende Allelhäufigkeit berechnen.

	Allel	
	C	T
Patienten	54	98
Spender	63	119

Tabelle 3-22 Cromer Allelverteilung

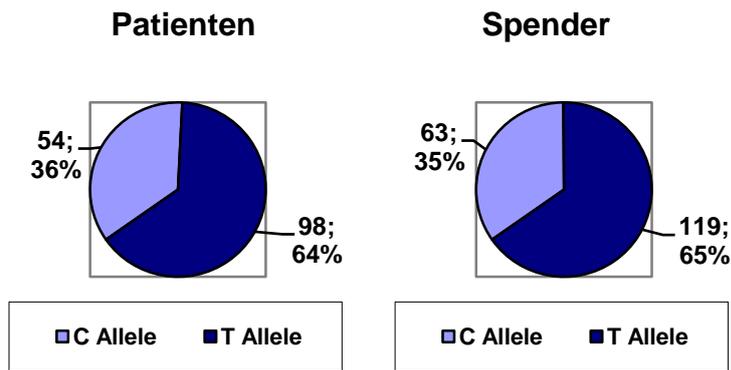


Abbildung 3.22 Cromer Allelverteilung

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p = 0,908$.

3.12 Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system Lutheran 1

3.12.1 Genotypverteilung

Die Auswertung der PCR bezüglich des Lutheran 1 – Antigen ergab folgende Verteilung der Genotypen.

	Genotyp		
	Lutheran 1 G / G	Lutheran 1 G / A	Lutheran 1 A / A
Patienten n = 76	42	20	14
Spender n = 97	56	22	19

Tabelle 3-23 Lutheran 1 Genotypverteilung

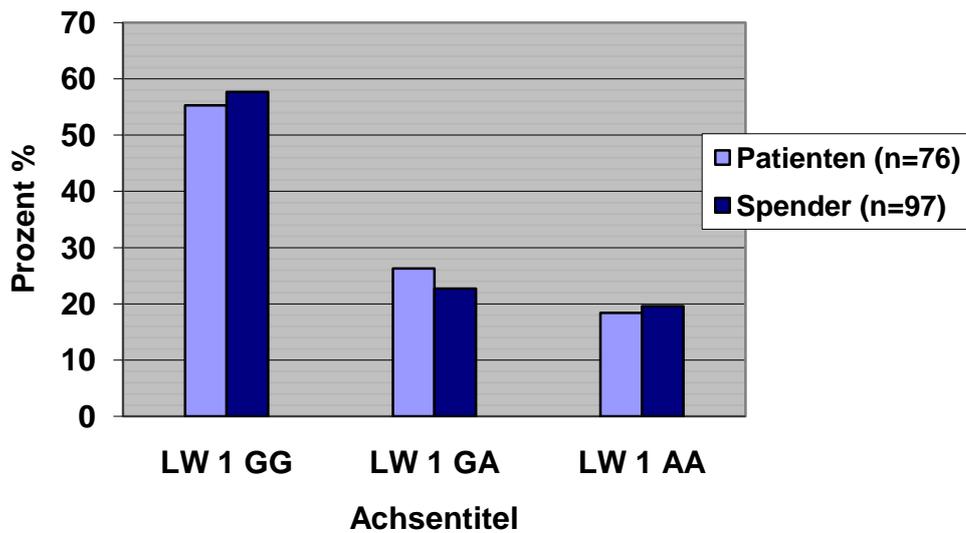


Abbildung 3.23 Lutheran 1 Genotypverteilung

In der Abbildung ist die Verteilung der Patienten und Spender Genotypen nebeneinander aufgetragen. Zur besseren Vergleichbarkeit sind hier die prozentualen Verteilungen dargestellt.

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p=0,893$.

3.12.2 Allelverteilung

Aus der Verteilung der Genotypen, ließ sich folgende Allelhäufigkeit berechnen.

	Allel	
	G	A
Patienten	104	48
Spender	134	60

Tabelle 3-24 Lutheran 1 Allelverteilung

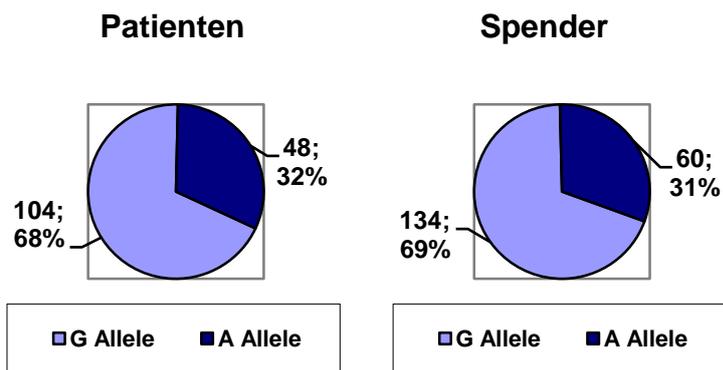


Abbildung 3.24 Lutheran 1 Allelverteilung

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p = 0,907$.

3.13 Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system Lutheran 2

3.13.1 Genotypverteilung

Die Auswertung der PCR bezüglich des Lutheran 2 – Antigens ergab folgende Verteilung der Genotypen.

	Genotyp		
	Lutheran 2 A / A	Lutheran 2 A / G	Lutheran 2 G / G
Patienten n = 76	32	32	12
Spender n = 97	35	43	19

Tabelle 3-25 Lutheran 2 Genotypverteilung

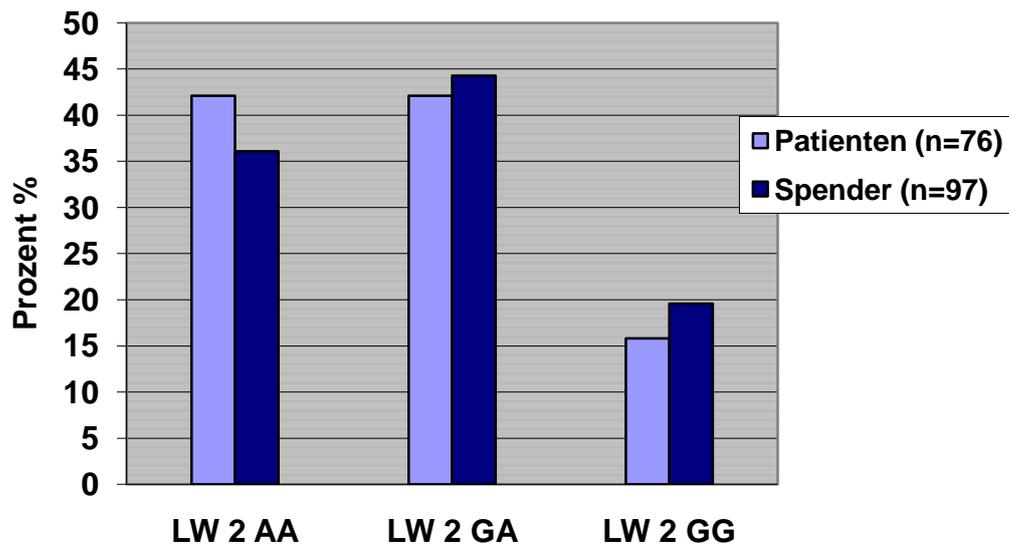


Abbildung 3.25 Lutheran 2 Genotypverteilung

In der Abbildung ist die Verteilung der Patienten und Spender Genotypen nebeneinander aufgetragen. Zur besseren Vergleichbarkeit sind hier die prozentualen Verteilungen dargestellt.

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p=0,696$.

3.13.2 Allelverteilung

Aus der Verteilung der Genotypen, ließ sich folgende Allelhäufigkeit berechnen.

	Allel	
	A	G
Patienten	96	56
Spender	113	81

Tabelle 3-26 Lutheran 2 Allelverteilung

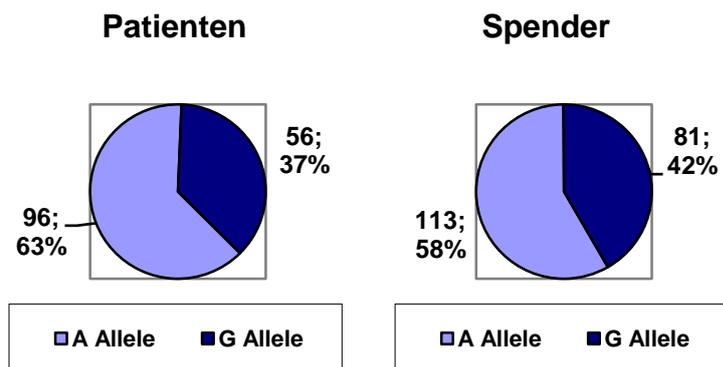


Abbildung 3.26 Lutheran 2 Allelverteilung

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p=0,377$.

3.14 Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system Lutheran 3

3.14.1 Genotypverteilung

Die Auswertung der PCR bezüglich des Lutheran 3 – Antigen ergab folgende Verteilung der Genotypen.

	Genotyp		
	Lutheran 3 C / C	Lutheran 3 C / T	Lutheran 3 T / T
Patienten n = 76	44	20	12
Spender n = 97	57	28	12

Tabelle 3-27 Lutheran 3 Genotypverteilung

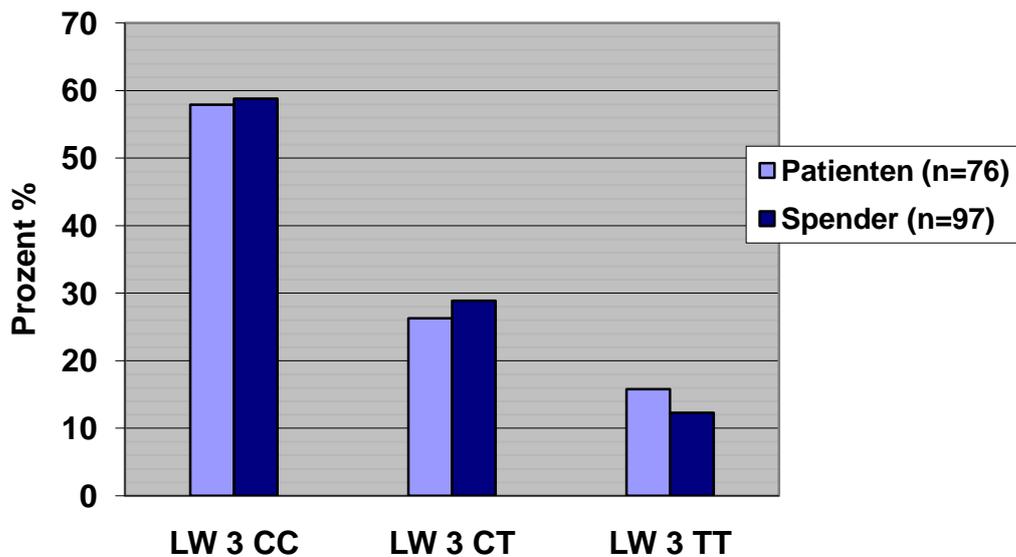


Abbildung 3.27 Lutheran 3 Genotypverteilung

In der Abbildung ist die Verteilung der Patienten und Spender Genotypen nebeneinander aufgetragen. Zur besseren Vergleichbarkeit sind hier die prozentualen Verteilungen dargestellt.

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p=0,803$.

3.14.2 Allelverteilung

Aus der Verteilung der Genotypen, ließ sich folgende Allelhäufigkeit berechnen.

	Allel	
	C	T
Patienten	108	44
Spender	142	52

Tabelle 3-28 Lutheran 3 Allelverteilung

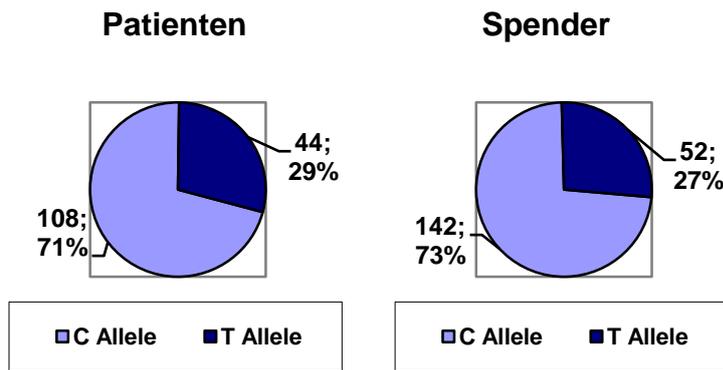


Abbildung 3.28 Lutheran 3 Allelverteilung

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p=0,717$.

3.15 Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system Lutheran 4

3.15.1 Genotypverteilung

Die Auswertung der PCR bezüglich des Lutheran 4 – Antigens ergab folgende Verteilung der Genotypen.

	Genotyp		
	Lutheran 4 C / C	Lutheran 4 C / T	Lutheran 4 T / T
Patienten n = 76	27	43	6
Spender n = 99	32	49	18

Tabelle 3-29 Lutheran 4 Genotypverteilung

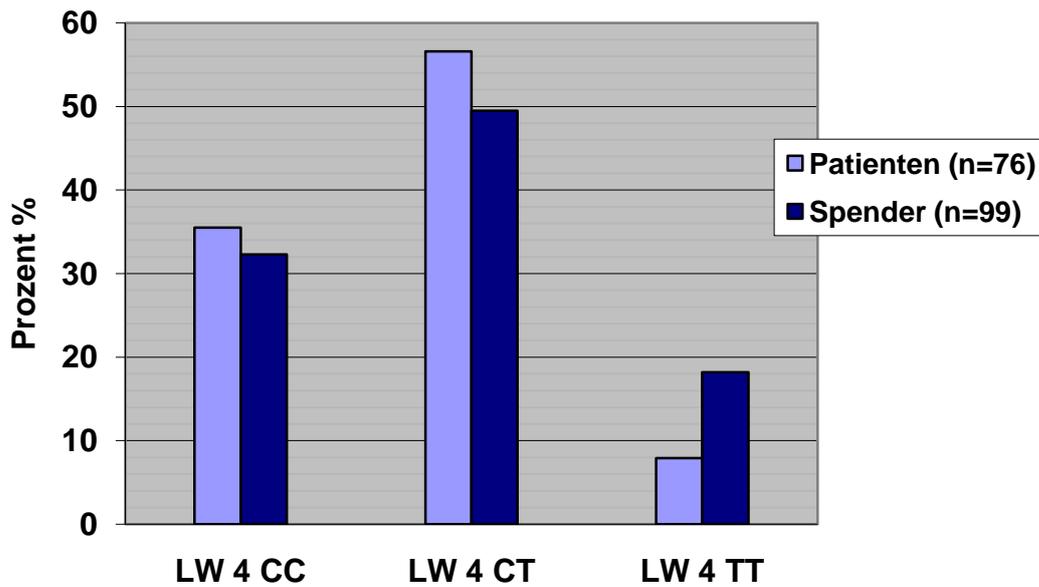


Abbildung 3.29 Lutheran 4 Genotypverteilung

In der Abbildung ist die Verteilung der Patienten und Spender Genotypen nebeneinander aufgetragen. Zur besseren Vergleichbarkeit sind hier die prozentualen Verteilungen dargestellt.

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p=0,151$.

3.15.2 Allelverteilung

Aus der Verteilung der Genotypen, ließ sich folgende Allelhäufigkeit berechnen.

	Allel	
	C	T
Patienten	97	55
Spender	113	85

Tabelle 3-30 Lutheran 4 Allelverteilung

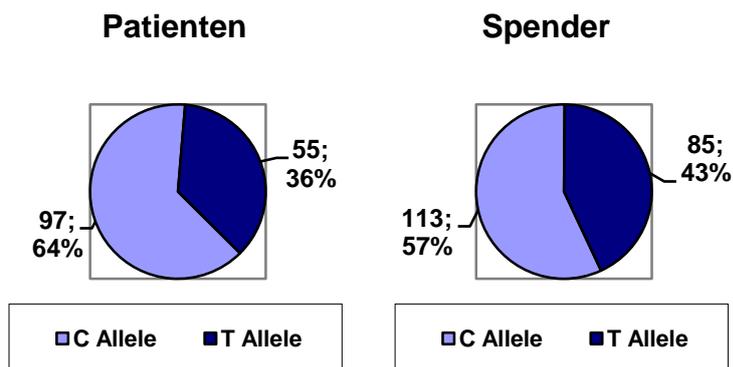


Abbildung 3.30 Lutheran 4 Allelverteilung

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p=0,226$.

3.16 Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system Lutheran 5

3.16.1 Genotypverteilung

Die Auswertung der PCR bezüglich des Lutheran 5 – Antigens ergab folgende Verteilung der Genotypen.

	Genotyp		
	Lutheran 5 G / G	Lutheran 1 G / A	Lutheran 5 A / A
Patienten n = 76	6	32	38
Spender n = 99	7	44	48

Tabelle 3-31 Lutheran 5 Genotypverteilung

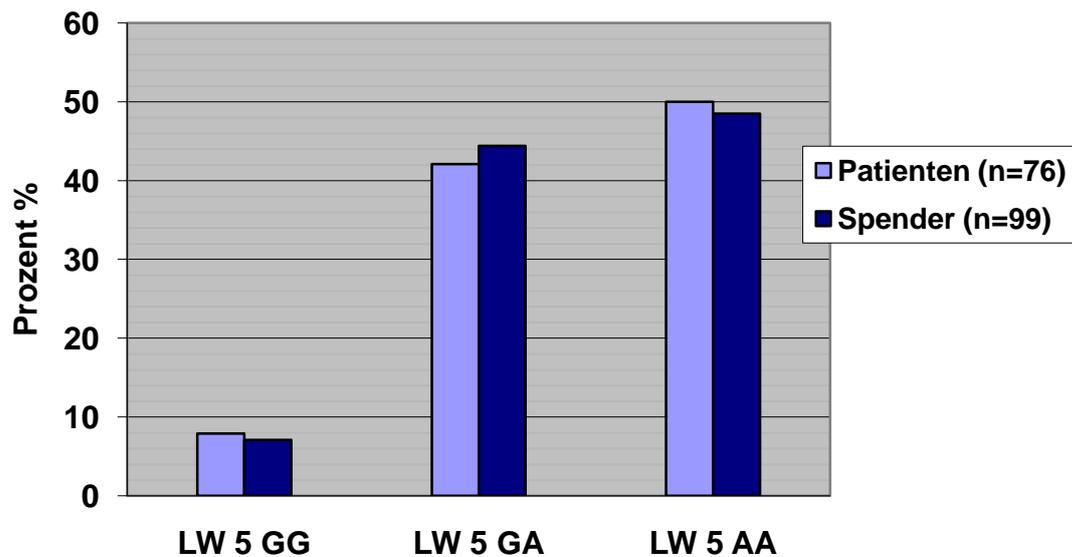


Abbildung 3.31 Lutheran 5 Genotypverteilung

In der Abbildung ist die Verteilung der Patienten und Spender Genotypen nebeneinander aufgetragen. Zur besseren Vergleichbarkeit sind hier die prozentualen Verteilungen dargestellt.

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p = 0,972$.

3.16.2 Allelverteilung

Aus der Verteilung der Genotypen, ließ sich folgende Allelhäufigkeit berechnen.

	Allel	
	A	G
Patienten	108	44
Spender	140	58

Tabelle 3-32 Lutheran 5 Allelverteilung

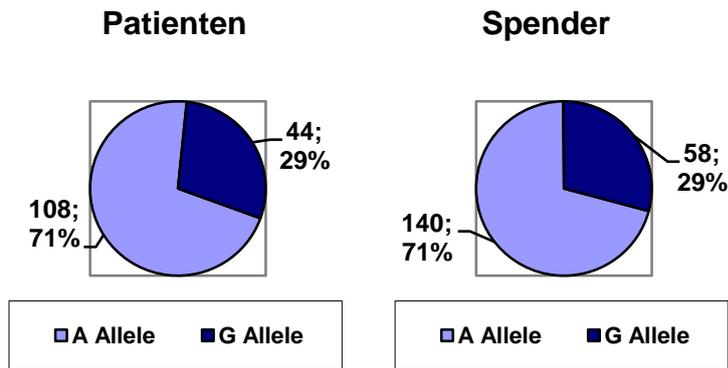


Abbildung 3.32 Lutheran 5 Allelverteilung

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p > 0,999$.

3.17 Genotyp- und Allelverteilung im Antigen system Lutheran 6

3.17.1 Genotypverteilung

Die Auswertung der PCR bezüglich des Lutheran 6 – Antigens ergab folgende Verteilung der Genotypen.

	Genotyp		
	Lutheran 6 G / G	Lutheran 6 G / A	Lutheran 6 A / A
Patienten n = 80	34	35	7
Spender n = 99	35	47	17

Tabelle 3-33 Lutheran 6 Genotypverteilung

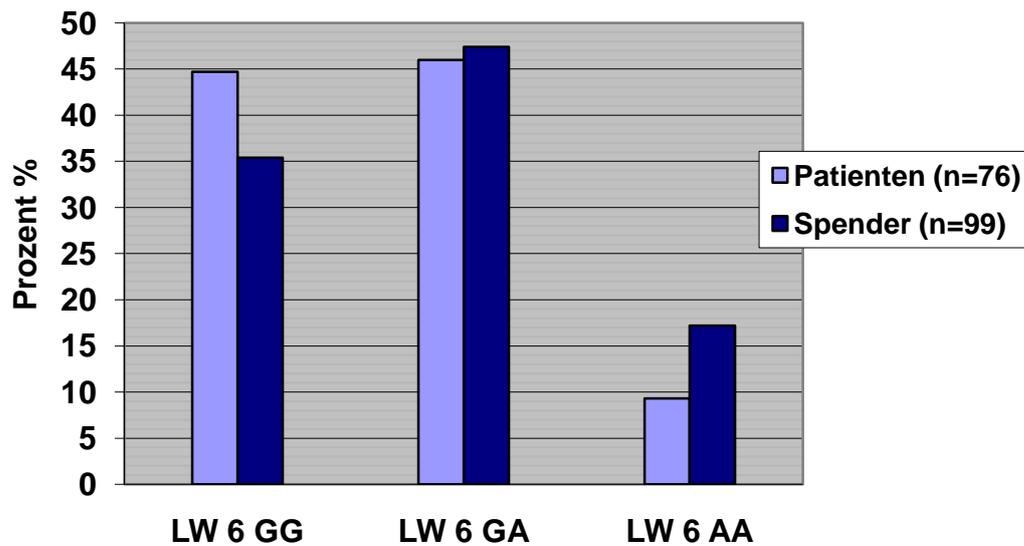


Abbildung 3.33 Lutheran 6 Genotypverteilung

In der Abbildung ist die Verteilung der Patienten und Spender Genotypen nebeneinander aufgetragen. Zur besseren Vergleichbarkeit sind hier die prozentualen Verteilungen dargestellt.

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p=0,223$.

3.17.2 Allelverteilung

Aus der Verteilung der Genotypen, ließ sich folgende Allelhäufigkeit berechnen.

	Allel	
	A	G
Patienten	49	103
Spender	81	117

Tabelle 3-34 Lutheran 6 Allelverteilung

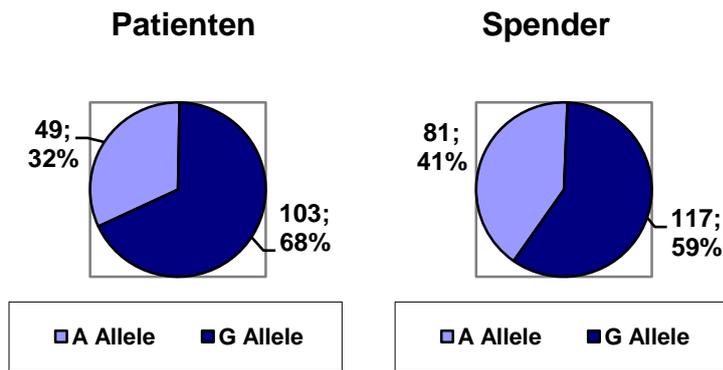


Abbildung 3.34 Lutheran 6 Allelverteilung

Die Signifikanzberechnung mit dem exakten Test nach Fisher ergab $p=0,118$.

4 Diskussion

Die vorgelegte Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob erythrozytäre Blutgruppen-Polymorphismen ein pathogenetisch relevanter Faktor für mikrovaskuläre inflammatorische Prozesse sein können. Am Modell des mikroangiopathischen Schlaganfalls, dem pathogenetisch eine zerebrale Mikroangiopathie mit entzündlicher Komponente zu Grunde liegt, wurde in der vorgelegten Arbeit daher in Form eines Pilotprojektes untersucht, ob Patienten eine unterschiedliche Verteilung der Allele definierter erythrozytärer Blutgruppen-Polymorphismen mit bekannter immunologischer Funktion zeigen im Vergleich zu gesunden Probanden.

Die bisherigen Untersuchungen über das Duffy Protein zeigen seine vielfältige Bedeutung für die Regulation von Entzündungsprozessen. Das als Rezeptor für proinflammatorische Chemokine sowohl bei der akuten als auch der chronischen Entzündungsreaktion bekannte Duffy Protein zeigt in der vorgelegten Arbeit eine andere Allelverteilung bei Patienten mit mikroangiopathischem Schlaganfall als bei einem gesunden Kontrollkollektiv: Patienten mit mikroangiopathischem Schlaganfall exprimieren das FYA Allel häufiger und das FYB Allel weniger häufig im Vergleich zu einem Kollektiv hinsichtlich Alter und Geschlecht gematchter gesunder Probanden (Fisher Exakt Test $p=0,067$). Für die Polymorphismen in den Blutgruppenantigenensystem Indian (IN), Cromer (CROM), Lutheran (LU) sowie für CD47 ergaben die Untersuchungen anhand des in diesem Pilotprojekt eingesetzten Patientenkollektivs keinen signifikanten Unterschied zum Kontrollkollektiv sowohl in der Genotypverteilung als auch in der Allelverteilung.

4.1 Einfluss der Expression der Duffy-Proteine auf die Clearance proinflammatorischer Chemokine

Im Laufe der letzten Jahre konnten für DARC (Duffy Antigen/ Receptor for Chemokines) neben seiner Eigenschaft als Blutgruppenantigen verschiedene andere Eigenschaften nachgewiesen werden. So spielt das Protein eine Rolle im Bereich der Infektiologie als Rezeptor für Plasmodium vivax [46].

Eine weitere Funktion besteht als Rezeptor auf Erythrozyten für verschiedene inflammatorische CC und CXC Chemokine, wobei dieser Rezeptor keine Signalweiterleitung hervorruft, sondern die Chemokine auf den Erythrozyten bindet und so als eine Art Speicher fungiert. Einerseits wird damit eine Aktivierung von Leukozyten durch systemisch zirkulierende Chemokine in der Blutbahn verhindert, andererseits treten weniger Chemokine aus der Blutbahn in die Organe über [21,59]. DARC scheint somit einen wichtigen Einfluss auf die Homöostase der Chemokine im Blut zu haben. Es konnte im Tierexperiment gezeigt werden, dass Chemokine aus dem Blut von DARC Knockout Mäusen schnell verschwinden, bei DARC positiven Mäusen aber noch längerfristig nachweisbar sind [32].

Eine Studie untersuchte die Chemokinkonzentration bei Duffy positiven Menschen im Vergleich zu Duffy negativen Menschen nach einer Infusion von Lipopolysacchariden. Die Duffy negativen Probanden stammten aus Afrika und trugen alle denselben Genpolymorphismus, die Duffy positiven Probanden waren kaukasischer Abstammung und waren zu 19% Fy^{a-b+} , 25% Fy^{a+b-} und 56% Fy^{a+b+} . Die Ergebnisse zeigten, dass die Plasma Spiegel von TNF, IL-6 und IL-10, sowie die Spiegel im Vollblut von CXCL1, MCP1 und IL-8 mRNA sich bei Duffy negativen und Duffy positiven Menschen in ähnlicher Weise ansteigen. Allerdings stieg der Plasma Spiegel für MCP1 2-fache höher und der CXCL1 Spiegel 2,5fach höher an bei Duffy positiven Menschen. An Erythrozyten gebundene CXCL1, MCP1 und IL8 war 20- bis 50-fach höher bei Duffy positiven als bei Duffy negativen Menschen [67]. DARC hat auf diese Weise einen Einfluss auf die Chemokinkonzentration im Blut, allerdings konnte kein protektiver Effekt bei Endotoxin-Gabe nachgewiesen werden. Zudem ist die physiologische Rolle dieser Eigenschaft des DARC auf Erythrozyten ist noch nicht geklärt. So ist noch unklar, wie lange die Chemokine gebunden bleiben, wann sie wieder freigegeben werden und was beim Erythrozytenabbau mit ihnen geschieht.

Ein weiterer Zusammenhang zwischen dem Duffy Polymorphismus und dem Immunsystem konnte bei Amerikanern mit einer afrikanischen Abstammung nachgewiesen werden. Bei diesen war eine niedrigere Anzahl weißer Blutzellen aufgefallen, im Gegensatz zu Amerikanern europäischer Herkunft. Es konnte

daraufhin eine Assoziation zwischen einer benignen ethnischen Neutropenie und Homozygotie für das Duffy-Null Allel nachgewiesen werden [70,85].

4.2 Die Bedeutung proinflammatorischer Chemokine für die Entstehung des mikroangiopathischen Schlaganfalls

Der mikroangiopathische Schlaganfall unterscheidet sich in seinem Risikofaktorenprofil von den makroangiopathischen Schlaganfällen. Dem mikroangiopathischen Schlaganfall liegt pathogenetisch eine Verdickung der Gefäßwand, eine Störung der Blut-Hirn-Schranke, eine Verminderung der Perfusion und eine gestörte Vasomotorik zu Grunde. Eine chronische Hypoperfusion und daraus folgende Ischämie führt zu der Leukenzephalopathie [73].

Eine zentrale Rolle nehmen hierbei die zerebralen Endothelzellen ein. Diese werden durch eine Hypoperfusion mit daraus folgender Hypoxämie aktiviert. Sie produzieren vasoaktive und pro-inflammatorische Stoffe, wie zum Beispiel Prostaglandine, Leukotriene und Plättchen-aktivierenden Faktor. Diese Stoffe sorgen für eine Veränderung des regionalen Blutflusses, eine erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und eine Neutrophilenaktivierung, die zur Adhäsion führt. Desweiteren setzen die ischämischen Endothelzellen Chemokine wie IL-8, IL-1beta oder MCP-1 frei [24,25,30,94].

Eine Beeinflussung dieser Chemokinkonzentration durch IL-8 Rezeptor Inhibitoren konnte im Tiermodell bei Ratten sowohl die Infarktgröße nach einer Ischämie verringern als auch das neurologische Outcome verbessern [33,103].

Ein neuer Ansatz ist der Einfluss des Duffy-Polymorphismus auf die Erythrozyten und ihre Struktur. Es wurde bei Patienten mit Sichelzellanämie der Duffygenotyp bestimmt und die unterschiedliche Reaktion der Erythrozyten auf oxydativen Stress. Bei der Sichelzellanämie kommt es durch intrazellulären Kaliumverlust zur Polymerisation des Hämoglobins und dadurch zur Gefäßverschlüssen und Hämolyse. Es konnte in vitro gezeigt werden, dass bei Duffy positiven Erythrozyten der Anteil von Zellen mit einer hohen Polymerisation und Dichte

unter oxydativen Stress 17fach höher ist als bei Duffy negativen Erythrozyten. Diese Ergebnisse wurden mit einer Beeinflussung eines Ca-abhängigen Kaliumkanals (Gardos Kanal) durch DARC erklärt. Duffy-positive Erythrozyten, die das DARC Protein exprimieren, binden inflammatorische Zytokine, welche zu einer Aktivierung des Ca-abhängigen Kaliumkanals führen [26].

4.3 Die Bedeutung des erythrozytären Duffy Blutgruppenpolymorphismus für mikrovaskuläre inflammatorische Prozesse

Menschen mit einer kaukasischen Abstammung erleiden häufiger einen Schlaganfall der großen Gefäße, während Menschen mit einer afrikanischen Abstammung häufiger an einer zerebralen Mikroangiopathie erkranken [48,104]. Diese beiden ethnischen Gruppen unterscheiden sich in ihrem Antigenmuster bezüglich des Duffy Antigen grundlegend. Ungefähr 95% der Westafrikaner und 70% der Afroamerikaner weisen das Duffy-Protein nicht auf (Fy^{a-b-}), im Gegensatz zu der kaukasischen Bevölkerung, wo fast 100% entweder den Duffy A, Duffy B oder Duffy AB Phänotyp besitzen. Der Duffy negative Phänotyp (Fy^{a-b-}) wird durch eine Punktmutation im Duffy Gen (SNP rs2814778) hervorgerufen, die dazu führt, dass DARC nicht auf den Erythrozyten exprimieren wird, aber auf anderen Geweben wie zum Beispiel auf Endothelzellen in postkapillären Venolen. Der Duffy Polymorphismus könnte durch seinen Einfluss auf die Chemokinkonzentration im Blut einen Einfluss haben auf das Entstehen und den Verlauf von mikroangiopathischen Schlaganfällen.

4.4 Zusammenfassung und Perspektive

Das als Rezeptor für proinflammatorische Chemokine sowohl bei der akuten als auch der chronischen Entzündungsreaktion bekannte Duffy Protein zeigt eine andere Allelverteilung bei Patienten mit mikroangiopathischem Schlaganfall als bei einem gesunden Kontrollkollektiv. Patienten mit mikroangiopathischem Schlaganfall weisen das FYB Allel weniger häufig auf als gesunde Probanden.

Die Ergebnisse des hier vorgestellten Pilotprojektes bieten zusammenfassend somit eine Rationale, die Allelverteilung und Expression der Polymorphismen des Duffy Blutgruppensystems bei der Diskussion der Pathogenese mikroangiopathischer Prozesse zukünftig als pathogenetischen Risikofaktor mit einzubeziehen und durch umfangreichere Studien auch unter Berücksichtigung anderer Bevölkerungspopulationen abzusichern, nicht zuletzt auch im Hinblick auf Optionen der Prävention und Therapie mikrovaskulärer inflammatorischer Prozesse. Desweiteren sollten, um die hier erhobene Arbeitshypothese, dass eine reduzierte FvB Expression auf Erythrozyten mit einer reduzierten Clearance proinflammatorischer Chemokine und in der Folge mit einer aggravierten Entzündungsreaktion assoziiert ist, weitere Studien durchgeführt werden. In den bisher durchgeführten Untersuchungen, die die Entzündungsreaktionen vor dem Hintergrund des Duffypolymorphismus untersuchten, wurde zwischen Duffy negativen Menschen und Duffy positiven Menschen unterschieden, ohne die Gruppe der Duffy positiven Menschen genauer in Fy^{a+b-} , Fy^{b+a-} oder Fy^{a+b+} zu differenzieren. Diese Differenzierung wäre wichtig, um zum Beispiel ein mögliches Risikoprofil für die Entstehung mikroangiopathischer Prozesse für Menschen mit kaukasischer Abstammung zu definieren, um daraus Möglichkeiten der Prävention und Therapie abzuleiten.

5 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
CD	Cluster of Differentiation
kb	Kilo-base pair
MCP-1	Monocyte-chemoattractant Protein 1
SNP	single nucleotide polymorphism
DARC	Duffy Antigen/ Receptor for Chemokines“
ICAM-1	intercellulare adhesion molecule -1
bp	base pair
SSP	sequence specific priming
PCR	polymerase chain reaction
EBr	Ethidiumbromid
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
NCBI	National Center for Biotechnology Information
IL-8	Interleukin 8
PAVK	
TOAST	Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment
TNF α	tumour necrosis factor α
ESL	endothelial surface layer

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Beispiel Gelddetektion	- 23 -
Abbildung 3.1 Duffy Genotypverteilung	- 24 -
Abbildung 3.2 Duffy Allelverteilung	- 25 -
Abbildung 3.3 Indian 1 Genotypverteilung	- 26 -
Abbildung 3.4 Indian 1 Allelverteilung	- 27 -
Abbildung 3.5 Indian 2 Genotypverteilung	- 28 -
Abbildung 3.6 Indian 2 Allelverteilung	- 29 -
Abbildung 3.7 Indian 3 Genotypverteilung	- 30 -
Abbildung 3.9 Indian 3 Allelverteilung	- 31 -
Abbildung 3.10 Indian 4 Genotypverteilung	- 32 -
Abbildung 3.11 Indian 4 Allelverteilung	- 33 -
Abbildung 3.12 Indian 5 Genotypverteilung	- 34 -
Abbildung 3.13 Indian 5 Allelverteilung	- 35 -
Abbildung 3.14 Indian 6 Genotypverteilung	- 36 -
Abbildung 3.15 Indian 6 Allelverteilung	- 37 -
Abbildung 3.16 CD47 1 Genotypverteilung	- 38 -
Abbildung 3.17 CD47 1 Allelverteilung	- 39 -
Abbildung 3.18 CD47 2 Allelverteilung	- 40 -
Abbildung 3.19 CD47 2 Allelverteilung	- 41 -
Abbildung 3.20 CD47 3 Genotypverteilung	- 42 -
Abbildung 3.21 CD47 3 Allelverteilung	- 43 -
Abbildung 3.22 Cromer Genotypverteilung	- 44 -
Abbildung 3.23 Cromer Allelverteilung	- 45 -
Abbildung 3.24 Lutheran 1 Genotypverteilung	- 46 -
Abbildung 3.25 Lutheran 1 Allelverteilung	- 47 -
Abbildung 3.26 Lutheran 2 Genotypverteilung	- 48 -
Abbildung 3.27 Lutheran 2 Allelverteilung	- 49 -
Abbildung 3.28 Lutheran 3 Genotypverteilung	- 50 -
Abbildung 3.29 Lutheran 3 Allelverteilung	- 51 -
Abbildung 3.30 Lutheran 4 Genotypverteilung	- 52 -
Abbildung 3.31 Lutheran 4 Allelverteilung	- 53 -

Abbildung 3.32 Lutheran 5 Genotypverteilung	- 54 -
Abbildung 3.33 Lutheran 5 Allelverteilung	- 55 -
Abbildung 3.34 Lutheran 6 Genotypverteilung	- 56 -
Abbildung 3.35 Lutheran 6 Allelverteilung	- 57 -

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1 Untersuchten Polymorphismen	- 21 -
Tabelle 3-2 Duffy Genotypverteilung	- 24 -
Tabelle 3-3 Duffy Allelverteilung	- 25 -
Tabelle 3-4 Indian 1 Genotypverteilung	- 26 -
Tabelle 3-5 Indian 1 Allelverteilung	- 27 -
Tabelle 3-6 Indian 2 Genotypverteilung	- 27 -
Tabelle 3-7 Indian 2 Allelverteilung	- 28 -
Tabelle 3-8 Indian 3 Genotypverteilung	- 29 -
Tabelle 3-9 Indian 3 Allelverteilung	- 30 -
Tabelle 3-10 Indian 4 Genotypverteilung	- 31 -
Tabelle 3-11 Indian 4 Allelverteilung	- 32 -
Tabelle 3-12 Indian 5 Genotypverteilung	- 33 -
Tabelle 3-13 Indian 5 Allelverteilung	- 34 -
Tabelle 3-14 Indian 6 Genotypverteilung	- 35 -
Tabelle 3-15 Indian 6 Allelverteilung	- 36 -
Tabelle 3-16 CD47 1 Genotypverteilung	- 37 -
Tabelle 3-17 CD47 1 Allelverteilung	- 38 -
Tabelle 3-18 CD47 2 Genotypverteilung	- 39 -
Tabelle 3-19 CD47 2 Allelverteilung	- 40 -
Tabelle 3-20 CD47 3 Genotypverteilung	- 41 -
Tabelle 3-21 CD47 3 Allelverteilung	- 42 -
Tabelle 3-22 Cromer Genotypverteilung	- 43 -
Tabelle 3-23 Cromer Allelverteilung	- 44 -
Tabelle 3-24 Lutheran 1 Genotypverteilung	- 45 -
Tabelle 3-25 Lutheran 1 Allelverteilung	- 46 -
Tabelle 3-26 Lutheran 2 Genotypverteilung	- 47 -
Tabelle 3-27 Lutheran 2 Allelverteilung	- 48 -
Tabelle 3-28 Lutheran 3 Genotypverteilung	- 49 -
Tabelle 3-29 Lutheran 3 Allelverteilung	- 50 -
Tabelle 3-30 Lutheran 4 Genotypverteilung	- 51 -
Tabelle 3-31 Lutheran 4 Allelverteilung	- 52 -

Tabelle 3-32 Lutheran 5 Genotypverteilung	- 53 -
Tabelle 3-33 Lutheran 5 Allelverteilung	- 54 -
Tabelle 3-34 Lutheran 6 Genotypverteilung	- 55 -
Tabelle 3-35 Lutheran 6 Allelverteilung	- 56 -

8 Literaturverzeichnis

- 1 Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M(1990) CD44 is the principal surface receptor for hyaluronate. *Cell*61: 1303
- 2 Bergelson JM, Chan KR, Solomon NF (1994) Decay-accelerating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositolanchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6245 – 6249
- 3 Bernemann TM, Podda M, Wolter M, et al.(2000) Expression of the basal cell adhesion molecule (B - CAM) in normal and diseased human skin. *J Cutan Pathol* 27: 108 – 111
- 4 Boado RJ, Li JY, Pardridge WM, et al (2000) Selective Lutheran glycoprotein gene expression at the blood-brain barrier in normal brain and in human brain tumors. *J Cereb Blood Flow Metab*20: 1096 – 1102
- 5 Bourguignon LY, Iida N, Welsh CF (1995) Involvement of CD44 and its variant isoforms in membrane-cytoskeleton interaction, cell adhesion and tumor metastasis. *J Neurooncol* 26: 201-208
- 6 Bowes MP, Zivin JA, Rothlein R (1993) Monoclonal antibody to the ICAM-1 adhesion site reduces neurological damage in a rabbit cerebral embolism stroke model. *Exp Neurol* 119: 215-219
- 7 Carmelli D (1998) Evidence for genetic variance in white matter hyperintensity volume in normal elderly male twins. *Stroke*29 (6): 1177-81b
- 8 Cartron JP, Molecular basis of red cell protein antigen deficiencies . *Vox Sang* (2000) 78 (Supp 2): 7-23

- 9 Cartron JP, Colin Y (2001) Structural and functional diversity of blood group antigen. *Transfus Clin Biol*8: 163-199
- 10 Chitnis CE, Miller LH (1994) Identification of the erythrocyte binding domains of *P.vivax* and *P. knowlesi* proteins involved in invasion. *J Exp Med*180: 497-506
- 11 Chopp M, Li Y, Jiang N, Zhang RL, Probst J.(1996) Antibodies against adhesion molecules reduce apoptosis after transient middle cerebral artery occlusion in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 578 – 584
- 12 Chung J, Goa AG, Frazier WA (1997)Thrombospondin acts via integrin-associated protein to activate the platelet integrin α IIb β 3. *J Biol Chem* 272: 14720 – 14746
- 13 Chung J, Wang XQ, Lindberg FP, Frazier WA (1999) Thrombospondin-1 acts via IAP/CD47 to synergize with collagen in α 2 β 1-mediated platelet activation. *Blood* 94: 642 – 648
- 14 Clark WM, Lauten JD, Lessov N, Woodward W, Coull BM.(1995) The influence of antiadhesion therapies on leukocyte subset accumulation in central nervous system ischemia in rats. *J Mol Neurosci* 6: 43 - 50
- 15 Connolly ES, Winfree CJ, Springer TA, Naka Y, Liao H, Yan SD, Stern DM, Solomon RA, Gutierrez-Ramos JC, Pinsky DJ (1996) Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. *J Clin Invest* 97: 209 – 216
- 16 Crew VK, Poole J, et al (2004) LU21: a new high-frequency antigen in the Lutheran blood group system. *Vox Sang*87: 109 – 13

- 17 Daniels G(1999) Functional aspects of red cell antigens. *Blood Rev*13: 14-35
- 18 Daniels GL(1989) Cromer-related antigens—blood group determinants on decay-accelerating factor. *Vox Sang*56: 205 – 211
- 19 Daniels GL, Green CA, Mallison G, et al. (1998) Decay-accelerating factor (CD55) deficiency phenotypes in Japanese. *Transfusion*8: 141 – 147
- 20 Darbonne WC, Rice GC, Mohler MA, Apple T, Hebert CA, Valente AJ, et al. (1991) Red blood cells are a sink for interleukin 8, a leukocyte chemotaxin. *J Clin Invest*88: 1362 – 9
- 21 Dawson TC, Lentsh AB, Wang Z, Cowhig JE, Rot A, Mardea N, Peiper SC(2000) Exaggerated response to endotoxin in mice lacking the Duffy antigen/Receptor for chemokines (DARC). *Blood*96: 1681-1684
- 22 de Vries HE, Hendriks JJ, Honing H, De Lavalette CR, van der Pol SM, Hooijberg E, Dijkstra CD, van den Berg TK (2002) Signal-regulatory protein alpha-CD47 interactions are required for the transmigration of monocytes across cerebral endothelium. *J Immunol*168: 5832 – 5839
- 23 del Zoppo GJ, Schmid-Schönbein GW, Mori E, Copeland BR, Chang CM (1991) Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke* 22: 1276 – 1284
- 24 del Zoppo GJ, Hallenbeck JM(2000) Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thromb Res*98(3): 73-81
- 25 del Zoppo GJ (2009) Inflammation and the neurovascular unit in the setting of focal cerebral ischemia. *Neuroscience*158: 972-982

- 26 Durpés MC, Nebor D et al (2010) Effect of IL-8 and RANTES on the Gardor channel activity in sickle human red blood cells: Role of the Duffy antigen receptor for chemokines. *Blood cells, Molecules and Diseases* 44: 219-223
- 27 El Nemer W, Gane P, Colin Y, et al(1998) The Lutheran blood group glycoproteins, the erythroid receptors for laminin, are adhesion molecules. *J Biol Chem*273: 16686 – 16693
- 28 Eyler CE, Telen MJ (2006) The Lutheran glycoprotein: a multifunctional adhesion receptor. *Transfusion*46: 668 – 677
- 29 Fahraeus R, Lindqvist T(1931) The viscosity of the blood in narrow capillary tubes. *Am J Physiol*96: 562-568
- 30 Feuerstein GZ, Wang X(1998) Role of chemokines in atherosclerosis. *Jdrugs*1(4): 424 – 428
- 31 Fisher CM (1991) Lacunar infarcts: a review. *Cerebrovasc Dis*1: 311-320
- 32 Fukuma N, Akimitsu N, Hamamoto H, Kusuhara H, Sugiyama Y, Sekimizu K.(2003) A role of the Duffy antigen for the maintenance of plasma chemokine concentrations. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 137 – 9
- 33 Garau A, Bertini R, Colotta F, Casilli F, Bigini P, Cagnotto A, Mennini T, Ghezzi P, Villa P(2005) Neuroprotection with the CXCL8 inhibitor repertaxin in transient brain ischemia. *Cytokine* 30: 125-131
- 34 Garcia JH, Liu KF, Yoshida Y, Chen S, Lian J (1994) Brain microvessels: factors altering their patency after the occlusion of a middle cerebral artery. *Am J Pathol*144: 188-199

- 35 Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, Bratton DL, Oldenburg PA, Michalak M, Henson PM(2005) Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell*123: 321 – 334
- 36 Goa AG, Lindenberg FP, Finn MB et al (1996) Integrin associated protein is a receptor for C-terminal domain of thrombospondin. *J Biol Chem*271: 21 – 24
- 37 Hallenbeck JM (1996) Inflammatory reactions at the blood-endothelial interface in acute stroke. *Adv Neurol*.71:281-97
- 38 Hamann GF, Okada Y, FitrIDGE R, del Zoppo GJ (1995) Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke*26: 2120-2126
- 39 Han X, Sterling H, Chen Y, Saginario C, Brown EJ, Frazier WA, Lindberg FP, Vignery A(2000) CD47, a ligand for the macrophage fusion receptor, participates in macrophage multinucleation. *J Biol Chem*275: 37984 – 37992
- 40 Haring HP, Berg EL, Tsurushita N, Tagaya M, del Zoppo GJ (1996) E-selectin appears in nonischemic tissue during experimental focal cerebral ischemia. *Stroke*27: 1386-1391
- 41 Harold Pet al(1993) Classification of Subtype of acute ischemic stroke. *Stroke*24 (1): 35-41
- 42 Hassan A(2003) Markers of endothelial dysfunction in lacunar infarction and ischaemic leukoaraiosis. *Brain*126(Pt 2): 424-32

- 43 Haynes BF, Hale LP, Patton KL et al(1995) Measurement of an adhesion molecule as an indicator of inflammatory disease activity. Up-regulation of the receptor for hyaluronate (CD44) in rheumatoid arthritis. *Nat Med*1: 558 – 563
- 44 Heeger PS Lalli PN, Lin F, Valujskikh A, Liu J, Muqim N, Xu Y, Medof ME (2005) Decay-accelerating factor modulates induction of T cell immunity. *J Exp Med*201: 1523 – 1530
- 45 Hong L,Asok C, Zbrzezna Valerie, He Yu, Pogo A(2000) Deletion of the Murine Duffy Gene (Dfy) Reveals that the Duffy Receptor Is Functionally Redundant. *Molecular and Cellular Biology* 20 (9): 3097 – 3101
- 46 Horuk R, Wang ZX, Peiper SC, Hesselgesser J(1994) Identification and characterization of a promiscuous chemokine binding protein in a human erythroleukemic cell line. *J Biol Chem*269: 17730 – 3
- 47 Huang J,Upadhyay UM, Tamargo RJ (2006) Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia *Surg Neurol.*66 (3): 232 – 245
- 48 Hugh SM(2007) Differences in stroke subtypes between Black and White patients with stroke. *Circulation* 116: 2157-2164
- 49 Hurwitz AA, Berman JW, Rashbaum WK Lyman WD (1993) Human fetal astrocytes induce the expression of blood-brain barrier specific proteins by autologous endothelial cells. *Brain Res*625:238-243
- 50 Isenberg JS, Ridnour LA, Dimitry J, Frazier WA, Wink DA, Roberts DD (2006)CD47 is necessary for inhibition of nitric oxide-stimulated vascular cell responses by thrombospondin-1. *J Biol Chem* 281: 26069 – 26080

- 51 Isenberg JS, Hyodo F, Matsumoto K, Romeo MJ, Abu-Asab M, Tsokos M, Kuppusamy P, Wink DA, Krishna MC, Roberts DD(2007) Thrombospondin-1 limits ischemic tissue survival by inhibiting nitric oxide-mediated vascular smooth muscle relaxation. *Blood* 109: 1945 – 1952
- 52 Isenberg JS, Hyodo F, Pappan LK, Abu-Asab M, Tsokos M, Krishna MC, Frazier WA, Roberts DD Blocking thrombospondin-1/CD47 signaling alleviates deleterious effects of aging on tissue responses to ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2007) (a)27: 2582 – 2588
- 53 Ivacko J, Szaflarski J, Malinak C, Flory C, Warren JS, Silverstein FS(1997) Hypoxic-ischemic injury induces monocyte chemoattractant protein-1 expression in neonatal rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 17 (7): 759 – 770
- 54 Joneckis CC, Shock DD, Cunningham ML, et al.(1996) Glycoprotein IV-independent adhesion of sickle red blood cells to immobilized thrombospondin under flow conditions. *Blood* 87: 4862 – 4870
- 55 Kahn U(2007) Risk factor profile of cerebral small vessel disease and its subtypes *stroke* 38: 702-706
- 56 Khandelwal S, van Rooijen N, Saxena RK(2007) Reduced expression of CD47 during murine red blood cell (RBC) senescence and its role in RBC clearance from the circulation. *Transfusion* 47: 1725- 1732
- 57 Lalli PN, Strainic MG, Lin F, Medof ME, Heeger PS(2007) Decay Accelerating Factor Can Control T Cell Differentiation into IFN- γ -Producing Effector Cells via Regulating Local C5a-Induced IL-12 Production. *The J of Immunology* 179:5793 – 5802

- 58 Latour S, Tanaka H, Demeure C, Mateo V, Rubio M, Brown EJ, Maliszewski C, Lindberg FP, Oldenborg A, Ullrich A, Delespesse G, Sarfati M (2001) Bidirectional negative regulation of human T and dendritic cells by CD47 and its cognate receptor signal-regulator protein-alpha: down-regulation of IL-12 responsiveness and inhibition of dendritic cell activation *J Immunol*167: 2547 – 54
- 59 Latterveer L, Lindley IJ, Heemskerk DP, Camps JA, Pauwels EK, Willemze R, et al. (1996) Rapid mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by a single intravenous injection of interleukin-8. *Blood*87: 781 – 8
- 60 Lee JS, Frevert CW, Wurfel MM, Peiper SC, Wong VA, Ballman KK, Ruzinski JT, Rhim JS, Martin TR, Goodman RB(2003) Duffy antigen facilitates movement of chemokine across the endothelium in vitro and promotes neutrophil transmigration in vitro and in vivo. *J Immunol*170 (10): 5244- 5251
- 61 Lee JS, et al. (2006) The Duffy Antigen Modifies Systemic and Local Tissue Chemokine Responses following Lipopolysaccharide Stimulation. *The J of Immunology*177: 8086 – 8094
- 62 Lindberg FP, Lublin DM, Telen MJ, Veile RA, Miller YE, Donis-Keller H, Brown EJ (1994) Rh-related antigen CD47 is the signal-transducer integrin-associated protein. *J Biol Chem*269: 1567 – 1570
- 63 Liszewski MK, Farries TC, Lublin DM, Rooney IA, Atkinson JP.(1996) Control of the complement system. *Adv. Immunol.*61: 201 – 283

- 64 Lublin DM, Mallinson G, Poploe J, et al.(1994) Molecular basis of reduced or absent expression of decay accelerating factor in Cromer blood group phenotypes. *Blood* 84:1276 – 1282
- 65 Lublin DM (2005) Review: Cromer and DAF: role in health and disease. *Immunohematol* 21:39 – 47
- 66 Markus HS (2007) Genetics: What is relevant for the stroke physician? *Int J Stroke*. May;2(2):114-7.
- 67 Mayr FB, Spiel AO, Leitner JM, Firbas C, Kliegel T, Jilma-Stohlawetz P, Derendorf H, Jilma B(2008) Duffy antigen modifies the chemokine response in human endotoxemia. *Crit Care Med*36(1): 159
- 68 Micic D, Swink M, Micic J, Klatzko I, Spatz M (1993) The ischemic and postischemic effect on the uptake of neural amino acids in isolated cerebral capillaries. *Experientia*15: 625 – 626
- 69 Murphy PM(2000) Chemokine receptor cloning. *Methods in Molecular Biology* 138: 89-98
- 70 Nalls MA et al.(2008) Admixture mapping of white cell count: genetic locus responsible for lower white blood cell count in the Health ABC and Jackson Heart studies. *Am J Hum Genet*82: 81-87
- 71 Nowicki B, Moulds J, Hull R, Hull S (1988) A hemagglutinin of uropathogenic *Escherichia coli* recognizes the Dr blood group antigen. *Infect Immun*56: 1057 – 1060
- 72 O`Sullivan M(2002) Patterns of cerebral blood flow reduction in patients with ischemic leukoaraiosis *Neurology* 59: 321-326

- 73 O`Sullivan M(2008) Leukoaraiosis. Practical Neurology8: 26-38
- 74 Okada Y, Copeland BR, Mori E, Tung MM, Thomas WS, del Zoppo GJ (1994) P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after brain ischemia and reperfusion. Stroke 25: 202-211
- 75 Oldenburg PA et al. (2000) Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. Science288: 2051- 2054
- 76 Pantoni L(2003) Pathophysiology of cerebral small vessels in cognitive impairment. Int Psychogeriatr15: 59-65
- 77 Parsons SF, Mallinson G, Judson PA, et al(1987) Evidence that the Lub blood group antigen is located on red cell membrane glycoproteins of 85 and 78kd. Transfusion27: 61 – 3
- 78 Parsons SF, Mallinson G, Holmes CH, et al.(1995) The Lutheran blood group glycoprotein, another member of the immunoglobulin superfamily, is widely expressed in human tissues and is developmentally regulated in human liver. Proc Natl Acad Sci92: 5496 – 5500
- 79 Peters A, Palay BL, Webster Hd (1991) The fine structure of the nervous system. Neurons and their supporting cells.3rd ED New York: Oxford University Press. 290-293
- 80 Picker LJ, de los Toyos, Telen MJ, et al (1989) Monoclonal antibodies against the CD44, and PGp-1 antigens in man recognize the Hermes class of lymphocyte homing receptors. J Immunol142: 2046-2051
- 81 Poole J, Tilley L, Warke N et al(2007) Two missense mutation in the CD44 gene encode two new antigens of the Indian blood group system. Transfusion47: 1306 – 1311

- 82 Pries AR, Kuebler WM (2006) Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol* 140: 40
- 83 Pruenster M, Rot A. (2006) Throwing light on DARCBiochem Soc Trans. Dec;34(Pt 6):1005-8.
- 84 Rahuel C, Le Van Kim C, Mattei MG et al (1996) A unique gene encodes spliceoforms of the basal-cell adhesion molecule cell surface glycoprotein of epithelial cancer and of the Lutheran blood group glycoprotein. *Blood* 88: 1865 – 72
- 85 Reich D, et al (2009) Reduced neutrophil count in people of African descent is due to a regulatory variant in the Duffy antigen receptor for chemokines gene. *PLoS Genet.* 5(1): e 1000360
- 86 Reid ME, Lomas-Francis C (2004) *The Blood Group Antigen Facts Book*, 2nd ED, Academic Press, Elsevier
- 87 Reinhold MI, Lindberg FP, Plas D, Reynolds S, Peters MG, Brown EJ (1995) In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47). *J Cell Sci* 108 (Pt 11): 3419 – 3425
- 88 Rot A (2005) Contribution of Duffy antigen to chemokine function. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16: 687 – 694
- 89 Rothwell NJ, Hopkins SJ (1995) Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci* 18 (3): 130-136
- 90 Schmidke KCerebral small vessel disease: how does it progress? *Journal of the Neurological Sciences* (2005) 229 – 230: 13-20

- 91 Schon M, Klein CE, Hogenkamp V(2000) Basal cell adhesion molecule (B-CAM) is induced in epithelial skin tumors and inflammatory epidermis, and is expressed at cell-cell and cell- substrate contact sites.J Invest Dermatol115: 1047 – 1053
- 92 Screatton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI (1992) Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. Proc Natl Acad Sci89: 12160- 12164
- 93 Shen H, Schuster R, Stringer KF, Waltz SE, Lentsch AB(2006) The Duffyantigen/receptor for chemokines (DARC) regulates prostate tumor growthFASEB J.20: 59-64
- 94 Stanimirovic D, Satoh K (2000) Inflammatory mediators of cerebral endothelium: a role in ischemic brain inflammation. Brain Pathol. 10 (1): 113 – 126
- 95 Telen MJ, Hall SE, Green AM, et al (1988) Identification of human erythrocyte blood group antigens on decay-accelerating factor (DAF) and an erythrocyte phenotype negative for DAF.J Exp Med167: 1993 – 1998
- 96 Telen MJ(1995) Erythrocyte blood group antigens: not so simple after all. Blood85: 299-306
- 97 Telen MJ (2005) Erythrocyte Adhesion Receptoers: Blood Group and related Molecules. Transfusion Medicine Reviews19 (1): 32 -44
- 98 Ticchioni M et al (1997) Integrin-associated protein (CD47) is a comitogenic molecule on CD3-activated human T cells. J Immunol158: 677 – 684

- 99 Tournamille C, Colin Y, Cartron JP (1995) Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. *Nat Genet*10: 224-228
- 100 Udani M, Zen Q, Cottmann, et al (1998) Basal cell adhesion molecule / Lutheran protein: the receptor critical for sickle cell adhesion to laminin. *J Clin Invest*101: 2550 – 2558
- 101 Vachon E, Martin R, Plumb J, Kwok V, et al(2006)CD44 is a phagocytic receptor. *Blood*107 (10): 4149 – 4158
- 102 Villa P Triulzi S, Cavalieri B, Di Bitondo R et al (2007) The Interleukin-8 (IL-8/CXCL8) Receptor Inhibitor Reparixin improves neurological deficits and reduces long-term Inflammation in permanent and transient cerebral ischemia in rats. *Mol Med*13 (3-4): 125 – 133
- 103 Ward T, Pipkin PA, Clarkson NA, et al. (1994) Decay-accelerating factor CD55 is identified as the receptor for echovirus 7 using CELICS, a rapid immuno-focal cloning method. *EMBO J* 13: 5070 – 5074
- 104 Wolma J, Nederkoorn PJ (2009) Ethnicity a risk factor? The relation between ethnicity and large- and small-vessel disease in White people, Black people, and Asians within a hospital-based population. *Euro J of Neurology*16: 522 – 527
- 105 Yamasaki Y, Matsuura N, Shozuhara H, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K.(1995) Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke*26: 318 – 322
- 106 Yenari MA, Kunis D, Sun GH, Onley D, Watson L, Turner S, Whitaker S, Steinberg GK.(1998) Hu23F2G, an antibody recognizing the leukocyte

CD11/CD18 integrin, reduces injury in a rabbit model of transient focal cerebral ischemia. *Exp Neurol*153: 223-233

- 107 Zen Q, Cottmann M, Truskey G, et al(1999) Critical factors in basal cell adhesion molecule / Lutheran -mediated adhesion to laminin. *J Biol Chem*274: 728 – 734
- 108 Zen Q, Twyman CA, Telen MJ (2001) Sickle red cell B-CAM / LU mediates adhesion to multiple sites of laminin under different conditions. *Blood*98: 484a- 5a
- 109 Zen Q, Cho J, Lekwauwa RE, et al (2002) B-CAM / LU mediates laminin-independent cell-cell adhesion under both static and flow conditions. *Blood*100: 451a

