

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

**Einfluss des Plasmas anti-erythrozytär autoimmunisierter
Patienten
auf Erythrozyten-Zell-Interaktionen**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von Mahncke, Katharina Marie
aus Minden
2007

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

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

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. W. Sibrowski

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

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2007

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

ZUSAMMENFASSUNG

Einfluss des Plasmas anti-erythrozytär autoimmunisierter Patienten auf Erythrozyten-Zell-Interaktionen

Katharina Marie Mahncke

Anti-erythrozytäre Autoimmunerkrankungen führen bei der transfusionsmedizinischen Versorgung von Patienten häufig zu Komplikationen der Hämotherapie, weil sie ein Risiko der transfusionsassoziierten Alloimmunisierung implizieren. Zur Gewährleistung einer sicheren Hämotherapie ist es notwendig, Mechanismen der Immunisierung gegen erythrozytäre Antigene zu verstehen. Das Verständnis der klinisch-immunologischen Relevanz von Erythrozyten-Zell-Interaktionen in der peripheren Zirkulation im Hinblick auf die Präsentation erythrozytärer Antigene könnte für das Verständnis der Pathophysiologie von Allo- und Autoimmunisierungsprozessen gegen Erythrozytenantigene und deren Prophylaxe von wesentlicher Bedeutung sein. Die vorliegende Arbeit nimmt die offenen Fragen zur Pathophysiologie des Immunisierungsprozesses gegen Erythrozytenantigene zum Anlass, den Einfluss hämotherapeutisch relevanter anti-erythrozytärer Autoantikörper auf Erythrozyten-Zell-Interaktionen unter hämorheologischen und immunologischen Gesichtspunkten im Hinblick auf folgende Aspekte zu untersuchen:

1. Besteht ein Einfluss anti-erythrozytärer Autoantikörper auf hämorheologisch und immunologisch relevante Erythrozyten-Zell-Interaktionen?
2. Ist der Einfluss anti-erythrozytärer Autoantikörper auf Erythrozyten-Zell-Interaktionen funktionell relevant?

Der methodische Ansatz dieser Arbeit kombiniert die biomolekulare Interaktionsanalyse und die Genexpressionsanalyse mit cDNA-Chips. Die biomolekulare Interaktionsanalyse erlaubt die markierungsfreie und zeitaufgelöste Messung der Bindung von Biomolekülen. Zur Untersuchung von Zell-Zell-Interaktionen wurde das offene Küvetten-System eines IAsys®-single-well-Instrumentes eingesetzt. Die Genexpressionsanalyse wurde mit cDNA-Chips der Firma Memorec durchgeführt.

Im Ergebnis zeigte sich: Anti-erythrozytäre Wärmeautoantikörper vermindern die Erythrozyten-Zell-Interaktion an mikrovaskulären Endothelzellen, nicht aber an dendritischen Zellen des peripheren Blutes, statistisch signifikant: Enthält das Wärmeautoantikörperhaltige Plasma zusätzlich anti-erythrozytäre Alloantikörper, ist der die Erythrozyten-Zell-Interaktion abschwächende Effekt des Wärmeautoantikörper enthaltenden Plasmas teilweise aufgehoben. Die Präsenz anti-erythrozytärer Kälteautoantikörper beeinflusst weder die Erythrozyten-Zell-Interaktion an mikrovaskulären Endothelzellen noch die an dendritischen Zellen. Die Erythrozyten-Zell-Interaktion in Gegenwart von autoantikörperhaltigem Plasma im Vergleich zur Erythrozyten-Zell-Interaktion in Gegenwart von Normalplasma führt zu charakteristischen Veränderungen des Genexpressionsprofils der mit den Erythrozyten interagierenden Zellen. Ein wesentliches Ergebnis der Analyse der 20 Gene, die mit höchster Signifikanz durch Wärmeautoantikörper und durch Kälteautoantikörper unterschiedlich reguliert werden, zeigt, dass unter Einfluss von Wärmeautoantikörpern die immunologische Balance in Richtung einer proinflammatorischen Immunantwort verschoben sein könnte.

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

- Plasma von Wärmeautoimmunhämolyse-Patienten vermittelt eine signifikant verminderte Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion im mikrovaskulären System im Vergleich zu Normalplasma ($p < 0.0001$), während Plasma von Kälteautoimmunhämolyse-Patienten eine ähnlich starke Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion vermittelt wie Normalplasma.
- Die Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion induziert spezifische Genexpressionsprofile in den Endothelzellen in Abhängigkeit von der eingesetzten Plasmapräparation.
- Das experimentelle Design dieser Studie erlaubt die Identifizierung verschiedener Marker-Gene für immunologisch und hämorheologisch relevante Erythrozyten-Zell-Interaktionen.
- Der im Rahmen der vorgelegten Arbeit etablierte experimentelle Ansatz ist damit prinzipiell geeignet, die Rolle anti-erythrozytärer Autoantikörper für immunologisch und hämorheologisch relevante Erythrozyten-Zell-Interaktionen zu beschreiben und die Rolle mikrovaskulärer Endothelzellen bei der Entstehung anti-erythrozytärer Immunantworten zu untersuchen.

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2007

Inhaltsübersicht

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Hämorheologie | 1 |
| 1.1.1 | Bedeutung der Hämorheologie im Kontext der Hämotherapie | 1 |
| 1.1.2 | Hämorheologisch relevante Einflussgrößen | 1 |
| 1.1.2.1 | Erythrozyten | 3 |
| 1.1.2.2 | Thrombozyten | 5 |
| 1.1.2.3 | Leukozyten | 7 |
| 1.1.2.4 | Endothelzellen | 8 |
| 1.1.2.5 | Blutplasma | 14 |
| 1.2 | Erythrozyten-Zell-Interaktionen im peripheren Blut | 15 |
| 1.2.1 | Erythrozyten-Leukozyten-Interaktionen | 15 |
| 1.2.2 | Erythrozyten-Thrombozyten-Interaktionen | 17 |
| 1.2.3 | Erythrozyten-Endothelzell-Interaktionen | 17 |
| 1.3 | Bedeutung anti-erythrozytärer Autoantikörper für hämorheologische Fragestellungen | 21 |
| 1.3.1 | Anti-erythrozytäre Wärmeautoantikörper | 21 |
| 1.3.2 | Anti-erythrozytäre Kälteautoantikörper | 22 |
| 1.4 | Die Antigenpräsentation: Immunologisch offene Fragen zur anti-erythrozytären Autoimmunisierung | 23 |
| 1.5 | Fragestellung der Arbeit | 26 |
| 2 | Material und Methoden | 28 |
| 2.1 | Untersuchung von Erythrozyten-Zell-Interaktionen unter Real-Time-Bedingungen mit Biosensor-Technologie | 28 |
| 2.1.1 | Funktionsprinzip des IAsys®-Gerätes | 28 |
| 2.1.2 | Immobilisierung der Liganden | 30 |
| 2.1.2.1 | Immobilisierung der Endothelzellen | 30 |
| 2.1.2.2 | Immobilisierung der dendritischen Zellen und der Monozyten | 32 |
| 2.1.3 | Messzyklus | 34 |
| 2.1.4 | Herkunft und Eigenschaften der verwendeten Blutpräparate | 36 |
| 2.1.4.1 | Charakterisierung der eingesetzten Erythrozyten | 36 |
| 2.1.4.2 | Charakterisierung der verwendeten Plasmen | 36 |

| | | |
|----------|---|----|
| 2.1.5 | Herkunft und Isolierung der untersuchten Zielzellen | 37 |
| 2.1.5.1 | Monozyten | 37 |
| 2.1.5.2 | Dendritische Zellen | 38 |
| 2.1.5.3 | Endothelzellen | 39 |
| 2.2 | Untersuchung der funktionellen Bedeutung der Erythrozyten-Zell-Interaktion mit Gen-Chip-Analytik | 42 |
| 2.2.1 | Untersuchung des Einflusses von Erythrozyten und unterschiedlichen Blutplasmen auf die Genexpression von Monozyten oder Endothelzellen mittels PIQOR™ Immunology Microarray | 42 |
| 2.2.1.1 | Präparation der RNA | 44 |
| 2.2.1.2 | Amplifikation der <i>messenger</i> RNA | 47 |
| 2.2.1.3 | Hybridisierungen der PIQOR™ Microarrays | 47 |
| 2.2.1.4 | Erstellung der Expressionsprofile | 48 |
| 2.2.2 | Datenanalyse | 50 |
| 3 | Ergebnisse | 52 |
| 3.1 | Untersuchung von Erythrozyten-Zell-Interaktionen unter Real-Time-Bedingungen mit Biosensor-Technologie | 52 |
| 3.1.1 | Messung der Erythrozyten-Zell-Interaktionen: Etablierung der biomolekularen Interaktionsanalytik | 52 |
| 3.1.1.1 | Reproduzierbarkeit der einzelnen Messungen | 54 |
| 3.1.1.2 | Reproduzierbarkeit der Messungen über den gesamten Untersuchungszeitraum | 54 |
| 3.1.1.3 | Messung von Bindungsintensitäten in Abhängigkeit von der Temperatur des Systems (20°C versus 37°C) | 55 |
| 3.1.2 | Einfluss der anti-erythrozytären Autoantikörper auf die Interaktion der Erythrozyten mit mikrovaskulären Endothelzellen und mit dendritischen Zellen | 57 |
| 3.1.2.1 | Einfluss der anti-erythrozytären Autoantikörper auf die Interaktion der Erythrozyten mit mikrovaskulären Endothelzellen | 57 |
| 3.1.2.2 | Einfluss der anti-erythrozytären Autoantikörper auf die Interaktion der Erythrozyten mit dendritischen Zellen | 59 |
| 3.1.3 | Einfluss der anti-erythrozytären Autoantikörper auf die Interaktion der Erythrozyten mit mikrovaskulären Endothelzellen und dendritischen Zellen im Vergleich | 61 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 3.2 | Untersuchung der funktionellen Bedeutung der Erythrozyten-Zell-Interaktion mit Gen-Chip-Analytik | 62 |
| 3.2.1.1 | Einfluss des Plasmas anti-erythrozytär autoimmunisierter Patienten auf das Genexpressionsprofil von mikrovaskulären Endothelzellen im Kontext der Erythrozyten-Zell-Interaktion | 63 |
| 3.2.1.2 | Einfluss des Plasmas anti-erythrozytär autoimmunisierter Patienten auf das Genexpressionsprofil von Monozyten im Kontext der Erythrozyten-Zell-Interaktion | 67 |
| 3.2.2.1 | Vergleichende Analyse des Einflusses anti-erythrozytärer Wärme- und Kälteautoantikörper auf die während der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion regulierten Endothelzell-Gene | 72 |
| 3.2.2.2 | Vergleichende Analyse des Einflusses anti-erythrozytärer Wärme- und Kälteautoantikörper auf die während der Erythrozyten-Monzyten-Interaktion regulierten Monozyten-Gene | 73 |
| 3.2.3 | Analyse des Einflusses anti-erythrozytärer Wärme- und Kälteautoantikörper auf die regulierten Gene in mikrovaskulären Endothelzellen und Monozyten im Hinblick auf die verschiedenen immunologischen Funktionsgruppen | 74 |
| 4 | Diskussion | 76 |
| 4.1 | Untersuchung von Erythrozyten-Zell-Interaktionen unter Real-Time-Bedingungen mit Biosensor-Technologie | 79 |
| 4.2 | Untersuchung der funktionellen Bedeutung der Erythrozyten-Zell-Interaktion mit Gen-Chip-Analytik | 81 |
| 4.3 | Zusammenfassung und Ausblick | 84 |
| 5 | Abkürzungsverzeichnis | 85 |
| 6 | Abbildungsverzeichnis | 87 |
| 7 | Tabellenverzeichnis | 90 |
| 8 | Literaturverzeichnis | 92 |
| 9 | Lebenslauf | 100 |
| 10 | Danksagung | 101 |

1 Einleitung

1.1 Hämorheologie

1.1.1 Bedeutung der Hämorheologie im Kontext der Hämotherapie

Hämotherapeutische Maßnahmen können erhebliche Auswirkungen auf die Fließeigenschaften des Blutes haben. Durch die Einführung des therapeutischen Prinzips der „Hämotherapie nach Maß“ konnten durch Vollbluttransfusionen induzierte hämorheologisch ungünstige Effekte verringert werden: Noch Anfang der 80er Jahre war die Vollbluttransfusion weitgehend gebräuchlich. Bei diesem Verfahren wurde beispielsweise bei einem anämischen Patienten neben den Erythrozyten unnötigerweise auch die Zahl der Thrombozyten erhöht und somit gegebenenfalls eine unerwünschte Thrombenbildung provoziert. Mittlerweile ist die Therapie mit Blutkomponenten üblich, bei der dem Patienten ausschließlich die klinisch erforderliche Einzelkomponente in speziellen Konservierungslösungen zugeführt wird. Durch diese Vorgehensweise können die Fließeigenschaften des Blutes berücksichtigt und gegebenenfalls sogar optimiert werden. Zudem leistet die Therapie mit Blutkomponenten einen wesentlichen Beitrag zur Einsparung der knappen Ressource Blut [51, 52, 141, 145].

1.1.2 Hämorheologisch relevante Einflussgrößen

Substanzen werden nach ihren mechanischen Eigenschaften in Festkörper, Flüssigkeiten und viskoelastische Stoffe eingeteilt. Die Flüssigkeiten, so auch Blut, sind dadurch gekennzeichnet, dass eine von außen konstant einwirkende Kraft zur kontinuierlichen plastischen Deformation, d. h. zum Fließen, führt. Zu unterscheiden sind Newtonsche Flüssigkeiten (z. B. Öl oder Wasser), auf die das Newtonsche Gesetz („eine lineare Beziehung besteht zwischen einwirkender Kraft und resultierendem Fluss“) angewendet werden kann, von Nicht-Newtonschen Flüssigkeiten, die kein lineares Kraft-Fluss-Verhältnis aufweisen. Blut ist ein flüssiges Organ mit vielfältigen Funktionen im Stoffwechsel des Organismus. Es besteht aus korpuskulären und nicht korpuskulären Anteilen. Das nicht korpuskuläre Element ist Blutplasma. Als Träger von Abwehr- und Transportfunktionen enthält es eine Fülle von Proteinen und Komponenten, die z. B. dem Blutgerinnungs-, Fibrinolyse- und Komplementsystem angehören. Im Blut wird daneben eine Vielzahl von niedermolekularen Stoffen befördert, wie z. B. die Energieträger Glukose, Laktat, Ketonkörper, Fett-, Aminosäuren

oder auch ausscheidungspflichtige Stoffe. Zu den korpuskulären Anteilen des Blutes gehören die Erythrozyten, die auf den Transport von O_2 und CO_2 spezialisiert sind und zudem wichtige Funktionen z. B. bei der Aufrechterhaltung des Gefäßtonus haben [41, 42, 118] sowie die Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten, welche für Abwehrreaktionen bedeutsam sind und schließlich die unter anderem für die Blutgerinnung und auch für die angeborene Immunabwehr essentiellen Thrombozyten [60, 61, 69].

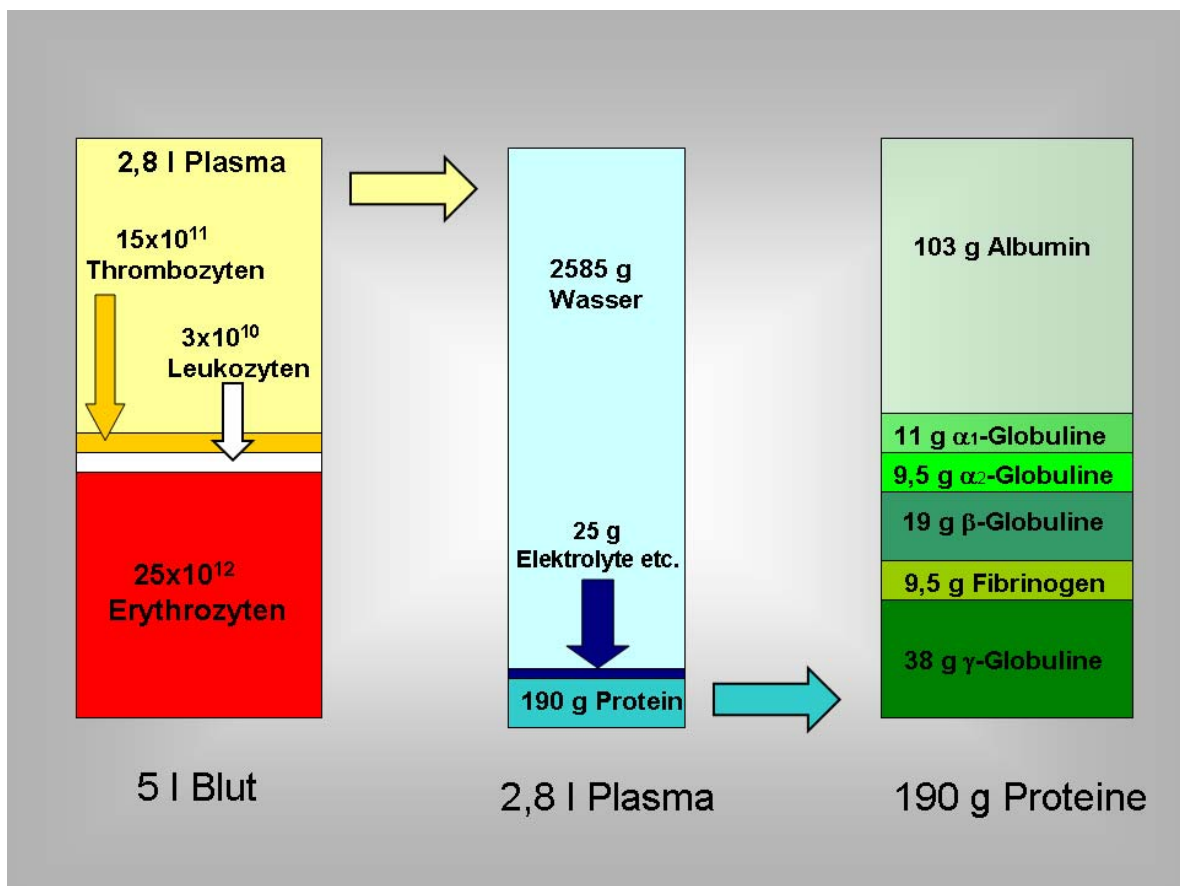


Abbildung 1: Schematische Darstellung der quantitativen Zusammensetzung des Blutes (links), des Blutplasmas (Mitte) sowie der Plasmaproteine (rechts) modifiziert nach P. Deetjen und E.-J. Speckmann, Physiologie [26]

Die Viskosität des Blutes stellt eine komplexe inkonstante Größe dar und wird vor allem vom Hämatokrit und von der Viskosität des Plasmas, die ihrerseits von der Konzentration der Plasmaproteine abhängig ist, bestimmt. Während das nicht korpuskuläre Element Blutplasma als wässriges Medium annähernd Newtonsches Fließverhalten zeigt, ist Vollblut durch ein Nicht-Newtonsches Fließverhalten gekennzeichnet. Das Fließverhalten des Blutes ist somit nicht nur von der Temperatur

abhängig, wie es beim Fließverhalten z. B. von Wasser oder Öl der Fall ist, sondern auch von anderen Parametern, wie der Deformierbarkeit und Aggregationsneigung der Erythrozyten, so dass kein lineares Verhältnis zwischen einwirkender Kraft und resultierendem Fluss besteht. Mechanisch gesehen verhalten sich die Blutzellen wie Flüssigkeitstropfen. Sie sind jedoch von Membranen umhüllt, die elastisches Fremdkörperverhalten aufweisen und den Blutzellen komplexe mechanische Qualitäten verleihen. Die Viskosität des Blutes ist bei schneller Strömung, wenn hohe Schubspannungen auf das Blut einwirken, relativ niedrig, steigt bei langsamer Strömung aber beträchtlich an. Erythrozyten neigen zur Axialmigration, d. h., dass sie sich in der Strömungsmitte bewegen, so dass eine zellarme Randströmung entsteht. In Gefäßen, die dem Durchmesser eines Erythrozyten (6–8 µm) entsprechen, wird der Reibungswiderstand minimiert, während in größeren Gefäßen die Reibung der Zellen aneinander zunimmt und somit die Blutviskosität steigt. Dieser so genannte Fahreus-Lindquist-Effekt ist der Grund dafür, dass die Viskosität des Blutes in englumigen Gefäßen der Kreislaufperipherie deutlich niedriger ist als in Gefäßen größeren Durchmessers [126].

1.1.2.1 Erythrozyten

Die Erythrozyten machen anteilig nahezu 50% des Blutes aus und stellen mit 4-6 Millionen Zellen/µl den mengenmäßig bedeutendsten Teil der korpuskulären Elemente des Blutes dar. Die Gesamtmenge der Erythrozyten im menschlichen Blut beträgt $2,5 \times 10^{13}$. Die Lebensdauer der Erythrozyten in der Zirkulation beträgt 110-130 Tage. Da die Erythrozyten bei Säugetieren kern- und mitochondrienlose Zellen sind, fehlen ihnen Stoffwechsellmöglichkeiten wie membrangebundene Biosynthesen (z. B. die Lipidsynthese) und sauerstoffverbrauchende Stoffwechselprozesse, Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung, Replikation, Transkription sowie Proteinbiosynthese. Daher sind Erythrozyten ausschließlich auf die Glykolyse angewiesen. Ihre spezifische Aufgabe, den Transport von O₂ und CO₂, erfüllen sie mit Hilfe des Transportproteins Hämoglobin, das in der Lage ist, O₂ unter dem hohen O₂-Partialdruck in der Lunge reversibel zu binden. Die Erythrozyten sind nicht zuletzt aufgrund ihrer hohen Konzentration entscheidend für die rheologischen Eigenschaften des Blutes. Im physiologischen Zustand lagern sich die Erythrozyten bei geringen Strömungskräften geldrollenartig (*rouleaux*) zusammen. Dieses reversible Phänomen ist vermutlich durch die Adsorption langgestreckter großmolekularer Proteine des Plasmas an die Membranoberfläche benachbarter Erythrozyten bedingt [126]. Die z. B. bei

entzündlichen Prozessen vermehrt sezernierten Plasmaproteine wie Fibrinogen, α 2-Makroglobulin oder andere Globuline der Akute-Phase-Reaktion fördern die Aggregation, so dass bei einem entzündlichen Prozess eine erhöhte Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) beobachtet werden kann. Darüber hinaus erfüllen Erythrozyten noch eine Vielzahl weiterer Funktionen. Sie sind Träger biologischer Funktionen, die aus der Interaktion mit anderen Zellen resultieren. Es konnte beobachtet werden, dass Erythrozyten die durch ADP oder Kollagen induzierte Thrombozytenaggregation hemmen [86, 95], gleichzeitig aber die Thrombozytenaktivierung durch Komponenten, die nach kollageninduzierter Aktivierung freigesetzt werden, intensivieren [131]. Erythrozyten können die Apoptose von neutrophilen Granulozyten hemmen sowie die T-Zell-Adhäsion am Endothelium regulieren [87, 88, 92] und durch exogene Sauerstoffradikale induzierte Zellschäden in Zellkulturen reduzieren können [1]. Viele dieser Funktionen erfüllen sie durch ihr potentes antioxidatives System und ihre Fähigkeit, O_2 - und Nitrogen-Radikale zu zersetzen [1, 107, 121]. Die Vermutung, dass Erythrozyten die Expression von Genen modulieren, die in Zusammenhang mit Apoptose und der Regulation des Zellzyklus stehen, wird durch die Fähigkeit der Erythrozyten, in Zellteilung befindliche Zellen zu beeinflussen, gestützt. So konnte in einigen Studien bestätigt werden, dass Erythrozyten *in vitro* regulierend auf die Proliferation aktivierter T-Zellen einwirken [3, 35-37]. Darüber hinaus sind Erythrozyten für die Hämostase von Bedeutung. Ursprünglich wurden die hämostatischen Eigenschaften der Erythrozyten ihrer ADP-Freisetzung zugesprochen. Dieser Mediator verstärkt die Thrombozytenaktivierung und lockt weitere Thrombozyten an den Ort des Geschehens. Heute ist bekannt, dass die hämostatische Wirkung von Erythrozyten zugleich auf der Interaktion des intakten Erythrozyten mit einem aktivierten Thrombozyten beruht [115]. Die Erythrozyten nehmen Einfluss auf metabolische Eigenschaften des Thrombozyten. Erythrozyten steigern die Freisetzung von Serotonin, das vasokonstriktorisch wirkt, aus Thrombozyten und modifizieren die Eicosanoidformation. Die verschiedenen zellulären Komponenten des Thrombus bilden eine Art „metabolische Brücke“ [79]. Eine weitere Eigenschaft der Erythrozyten kann sich begünstigend auf die Hämostase auswirken: Durch die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO), das auch *endothelium derived relaxing factor* (EDRF) genannt wird und ein erst in jüngerer Zeit in seiner Bedeutung erkanntes intra- und interzelluläres Signalmolekül ist, sind Endothelzellen in der Lage, die Kontraktilität der Gefäße zu beeinflussen. Die Bildung von NO wird durch Stimulation des entsprechenden Rezeptors mittels Gewebshormonen, aber auch durch

die kontinuierlich auf das Endothel einwirkende Schubspannung getriggert [126]. Auch Eisen-Nitrosyl-Hämoglobin, Nitrit-Ionen und die Erythrozytenmembran können potentielle Quellen von NO sein. NO diffundiert in das die Endothelzelle umgebende Gewebe und bewirkt dort über die Aktivierung einer löslichen Guanylatcyclase [126] eine Erschlaffung der glatten Muskulatur. Gleichzeitig tritt NO aber auch in das zirkulierende Blut über und kann dort mit dem erythrozytären Hämoglobin reagieren [118]. Die Reaktion mit den Hämgruppen des Hämoglobins führt zur sofortigen Zerstörung des NO und bewirkt die Oxidation von O₂ zu Methämoglobin. Über diesen Mechanismus sind Erythrozyten in der Lage, dem relaxierenden NO-Effekt entgegen zu wirken und wirken somit durch die gesteigerte Kontraktion des Gefäßes begünstigend auf die Hämostase ein. Negativ wirkt sich diese Reaktion im Rahmen der Therapie mit freien Hämoglobinlösungen aus, da Methämoglobin im Gegensatz zu Hämoglobin kein O₂ mehr binden kann. Die Isolation des Hämoglobins in Erythrozyten durch die erythrozytäre Membran reduziert die Reaktionshäufigkeit von Hämoglobin mit NO um den Faktor 1000 oder mehr. Nicht alle Reaktionen mit Hämoglobin zerstören das NO-Molekül. NO kann ebenso mit desoxygeniertem Hämoglobin zu anderen Hämoglobinformen reagieren, wie Eisen-Nitrosyl-Hämoglobin und S-Nitrosehämoglobin. Falls diese Reaktionen reversibel wären, könnte das Hämoglobin auch als Carrier für NO fungieren und somit eine entscheidende Komponente des kardiorespiratorischen Zyklus darstellen. Andere Studien stellen die Hypothese auf, dass sich S-Nitrosehämoglobin aus Hämoglobin und NO vorwiegend in Geweben mit hoher O₂-Sättigung bildet. Das derart gebundene NO wird an Orten mit geringer O₂-Sättigung aus dem S-Nitrosehämoglobin freigesetzt, bewirkt eine Vasodilatation und erhöht somit die O₂-Sättigung des Gewebes. Dieser Zusammenhang zwischen der O₂-Sättigung des Gewebes und der NO-Bindung des Hämoglobins weist auf die Möglichkeit hin, dass Erythrozyten auf die O₂-Sättigung von Geweben reagieren und via Gefäßregulation die Sauerstoffversorgung des Gewebes kontrollieren [118]. Diese These wird allerdings durch andere Forschungsgruppen in Frage gestellt, da die Bildung von S-Nitrosehämoglobin viel geringer ist als ursprünglich angenommen wurde [58] und die Verbindung überdies aufgrund intrazellulärer Reduktion relativ instabil ist [43, 54].

1.1.2.2 Thrombozyten

Thrombozyten haben eine Lebensdauer von nur 8-10 Tagen. Sie enthalten, wie die Erythrozyten, keinen Zellkern und bestreiten ihren Energiebedarf hauptsächlich durch

anaerobe Glykolyse. Thrombozyten stehen in ständigem Kontakt mit der Gefäßwand (hydrodynamische Margination) und reagieren sehr sensibel auf lokale Wandveränderungen. Sie sind von großer Wichtigkeit für den Mechanismus der Hämostase, indem sie bei Kontakt mit Kollagen, Laminin oder Fibronectin unter dem Endothel eines beschädigten Blutgefäßes nach visköser Metamorphose mit Hilfe eines spezifischen Kollagenrezeptors, dem Glykoprotein Ia/IIa, an Kollagen binden und aggregieren. Die Adhäsion bewirkt die Thrombozytenaktivierung. Die Thrombozyten sezernieren den von-Willebrandt-Faktor (vWF), der die Anheftung der Thrombozyten an die Gefäßwand festigt. Der so gebildete Thrombus erhält die notwendige Festigkeit durch die plasmatische Gerinnung. Zudem sezernieren Thrombozyten Stoffe, die vasokonstriktorisch wirken (Serotonin, PDGF=*platelet-derived growth factor*, TXA₂=Thromboxan A₂). Somit verlangsamen sie den Blutstrom und erleichtern die Adhäsion. Gleichzeitig werden Stoffe sezerniert, die weitere Thrombozyten an den Ort des Endothelschadens rekrutieren (ADP, TXA₂, PAF=*platelet-activating factor*). Neue Daten zeigen darüber hinaus eine bisher unbekannte Funktion der Thrombozyten im Rahmen der Immunabwehr [61]. So werden zusätzlich antimikrobielle Stoffe sezerniert, die so genannten *platelet-derived microbial peptides* (PMP) oder Thrombozide, die die Eliminierung pathogener Substanzen unterstützen [128, 143]. Ein anderer antimikrobieller Mechanismus ist die Produktion von Sauerstoffradikalen [142]. Die Formation von Thrombozytenmembranen an Kontaktflächen mit Thrombozyten-Bakterien-Assoziaten ermöglicht funktionellen NADPH-Oxidase-Komplexen die Produktion von Sauerstoffradikalen. Neben der Interaktion mit IgG-Komplexen über den Rezeptor FcγIIA [122] sind Thrombozyten am klassischen und alternativen Weg der Komplementaktivierung beteiligt. Sie binden aktivierte Komplementfragmente direkt über spezifische Oberflächenrezeptoren und können so mit Immunkomplexen in Verbindung treten [39, 96]. Ein weiterer Mechanismus im Rahmen der Immunfunktion von Thrombozyten ist die direkte Phagozytose von mikrobiellen Pathogenen [21, 22, 74]. Dieses Phänomen könnte einerseits zur Beseitigung der Pathogene beitragen, könnte allerdings auch bewirken, dass Pathogene anderen Wirkmechanismen des Immunsystems entgehen [144]. Auch über die Interaktion mit Leukozyten nehmen die Thrombozyten Einfluss auf die Immunantwort. Die Thrombozyten fungieren als Stimuli auf Leukozyten und vaskuläre Zellen, indem sie hochpotente inflammatorische Mediatoren wie Chemokine oder Zytokine sezernieren [14, 146]. Darunter zählen das inflammatorische Makrophagen-Protein 1α (MIP1α, CCL3) und der Thrombozytenfaktor 4 (PF4, CXCL4) zu den wirkungsvollsten Mediatoren [7].

Thrombozyten sind ferner in der Lage, die Extravasation von Leukozyten zu fördern, indem sie sich an das beschädigte Endothel heften und als ideale Anheftungsstelle für die Leukozyten dienen.

1.1.2.3 Leukozyten

Als Leukozyten werden alle kernhaltigen Zellen des Blutes bezeichnet, die kein Hämoglobin enthalten und sich bei Vitalbeobachtung in dem den Erythrozyten aufsitzenden Saum (*buffy coat*) als weiß gegen die roten Blutkörperchen abheben. Die Gesamtzahl der Leukozyten beträgt beim Gesunden etwa 4.500–10.000 Zellen/ μ l. Die Häufigkeit der verschiedenen Leukozytenpopulationen kann im peripheren Blut unter physiologischen Bedingungen stark variieren. Es lassen sich zwei Populationen (Pools) von Leukozyten in der Blutbahn unterscheiden, der marginale und der zirkulierende Pool. Die Bezeichnungen gründen sich auf die Tatsache, dass einige Zellen, vor allem Granulozyten, reversibel an der Gefäßwand haften und deshalb langsamer zirkulieren. Gegebenenfalls kann der marginale Pool zugunsten des zirkulierenden Pools rekrutiert werden, z. B. durch die Ausschüttung von Katecholaminen.

Es wird zwischen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten differenziert. Alle Leukozyten erfüllen ihre Funktionen im Rahmen der Abwehr von körperfremdem Material und der Entsorgung auch von körpereigenen Zellen. Neutrophile Granulozyten werden durch Chemotaxine in geschädigtes Gewebe gelockt. Dort betätigen sie sich zusammen mit den Gewebsmakrophagen als Phagozyten. Eosinophile Granulozyten sind für allergische Reaktionen von Bedeutung. Ihre Emigration erfolgt durch Stimulierung mit Hilfe eosinotaktischer Substanzen (z. B. Histamin und C5a). Auch basophile Granulozyten können im Rahmen allergischer Reaktionen eine Rolle spielen. Bei der Entsorgung von fremden und auch von körpereigenen Zellen, vor allem über den Mechanismus der Phagozytose, spielen die Monozyten und die nach dem Verlassen der Blutbahn im Gewebe zu Makrophagen ausdifferenzierten Monozyten eine wesentliche Rolle. Über die phagozytierende Funktion hinaus sind Monozyten und Makrophagen in der Lage, Zytokine und Chemokine zu produzieren. Lymphozyten vermitteln wesentlich die zelluläre (T-Lymphozyten) und die humorale (B-Lymphozyten) Immunreaktion. Eine dritte Gruppe von Lymphozyten sind die natürlichen Killerzellen (NK). Sie sind unter anderem an der antikörperabhängigen Zytotoxizität beteiligt [57, 75].

1.1.2.4 Endothelzellen

Alle Blutgefäße haben einen gemeinsamen Bauplan. Die Intima besteht aus dem Endothel, einem geschlossenen einschichtigen Verband flacher Zellen, die üblicherweise auf einer Basalmembran ruhen und aus dem subendothelialen Bindegewebe mit zarten Kollagenfasern und feinen elastischen Netzen. Die Faserzüge und die Endothelzellen sind vornehmlich in Richtung des Blutstroms angeordnet. Das Endothel ist die entscheidende Instanz für den Gasaustausch zwischen Blut und Gefäßwand. Damit es nicht zur intravasalen Gerinnung kommt, ist es unabdingbar, dass die Endothelschicht unversehrt ist.

Endothelzellen sind flache Zellen, die sich zu einem Rohr zusammenfügen und untereinander durch Zonulae occludentes (*tight junctions*) und Nexus (*gap junctions*) verbunden sind. Der Zellkern der Endothelzellen wölbt die Zelloberfläche in das Gefäßlumen vor. Das Zytoplasma der Endothelzellen ist durch Vimentinfilamente und ca. 0,6 µm große Weibel-Palade-Körperchen gekennzeichnet. Durch ihre Lage zwischen den peripheren Geweben und dem zirkulierenden Blutstrom besitzen Endothelzellen eine Position, die es ihnen ermöglicht, zahlreiche wichtige Funktionen wahrzunehmen. Dabei ist zu beachten, dass Endothelzellen in den verschiedenen Gefäßabschnitten (arterielles System, venöses System, Mikrozirkulation) trotz eines gemeinsamen Bauplanes spezifische strukturelle und funktionelle Charakteristika aufweisen, die ihre Funktion entscheidend prägen [16]. Die Abbildung 2 veranschaulicht die typischen Merkmale der Endothelzellen in den verschiedenen Gefäßabschnitten.

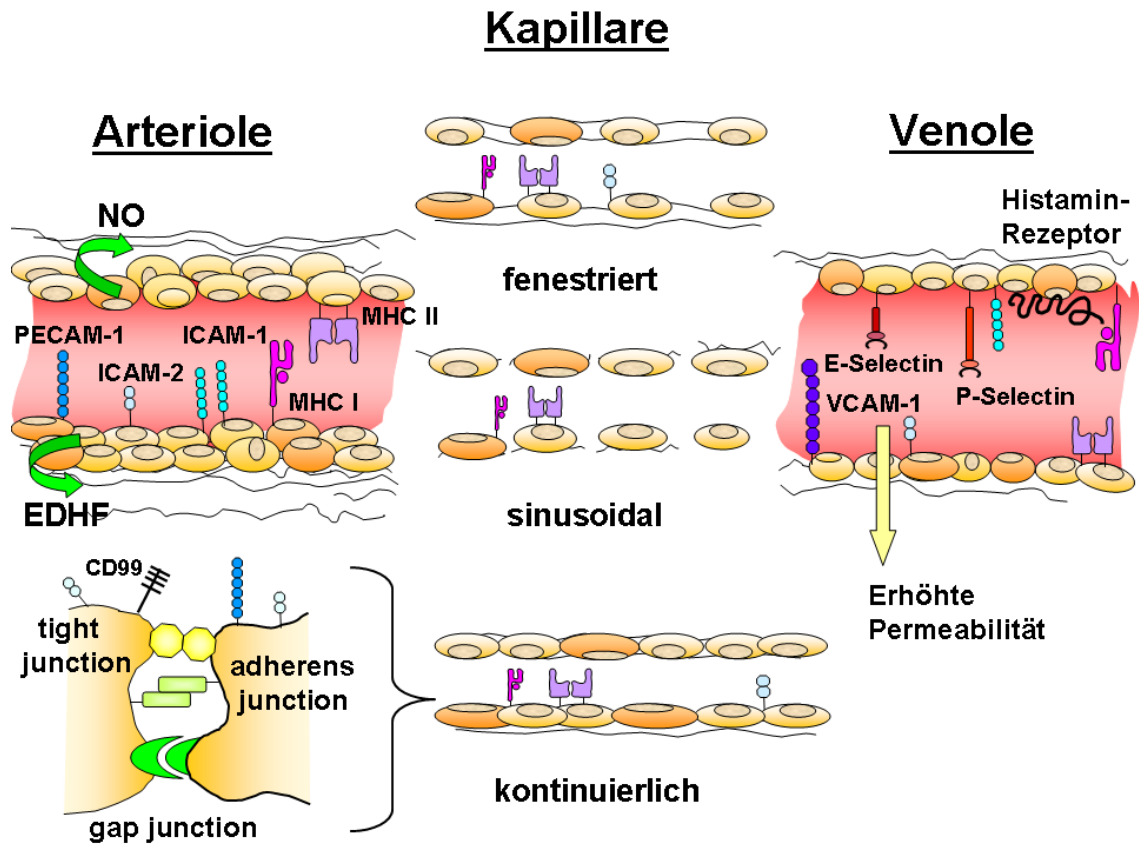


Abbildung 2: Heterogenität der Endothelzellen modifiziert nach Choi et al. [16]

Arterielle Endothelzellen sind effiziente Produzenten von gefäßwirksamen Substanzen, wie zum Beispiel Stickstoffmonoxid (NO). Venöse Endothelzellen tragen indessen eine Vielzahl leukozytärer Adhäsionsmoleküle, wie E-Selektin, P-Selektin sowie das vaskuläre Adhäsions-Molekül-1 (VCAM-1) [24, 85, 106]. Sie exprimieren zahlreiche Rezeptoren, die auf gefäßwirksame Substanzen, wie Histamin ansprechen, das die venösen Gefäße zum maßgeblichen Schauplatz des Flüssigkeitsaustritts im Rahmen entzündlicher und allergischer Reaktionen macht [53]. Venöse Gefäße sind darüber hinaus in der Lage, sich in unterschiedlichen Geweben zu spezialisieren. Ein besonders bemerkenswertes Beispiel für die Spezialisierung der venösen Zellen sind die Endothelzellen in Lymphknoten und lymphoidem Gewebe der Mukosa, welche die Adhäsion und Transmigration naiver T-Lymphozyten ermöglichen [13]. Der Stoffaustausch von Atemgasen und Metaboliten spielt sich insbesondere in den 7-8 µm durchmessenden Kapillaren ab. Das Endothel der Kapillaren kommt im menschlichen Organismus in drei verschiedenen Varianten vor (siehe Abbildung 3). Einen erleichterten Stoffaustausch ermöglicht das fenestrierte Endothel mit intrazellulären Poren, während das kontinuierliche Endothel ohne Fenestrierung den Stoffaustausch

erschwert. Von großer Bedeutung ist das kontinuierliche Endothel z. B. im Rahmen der Blut-Hirn-Schranke. Eine Sonderform der Kapillaren sind die sinusoidalen Kapillaren mit intrazellulären Lücken im Endothel und einer ebenfalls diskontinuierlichen Basalmembran. Sie erlauben den Durchtritt großer Moleküle und Partikel (z. B. in Leber und Knochenmark) [16, 59]. Im Kontext hämotherapeutischer Einflüsse auf die Rheologie des Blutes ist insbesondere das mikrovaskuläre System von hoher Bedeutung.

Das Gefäßendothel nimmt eine Vielzahl physiologisch essentieller Funktionen wahr:

- Regulation der Hämorrheologie:

Unter physiologischen Bedingungen beeinflussen Endothelzellen die Hämostase durch verschiedene Mechanismen. Endothelzellen aktivieren Antithrombin III [9, 16], und inhibieren die Aktivität des *tissue factors* [11]. Sie konvertieren Thrombin durch Bindung von Thrombomodulin und konvertieren den Aktivator des prokoagulativen Fibrinogens zum antikoagulativen Aktivator des Protein C [29]. Zudem bewirken sie die Initiierung der Fibrinolyse durch Sekretion des Plasminogen-Aktivators. Diese Abläufe werden durch die von Endothelzellen produzierten gefäßwirksamen Substanzen NO und Prostaglandin (Autokaide) unterstützt [104]. Zytokine hingegen können zu einer prothrombotischen Wandlung der Endothelzellen führen. Der Tumornekrosefaktor (TNF) aktiviert beispielsweise die endotheliale Synthese prokoagulatorischer Proteine, wie *tissue factor* (TF) und *plasminogen activator inhibitor-1* [83]. Studien konnten die Vorstellung, dass das Endothelium mikrovaskulärer Gefäße von einer Glykokalixschicht bedeckt ist, die entscheidende Auswirkungen auf die vielfältigen Funktionen der Endothelzellen hat und Einfluss auf den mikrovaskulären Fließwiderstand nimmt, bestätigen. Es ist davon auszugehen, dass die Zusammensetzung des Plasmas die Funktionen der Endothelzellen modifiziert, indem sie die Struktur der Glykokalix verändert [99-101]. Die Injektion von Heparinase in das Gefäßsystem von Ratten bewirkte eine Abnahme des Fließwiderstandes, während Veränderungen des Gefäßdurchmessers oder der Blutviskosität ausgeschlossen werden konnten. Es ist anzunehmen, dass die Veränderungen des Fließwiderstandes Veränderungen der Glykokalix widerspiegeln. Die Reduktion des Fließwiderstandes liegt höchstwahrscheinlich in einer Reduktion der Glykokalix-Schichtdicke begründet, die eine Zunahme des effektiven Gefäßdurchmessers zur Folge hat. Die Struktur der Glykokalix verändert sich reaktiv in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des

Plasmas. Somit sind die Endothelzellen durch Modifikation der Schichtdicke ihrer Glykokalix, die wiederum durch die Komposition des Plasmas beeinflusst wird, entscheidend für den Fließwiderstand im Gefäßsystem [101, 105, 119, 137].

- Regulation des Gefäßtonus:

Die Regulation des Gefäßtonus wird durch humorale Faktoren vermittelt. Auf das gefäßdilatierende Stickstoffmonoxid wurde im Abschnitt *Erythrozyten* (1.1.2.1) vorab näher eingegangen. Prostacyclin, das ebenso im Endothel gebildet wird, wirkt vasodilatierend und hemmt die Thrombozytenaggregation.

- Wundheilung:

Im Rahmen der Wundheilung sichern Endothelzellen die essentielle Wiederherstellung der Gefäßstrukturen, indem sie in die primär von adhären den Thrombozyten gedeckte Endothelläsion immigrieren und die Läsion unter gesteigerter DNA-Synthese und vermehrter Zellteilung schließen.

- Kapilläre Mikrozirkulation:

Die kapilläre Mikrozirkulation ermöglicht den für den Organismus lebenswichtigen Austausch von Atemgasen, Nährstoffen, Stoffwechselprodukten und Flüssigkeiten. Die Voraussetzungen für eine hohe kapilläre Austauschrate schaffen die Kapillaren durch große Austauschflächen, dünne Gefäßwände sowie starke Aufzweigungen der Gefäße, die kurze Diffusionswege und niedrige Blutströmungsgeschwindigkeiten gewährleisten.

- Tumorgenese:

Endothel schafft die Voraussetzungen zur hämatogenen Metastasierung. Einzelne Tumorzellen lösen sich vom Haupttumor ab und gelangen, durch einen fibrinösen Thrombozytenbelag gegen das Immunsystem geschützt, in die Blutbahn. Mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen heften sich die Tumorzellen an das Gefäßendothel, destruieren die Basalmembran und dringen in das umliegende Gewebe ein.

- Entzündung und Mediatorstoffwechsel:

Endothelzellen sezernieren Entzündungsmediatoren, wie den plättchenaktivierenden Faktor (PAF) und verschiedene Zytokine, die entzündungswirksame Mechanismen anregen. Diese Stoffe fördern die Aggregation von Thrombozyten, aktivieren

Granulozyten und Monozyten, bewirken die Ausschüttung von Histamin und Serotonin, induzieren Fieber und die Synthese von Leukotrienen und Prostaglandinen.

- Angiogenese:

Die antagonistische Rolle bei Neogenese und Wiederherstellung des vaskulären Systems übernehmen die Endothelzellen mittels zwei unterschiedlicher Wachstumsmechanismen. Bei der so genannten Vaskulogenese aggregieren die Endothelzellen in einem von Angioblasten vorgeformten Rohr, während bei der so genannten Angiogenese bestehende endotheliale Rohre proliferieren. Wachsendes Gefäßendothel rekrutiert glatte Muskelzellen und Perizyten in Abhängigkeit von PDGF-B (*platelet-derived growth factor B*) und stimuliert im Rahmen der Lymphangiogenese die Vermehrung von lymphatischen Endothelzellen [56].

- Immunologisches System/Antigenpräsentation:

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll besonderes Gewicht auf die in den letzten Jahren zunehmend evident werdende Funktion der Endothelzellen im Rahmen der Präsentation von Antigenen gelegt werden. Humane vaskuläre Endothelzellen stehen in direktem Kontakt mit T-Zellen und tragen MHC I und MHC II Komplexe auf ihrer Oberfläche. Während MHC I Moleküle auf allen kernhaltigen Zellen des Organismus exprimiert werden, werden MHC II Proteine nur auf so genannten antigenpräsentierenden Zellen exponiert. Diese Zellen können Antigene nach Bindung an entsprechende Rezeptoren durch Endozytose aufnehmen und mit Hilfe von Lysosomen zu Peptiden fragmentieren, anschließend an MHC II-Komplexe binden, vesikulär in die Plasmamembran translozieren und mit Hilfe der MHC-Komplexe dem T-Zellrezeptor der T-Lymphozyten präsentieren [75]. So sind Endothelzellen maßgeblich an der Rekrutierung von im Blut zirkulierenden T-Lymphozyten in Entzündungsgebiete des peripheren Gewebes beteiligt [4, 97, 111]. Einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der antigenpräsentierenden Funktion der Endothelzellen hat die Arbeitsgruppe von Chervonsky in den letzten Jahren geleistet: Aktivierte insulin-spezifische CD8⁺ T-Zellen (*IS-CD8⁺ cells*) dringen in den Pankreas ein, zerstören β -Zellen und verursachen Diabetes in *Diabetes-prone NOD mice*. Überraschenderweise verursachen CD8⁺ T-Zellen (*IS-CD8⁺ cells*) aber auch Diabetes in Mauslinien, die frei von Entzündungsereignissen im Pankreas sind. Die Arbeitsgruppe Chervonsky stellte daraufhin die Hypothese auf, dass die spezifische Rekrutierung von CD8⁺ T-Zellen durch Inselzellen zum Teil von der Erkennung der

MHC-Komplexe bzw. präsentierten Peptid-Komplexen der pankreatischen Endothelzellen abhängt, die das Antigen Insulin von β -Zellen erwerben. Die inselzellspezifische Rekrutierung der CD8+ T-Zellen war bei Mäusen, die keine MHC I-Moleküle exprimierten oder deren Insulinsekretion beeinträchtigt war, aufgehoben. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass CD8+ T-Zellen pankreatische Endothelzellen in Inselorgan-Kulturen direkt identifizieren können. Die Triggerung von CD8+ T-Zell-Rezeptoren führte zu einer vermehrten Expression von Integrinen seitens der Endothelzellen [70, 82, 98]. Die Chervonsky-Studie weist darauf hin, dass Endothelzellen autologe Antigene direkt präsentieren und somit zum maßgeblichen Faktor im Kontext autoimmuner Erkrankungen, wie z. B. Diabetes mellitus Typ I, werden können [116]. Gleichzeitig scheinen die T-Zellen dazu befähigt zu sein, sowohl durch direkten Zellkontakt als auch durch humorale Faktoren die Endothelzellfunktion zu modulieren. Zu den Funktionen, die durch T-Zellen moduliert werden, zählen Aufrechterhaltung sowie Wiederherstellung der Blutgefäßstruktur, Regulation der Zirkulation und der Fließeigenschaften des Blutes, Regulation der Permeabilität und Hämostase, Rekrutierung inflammatorischer Leukozyten und Antigenpräsentation [16]. Darüber hinaus sind Endothelzellen nach Transplantation von vaskularisiertem Gewebe die ersten Zellen des Transplantates, die mit den Lymphozyten des Wirts zusammen treffen und tragen einen großen Anteil im Rahmen der Initialisierung der Abstoßungsreaktion. Immunantworten gegen das Endothel sind von besonderer Bedeutung, da sie zu vaskulären Umbauprozessen und zur Entwicklung von Artherosklerose führen können [111].

Abbildung 3 stellt die zahlreichen und verschiedenartigen Funktionen des Endothels zusammenfassend dar.

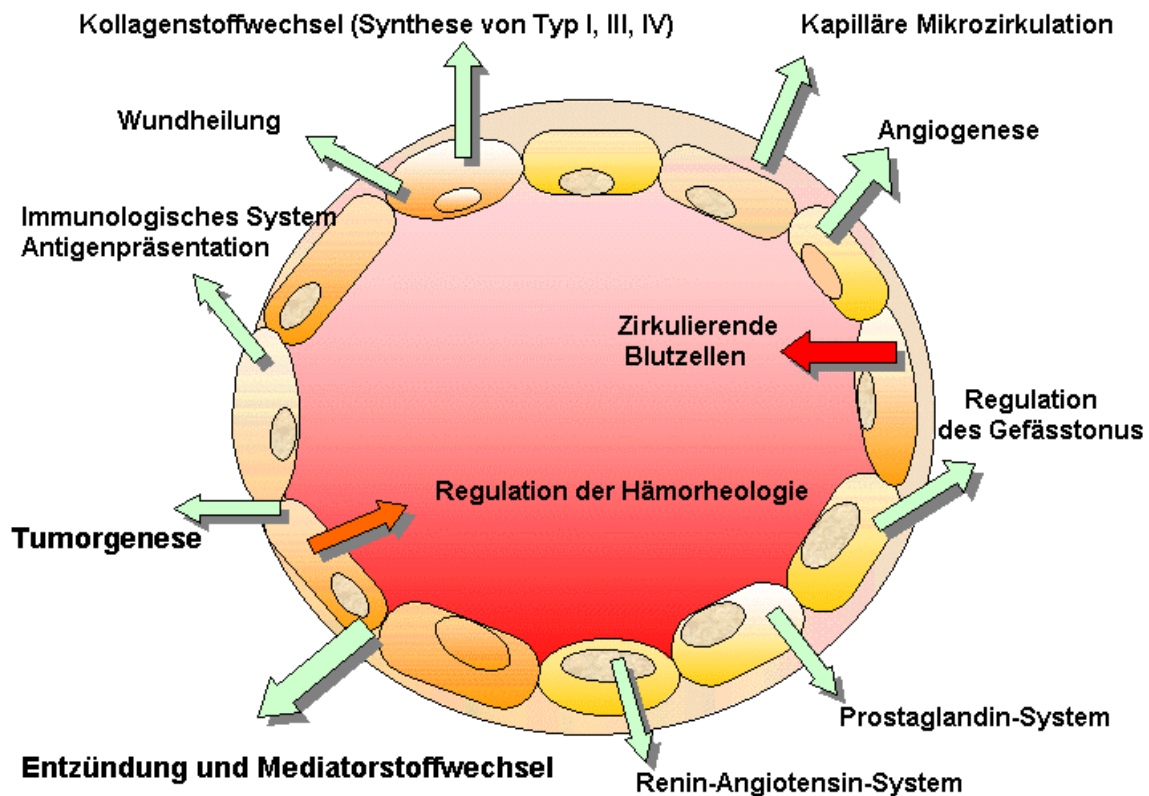


Abbildung 3: Darstellung der physiologischen Bedeutung der Endothelzellen anhand ihres Interaktionsradius modifiziert nach Thilo et al. [129]

1.1.2.5 Blutplasma

Das Blutplasma, also die nicht korpuskulären Bestandteile des Blutes, lassen sich in hochmolekulare Bestandteile, wie Proteine und Lipoproteine, niedermolekulare Bestandteile, wie vor allem Glukose, Laktat, Ketonkörper, Fettsäuren, Aminosäuren und ausscheidungspflichtige Stoffe, wie z. B. Harnstoff, Harnsäure, Kreatin, Kreatinin und Verbindungen wie z. B. Alkali- und Erdalkalimetalle sowie Spurenelemente gliedern. Das Blutplasma beinhaltet weit über 100 verschiedene Proteine, die größtenteils Glykoproteine sind. Nach ihrer Funktion werden die Plasmaproteine in mehrere Gruppen unterteilt. Eine wichtige Funktion im Rahmen der Regulation von Immunfunktionen übernehmen die Immunglobuline, das Komplementsystem sowie die Proteine der Hämostase und Fibrinolyse einschließlich ihrer Inhibitoren. Eine weitere Funktion, die Proteine im Plasma erfüllen ist die des Transportes anderer Proteine oder

hydrophober Verbindungen im Blut, wie z. B. das Albumin oder das α 2-Haptoglobin, welches für den Transport von Hämoglobin im Blut zuständig ist. Für den Transport der verschiedenen Lipide im Blut sind spezielle Lipoproteine verantwortlich. Schließlich ist das Plasma Träger der Puffereigenschaften des Blutes.

1.2 Erythrozyten-Zell-Interaktionen im peripheren Blut

In vitro Experimente haben gezeigt, dass die physikalischen und biologischen Eigenschaften einer Zelle entscheidend durch die Interaktion mit einer anderen Zelle beeinflusst werden können [81]. Erythrozyten stehen in der peripheren Zirkulation in Interaktion mit einer Vielzahl unter immunologischen Aspekten wichtiger Zellen wie Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen, und Erythrozyten-Zell-Interaktionen sind von Bedeutung für eine Reihe klinisch relevanter Prozesse, die im folgenden weiter charakterisiert werden sollen.

1.2.1 Erythrozyten-Leukozyten-Interaktionen

Ein klinisch-immunologisch relevanter Effekt von Erythrozyten-Leukozyten-Interaktionen wurde zunächst im Zusammenhang mit Erythrozytentransfusionen bemerkt. Es wurde beobachtet, dass das T-Lymphozyten-Wachstum durch das Mitogen Phytohämagglutinin in Anwesenheit von autologen Erythrozyten *in vitro* gesteigert war [94]. Der immunsuppressive Effekt von Bluttransfusionen wurde erstmalig in den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts bemerkt. Patienten, die vor einer Organtransplantation transfundiert wurden, zeigten seltener Abstoßungsreaktionen und äußerten gleichzeitig verringerte Lymphozytenantworten auf Mitogene [34, 91, 94]. Dieser immunsuppressive Effekt dauerte über Wochen an und konnte durch eine erneute Transfusion intensiviert werden [34]. Studien, die bei einer Mehrheit von regelmäßig transfundierten Patienten eine reduzierte CD4+/CD8+ T-Zellen-Ratio registrierten, deklarieren als Hypothese eine vergrößerte CD4+ T-Zell-Population, die eine Reduktion der zytotoxischen CD8+-Aktivität bewirkt, als Hintergrund des immunsuppressiven Effektes [10, 20, 64]. Die transfusionsabhängig geminderte CD8+ T-Zell-Aktivität wird von einer gesteigerten monozytären Prostaglandin-Synthese begleitet [62, 63]. Da Prostaglandin sowohl die CD8+ Supressor-Zellen aktiviert [27, 33] als auch die Entwicklung von CD4+ T-Zellen fördert [65, 125], ist die Schlussfolgerung zulässig, dass der Mediator an den komplexen Mechanismen, die zu der transfusionsassoziierten Immunsuppression führen, beteiligt ist. Ein verstärkter immunsuppressiver Effekt zeigt sich im Anschluss an Transfusionen mit Erythrozyten-

Präparaten, die wenigstens hinsichtlich eines HLA-DR Antigens mit dem Empfänger übereinstimmen [110]. So genannte *mismatched*-Transfusionen, bei denen zwischen Spender und Empfänger keine HLA-DR-Übereinstimmung besteht, erbringen einen signifikant geringfügigeren immunsuppressiven Effekt [19]. Der gesteigerte immunsuppressive Effekt im Rahmen der partiell HLA-DR-kongruenten-Transfusion wird auf die besonders starke Induktion von CD4+ T-Zellen, die Allopeptide des Blutspenders als eigene (*self*) HLA-DR erkennen und die zytotoxischen CD8+ T-Zellen supprimieren, zurückgeführt [110]. Die durch Erythrozyten gesteigerte T-Zell-Proliferation lässt sich im experimentellen System auf eine reduzierte Apoptoserate zurückführen [136]. Dieser Effekt ist bedingt durch die Neutralisierung von T-Zellen produzierter, apoptotisch wirksamer reaktiver Sauerstoffspezies durch Erythrozyten. Parallel zur reduzierten Apoptoserate wurde eine gesteigerte Zellteilungsrate festgestellt [35], die auf die Interaktion von CD2 auf T-Lymphozyten und CD58 auf Erythrozyten zurückgeführt werden kann, und die – neben der verminderten Apoptoserate - eine höhere Überlebensrate der T-Zellen bedingt [63, 102]. Die beschriebenen Effekte sind im experimentellen System nur bei aktivierten T-Zellen nachweisbar. Die Untersuchungsergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass das T-Zell-Wachstum bei Erkrankungen mit veränderter CD4+/CD8+-Ratio durch Erythrozyten reguliert werden könnte. Darüber hinaus können Erythrozytentransfusionen die Anzahl der B-Lymphozyten und die Immunglobulinsekretion beeinflussen [2, 40]. So wurde bei multipel transfundierten Patienten mit β -Thalassämie eine signifikant gesteigerte B-Lymphozyten-Population mit immunglobulinhaltigem Zytoplasma gegenüber Probanden aus der gesunden Bevölkerung (Laborpersonal), die keine Transfusion erhalten hatten, nachgewiesen [2]. Diese Patienten hatten einen signifikant gesteigerten Anteil an B-Lymphozyten ($p < 0.001$), die zytoplasmatisches Immunglobulin enthielten, wenn sie direkt nach der Isolation untersucht wurden. Diese Zellpopulationen zeigten im Rahmen dieser Studie allerdings kein Wachstum hinsichtlich der immunglobulinsezernierenden Zellen. Andere Studien belegten die B-Lymphozyten-Stimulation im Rahmen der Transfusion mit Hilfe zahlreicher diagnostischer Parameter, wie der Analyse von Oberflächen-Membran-Immunglobulinen, zirkulierender Immunkomplexe und der Quantifizierung von Serum-Immunglobulinen [40].

1.2.2 Erythrozyten-Thrombozyten-Interaktionen

Die Erkenntnis, dass Erythrozyten in den Gerinnungsvorgang involviert sind, stützt sich auf Beobachtungen anämischer Patienten, die parallel zur Anämie eine verlängerte Blutungszeit aufwiesen, welche sich mit Therapie und Besserung der Anämie ebenfalls normalisierte [80]. Anscheinend ist dieser Effekt abhängig von einer metabolischen Eigenschaft des intakten Erythrozyten, die durch die Interaktion des Erythrozyten mit einem aktivierten Thrombozyten provoziert wird und zu einer gesteigerten Thrombozytenaktivierung mit zum Beispiel gesteigerter Serotoninsekretion und vermehrter Rekrutierung von Thrombozyten führt. Sobald der intakte Erythrozyt sekretorischen Stoffen von Thrombozyten ausgesetzt ist, wird er zum prohämostatischen und prothrombotischen Faktor [80].

1.2.3 Erythrozyten-Endothelzell-Interaktionen

Studien *in vitro* haben gezeigt, dass die Adhäsion von Erythrozyten an Endothelzellen unter physiologischen Bedingungen und der Einwirkung von Scherkräften, wie sie in Venolen, Kapillaren und Arteriolen physiologischerweise anzutreffen sind, in der Anwesenheit eines Albumin-Puffers sehr gering ist [55, 123]. In Gegenwart autologen Plasmas ist die Adhäsion von Erythrozyten an Endothelzellen im Vergleich zur Anwesenheit des Albumin-Puffers zwar um das 5-fache gesteigert, kann jedoch ebenfalls als gering bezeichnet werden [50, 90, 124]. Der Großteil der bisher veröffentlichten Daten zur Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion bezieht sich auf pathologisch veränderte Erythrozyten, d. h. Erythrozyten mit Membranveränderungen. Es ist anzunehmen, dass eine abnorm gesteigerte Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion im engen Zusammenhang mit mikrovaskulären Gefäßverschlüssen steht, die charakteristisch sind für Krankheiten mit pathologisch veränderten Erythrozyten, wie z. B. die Sichelzellanämie [23, 50]. Zahlreiche Mechanismen für die Adhäsion membranveränderter Erythrozyten an Endothelzellen sind bereits identifiziert worden [18]. Inflammationsmarker und Zelladhäsionsmoleküle sind bei Sichelzellpatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen gesteigert [84]. Das Oberflächenantigen CD40 auf Endothelzellen von Sichelzellpatienten war in der Sichelzellkrise auf das über 2-fache gesteigert ($p=0.02$) und ähnlich hohe Steigerungen wurden für E-Selektin ($p=0.008$), ICAM-1 ($p=0.037$) und VCAM-1 registriert [6, 113]. Ferner wurde eine gesteigerte P-Selektin-Expression auf Endothelzellen beschrieben [28, 84, 140]. Darüber hinaus wurde die signifikant verstärkte Expression des von-Willebrandt-Faktors beschrieben [89]. Andere Studien erfassten auch eine Steigerung der

Erythrozytenadhäsion an Laminin in der Sichelzellkrise. [93, 135]. Die Sichelzellanämie ist eine angeborene schwere hämolytische Anämie, die durch eine Hämoglobinopathie verursacht wird und durch eine Mutation in Position 6 der β -Kette des Globins entsteht ($\beta 6 \text{ Glu} \rightarrow \text{Val}$). Typisch für die Sichelzellanämie ist die Kombination von Hämolyse und Infarkten, die durch Gefäßverschlüsse im Bereich der Mikrozirkulation entstehen. Neben der Darbietung aller Symptome einer hämolytischen Anämie mit erheblichem Sauerstoffdefizit finden sich Infarzierungen, die zu abdominellen Krisen, Knochennekrosen, Lungeninfarkten und ZNS-Krisen mit Lähmungen, Krämpfen und Koma führen. Bis vor einiger Zeit wurde allein die sichelförmige Deformierung der Erythrozyten für die Gefäßverschlüsse verantwortlich gemacht, doch zahlreiche Studien weisen darauf hin, dass die gesteigerte Endothelzelladhäsion der Sichelzellerythrozyten zu den vasookklusiven Phänomenen beiträgt. In die Sichelzelladhäsion an das Endothel sind zahlreiche rezeptorvermittelte Prozesse involviert, die durch hochregulierte Adhäsionsmoleküle auf aktivierten Endothelzellen potenziert werden können [84]. Neben dem okklusiven Effekt der Erythrozyten-Zell-Interaktion könnte eine gesteigerte Kontaktaufnahme der Erythrozyten mit Endothel im Rahmen hämolytischer Störungen neben anderen Faktoren, wie z. B. der erhöhten Membranfragilität, zur vorzeitigen Fragmentierung und Zerstörung der Erythrozyten beitragen. Sichelzellen adhären an das Gefäßendothel nicht nur häufiger als gesunde Erythrozyten [123, 124], sie adhären zudem auch stärker hinsichtlich der Intensität der Bindung [124]. So berichtet eine Studie, dass die Adhäsion der Sichelzellen an Endothel um etwa 50% stärker ausgeprägt ist als die Endotheladhäsion gesunder Erythrozyten [90]. Besonders ausgeprägt ist die Adhäsionsneigung in Gefäßen mit geringen Scherkräften wie in Venen oder Sinus, in denen es zu einem verlängerten Erythrozyten-Endothelzell-Kontakt kommt [55]. Die Erythrozyten von Sichelzellpatienten erweisen sich selbst dann als endotheladhärent, wenn Scherkräfte auf die Interaktion einwirken, die über den hohen, *in vivo* in infarktprädisponierten Gebieten der Mikrozirkulation auftretenden Scherkräften liegen [12, 90]. Neben der veränderten Erythrozytenmembran trägt auch das Blutplasma zur gesteigerten Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion bei der Sichelzellanämie bei. Dieser Effekt zeigt sich besonders deutlich in der Sichelzellkrise. In Studien konnte gezeigt werden, dass 90% der Sichelzellerythrozyten in Anwesenheit von autologem Plasma an Endothelzellen adhären [90]. Unter dem Einfluss von Normalplasma reduzierte sich die Adhäsionsfraktion der Sichelzellen auf 20%. Gleichzeitig wurde beobachtet, dass auch die Adhäsionsneigung gesunder Erythrozyten in Gegenwart des Plasmas von

Sichelzellanämiepatienten, das während einer Sichelzellkrise entnommen wurde, gegenüber Normalplasma geringfügig gesteigert war [90]. Dieser adhäsionsfördernde Effekt des Plasmas von Sichelzellanämiepatienten wird bereits durch frühere Studien von Hebbel et al. [50] beschrieben. Denkbar wäre, dass Plasma als Modulator der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion fungiert, da anzunehmen ist, dass Eigenschaften der Erythrozytenmembran nach dem Retikulozytenstadium relativ konstant bleiben [49]. Als eine Komponente im Plasma, die für den adhäsionsfördernden Effekt des Plasmas von Sichelzellanämiepatienten verantwortlich ist, werden unter anderem Fibrinogen [31, 32, 72] sowie Thrombin [78] diskutiert. Im Gegensatz zur Hämolyse bei der Sichelzellanämie scheint eine gesteigerte Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion im Kontext der hämolytischen Mechanismen der hereditären Sphärozytose und der Thalassämie keine Rolle zu spielen, da Studien keine erhöhte Adhäsion der Erythrozyten dieser Patienten an Endothelzellen zeigen konnten [123]. Im Gegenteil wurde bei der Thalassämie, der ein Mangel an α - oder β -Hämoglobinketten zugrunde liegt, eine verminderte Adhäsionsneigung der veränderten Erythrozyten an Endothelzellen beobachtet. Auch die sphärozytischen Erythrozyten, welche sich als kleine dichte Scheiben darstellen, adhären, möglicherweise bedingt durch eine reduzierte Kontaktfläche, in geringerem Maße als normale Erythrozyten am Endothel [123].

Gesteigerte Erythrozyten-Endothelzell-Interaktionen scheinen zum physiologischen Erythrozytenabbau mitbeizutragen. Bereits in den 80er Jahren beschrieben Studien eine gesteigerte Adhäsionsneigung gealterter Erythrozyten an Endothelzellen [123]. Der Hintergrund dieses Phänomens ist vermutlich ein immunologischer Mechanismus [66-68, 90]. Durch eine verstärkte Bindung von IgG an der Oberfläche gealterter Erythrozyten werden diese an Zellen des phagozytotischen Systems an der Gefäßwand und an Endothelzellen gebunden [17]. Bei der Erythrozytenalterung kommt es zur vermehrten Verlagerung des membranständigen Phosphatidylserins von der Zellinnenseite auf die Außenseite der Zellmembran [23]. Studien haben gezeigt, dass die Exposition von Phosphatidylserin (PS) in Abhängigkeit von Ca^{2+} eine massive Neigung zur Endotheladhäsion der Phosphatidylserin exprimierenden Zelle zur Folge hat [8]. Eine Erkrankung, bei der es zur gesteigerten PS-Externalisation kommt, ist die chronische Urämie [8]. Durch die Inkubation der Erythrozyten des Urämikers mit Annexin V oder PS-haltigen Liposomen konnte die Asymmetrie der Phospholipidverteilung in der Erythrozytenmembran wiederhergestellt werden. In der

Folge war die Adhäsion der Erythrozyten am Endothel signifikant gemindert. Nach Bonomini et al. ist die Adhäsionsfrequenz bei urämischen Patienten um ein Vielfaches größer als bei normalen Erythrozyten und korreliert deutlich mit dem Anteil der PS-exponierenden Erythrozyten [8]. Ein weiterer Faktor, der die Erythrozyten-Endothel-Adhäsion im Rahmen der Urämie begünstigt, mag die regelmäßige Assoziation der Urämie mit Gefäßschäden sein, die ebenfalls eine adhäsionssteigernd Wirkung haben. Eine Reihe weiterer Faktoren mit Einfluss auf die Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion wurde untersucht. Die Hypothese, dass die Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion durch einen reduzierten pH-Wert und ein folglich verändertes Bindungsverhalten der Plasmaproteine an die Erythrozytenmembran beeinflusst wird, konnte nicht bestätigt werden [124]. Hyperosmolarität des Plasmas kann zu einer gesteigerten Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion beitragen [124]. Beschädigtes Gefäßendothel spielt eine entscheidende Rolle bei pathologisch veränderten Erythrozyten-Endothelzell-Interaktionen z. B. im Rahmen diabetischer Erkrankungen [49]. Einen Hinweis zur physiologischen Bedeutung von Erythrozyten-Endothelzell-Interaktionen gibt der in einzelnen klinischen Studien realisierte Einsatz künstlicher Sauerstoffträger. Als Basis artifizieller Sauerstoffträger werden in der Regel stromafreie Hämoglobinlösungen verwendet. Klinisch relevante Nachteile der freien Hämoglobinlösungen stehen auch mit dem Fehlen der Erythrozytenmembran in Verbindung und können somit Aufschluss über die physiologische Rolle der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion geben. In allen Tier- und Humanstudien kam es nach Infusion von freiem Hämoglobin zu einem Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) [77]. Für diesen MAP-Anstieg wird vornehmlich der *scavenging*-Effekt des Hämoglobins auf NO verantwortlich gemacht [103]. Der vasokonstringierende Effekt sowie eine gesteigerte Produktion von Sauerstoffradikalen durch infundierte freie Hämoglobine führen zu einer Störung der Mikrozirkulation. Weiterhin wurde nach Infusion freier Hb-Lösungen ein genereller Tonusanstieg der Sphinkteren beobachtet. Dieses Phänomen geht vermutlich auf eine Modulation der relaxierenden NO-Wirkung zurück. Im Überblick scheinen die entscheidenden Mängel der freien Hb-Lösungen, die durch das Fehlen der erythrozytären Membran hervorgerufen werden, in der fehlenden Regulation von Zell-Zell-Kontakten zu bestehen.

1.3 Bedeutung anti-erythrozytärer Autoantikörper für hämorheologische Fragestellungen

Autoantikörper werden gegen Autoantigene, körpereigene Strukturen, gebildet. Folgen der Autoimmunisierung können Autoimmunkrankheiten sein. Unter physiologischen Bedingungen ist ein Organismus immunologisch tolerant hinsichtlich der autologen Gewebe. Dieses bemerkenswerte Phänomen der Immuntoleranz lässt sich im physiologischen Zustand bezüglich aller Körperzellen und -gewebe beobachten und wird durch eine Reihe von Mechanismen getragen [57]. Die Ursachen einer Autoantikörperbildung können vielfältig sein. Ein Auslöser für die Autoantikörperbildung kann z. B. eine Entzündung sein, bei der es durch chemische Einflüsse zu geringfügigen Konformationsänderungen körpereigener Antigene kommt, die in ihrer veränderten Form nicht mehr als selbst (*self*) erkannt werden können, sondern als fremd (*non-self*) erfasst werden. Weitgehend bleiben die Antigeneigenschaften aber erhalten, so dass die unter Entzündung formierten Antikörper oft auch mit dem nativen Antigen reagieren können. Eine weitere Ursache der Autoantikörperbildung kann ein defektes Immunsystem sein, das die Mechanismen der Immuntoleranz nicht mehr aufrechterhalten kann. So genannte kreuzreaktive Antigene, z. B. von Bakterien, Protozoen oder Nahrungsmitteln, die den körpereigenen Antigenen ähnlich sind, können die Bildung so genannter kreuzreaktiver Antikörper induzieren, die gegen das Fremdantigen gerichtet sind und wegen der Ähnlichkeit der Struktur gleichzeitig mit dem körpereigenen Antigen reagieren. Von großer Bedeutung sind Antikörper gegen die eigenen Blutzellen. Immunreaktionen gegen Leukozytenoberflächenstrukturen führen zu Granulozytopenie und Agranulozytose [45]. Beim systemischen Lupus erythematoses treten Antikörper gegen Leukozytenkernbestandteile (antinukleäre Antikörper) auf [45]. Antikörper gegen Zytoplasmastrukturen von neutrophilen Granulozyten und Monozyten sind bei 60% der Patienten mit Wegener-Granulomatose nachweisbar [45]. Zudem besteht die Möglichkeit, dass Antikörper gegen Thrombozytenoberflächenstrukturen gebildet werden. In der Folge kann es zu einer immunologisch bedingten Zerstörung der Thrombozyten mit einer lebensbedrohlichen Thrombozytopenie kommen [45]. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Autoantikörpern, die gegen Erythrozytenmembranstrukturen gebildet werden und die zur erworbenen hämolytischen Anämie führen.

1.3.1 Anti-erythrozytäre Wärmeautoantikörper

Bei 70% aller Patienten mit autoimmunhämolytischer Anämie handelt es sich um eine so genannte Wärmeautoimmunhämolyse, bei der die Ursache der Erkrankung zu 45%

idiopathisch ist. 55% der Wärmeautoimmunhämolysen entstehen sekundär im Rahmen proliferativer maligner Erkrankungen des hämatopoetischen Systems wie des Non-Hodgkin-Lymphoms (NHL) oder der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL), im Rahmen anderer Autoimmunerkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematoses (SLE), medikamentös induziert, z. B. durch Penicilline, Cephalosporine, α -Methyldopa und Diclofenac, oder getriggert durch Virusinfekte [45]. Die Wärmeautoantikörper sind vom Typ IgG, IgM oder IgA [25]. Anti-erythrozytäre Wärmeautoantikörper weisen ein besonderes Charakteristikum auf, das diagnostisch und hämotherapeutisch relevant ist: Die Antikörper sind in der Regel panreaktiv, d. h. sie reagieren mit autologen und allogenen Erythrozyten gleichermaßen und damit auch mit allen zu transfundierenden Spendererythrozyten. Diese Panreaktivität weist darauf hin, dass Wärmeautoantikörper in der Regel an eine Membranstruktur der Erythrozyten binden, die entweder nicht polymorph ist oder deren Polymorphismus nicht zur Feinspezifität des Epitops der von Wärmeautoantikörpern erkannten erythrozytären Antigene beiträgt [127]. Nur in einigen wenigen Fällen lässt sich eine exklusive Spezifität definieren. Diese Spezifität ist dann in der Regel mit den bereits oben erwähnten erythrozytären Autoantigenen des Rhesuskomplexes, der Bande 3 assoziierten Antigene, sowie des Glykophorins A assoziiert [73]. Eine Spezifitätszuweisung bedarf jedoch einiger Zurückhaltung, da es sich bei Wärmeautoantikörpern häufig um so genannte *mimicking autoantibodies* handelt. Diese Autoantikörper binden nicht nur an die das entsprechende Antigen tragenden Erythrozyten. Sie gehen darüber hinaus mit Erythrozyten Reaktionen ein, die das entsprechende Antigen nicht auf ihrer Oberfläche besitzen [138, 139].

1.3.2 Anti-erythrozytäre Kälteautoantikörper

Anteilig 15% der Patienten mit autoimmunhämolytischer Anämie leiden an einer autoimmunhämolytischen Anämie durch Kälteautoagglutinine vom Typ IgM [45]. Kälteautoagglutinine können in seltenen Fällen auch vom Typ IgG, oder noch seltener vom Typ IgA sein. Das Temperaturoptimum der Kälteautoagglutinine liegt bei 0-4°C. Kälteautoagglutinine sind mit niedrigem Titer physiologischerweise bei allen Menschen vorhanden, aber wegen des niedrigen Titers und der auf den 0-4°C beschränkten Temperaturamplitude klinisch nicht von Bedeutung [45]. Bei Patienten mit einer autoimmunhämolytischen Anämie durch Kälteagglutinine zeigt sich ein weit höherer Antikörpertiter sowie eine in der Regel deutlich verbreiterte Temperaturamplitude. Kälteautoimmunhämolysen treten im Gefolge akuter infektiöser Erkrankungen, z. B.

nach Mykoplasmenpneumonie oder Mononukleose und in Begleitung lymphoproliferativer Krankheiten, wie z. B. Morbus Waldenström, auf [109]. Indirekte Hinweise auf Kälteagglutinine im Blut können Schwierigkeiten bei der Blutentnahme durch Agglutination der Erythrozyten in der Punktionskanüle, Schwierigkeiten bei der Erythrozytenzählung, bei der Anfertigung eines glatten Blutausriches und bei der Kreuzprobe sein. Zur Diagnosestellung der Kälteautoimmunhämolyse kann wie üblich die Anamnese Aufschluss geben. Wie schon angeführt, gehören die Kälteautoantikörper ganz überwiegend dem Isotypen IgM an [109]. IgM ist als Pentamer in der Lage, das Komplementsystem bis hin zur Bildung des Membranangriffskomplexes vollständig zu aktivieren [57]. Die Bindung des Kälteautoagglutinins findet in der Regel in den peripheren Kapillaren statt, da die dort herrschenden Temperaturen im Allgemeinen niedriger sind als im Körperkern. Bei der Rezirkulation der IgM-beladenen Erythrozyten in die Körperkernregion kann sich der IgM-Autoantikörper von den Erythrozyten, die noch nicht durch den Membranangriffskomplex intravasal lysiert wurden, in Abhängigkeit von seiner Temperaturamplitude wieder ablösen, während die Komplementproteine, insbesondere C3d, an der Zellmembran auch unter 37°C Bedingungen verbleiben. Kälteautoagglutinine erkennen ganz überwiegend die Antigene des Iij-Antigenkomplexes auf Erythrozyten. Jedoch lassen sich, wenngleich wesentlich seltener, auch Kälteautoagglutinine gegen Antigene des Sia-Antigen-Komplexes oder des Pr-Antigenkomplexes nachweisen [109].

1.4 Die Antigenpräsentation: Immunologisch offene Fragen zur anti-erythrozytären Autoimmunisierung

Untersuchungen in der Vergangenheit zur Pathogenese der anti-erythrozytären Autoimmunisierung haben sich auf die Charakterisierung der Erythrozytenautoantigene und auf die Untersuchung der Clearancemechanismen der Antikörper- und/oder komplementbeladenen Erythrozyten konzentriert. Welche Mechanismen jedoch zur Bildung anti-erythrozytärer Antikörper bei den Autoimmunhämolysen im Humansystem führen, ist – vor allem für den Fall der Wärmeautoimmunhämolyse - nur unzureichend untersucht.

Voraussetzung für die Entstehung der anti-erythrozytären Autoimmunantwort ist die Präsentation der Erythrozytenantigene an immunkompetente Zellen mit der Folge der

Autoantikörperbildung. Die Antigenpräsentation läuft bei der Immunantwort gegenüber Fremdantigenen in der Regel im Immunsystem wie folgt ab:

Antigene bzw. Antigenfragmente werden T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen angeboten. Die Zellen, die den T-Lymphozyten Antigene präsentieren, sind in der Regel die dendritischen Zellen, die Monozyten/Makrophagen, und die B-Zellen (professionelle antigenpräsentierende Zellen) [57]. Beim erstmaligen Kontakt mit einem Antigen wird dieses von antigenpräsentierenden Zellen internalisiert, um intrazellulär durch Proteolyse fragmentiert zu werden. Dabei entstehen Fragmente, welche mit Hilfe von MHC-Proteinen auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Durch den Kontakt mit antigenpräsentierenden Zellen werden T-Lymphozyten entweder zu zytotoxischen CD8+ T-Lymphozyten oder zu CD4+ Helfer-T-Lymphozyten aktiviert. Die CD8+ T-Lymphozyten interagieren über den T-Zellrezeptor mit Zellen, die Antigenfragmente mit Hilfe der MHC I-Proteine präsentieren [15]. Dieses bewirkt die Bildung zytotoxischer Proteine, wie Proteasen und Perforine, welche die antigenpräsentierenden Zellen abtöten. Die CD4+ T-Lymphozyten werden durch antigenpräsentierende Zellen mit MHC II-Proteinen aktiviert. Das löst die Freisetzung von Interleukinen aus, die wiederum für die Umwandlung von B-Lymphozyten in antikörperproduzierende Plasmazellen erforderlich sind [76, 112, 130].

Die Präsentation erythrozytärer Allo- oder Autoantigene ist in der Literatur nicht im Detail gesondert untersucht worden. Man nimmt derzeit an, dass die üblichen Antigenpräsentationsmechanismen auch im Fall der Erythrozytenantigene sowohl bei der anti-erythrozytären Alloimmunantwort im Rahmen von Transfusionen [134] als auch bei der anti-erythrozytären Autoimmunantwort zum Tragen kommen. Neben den so genannten professionellen antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zellen, Monozyten/Makrophagen, B-Zellen) könnten jedoch zwei weitere Zelltypen bei der Induktion anti-erythrozytärer Immunantworten eine Rolle spielen, die bisher in diesem Kontext kaum Beachtung finden:

Dendritische Zellen kommen nicht nur in der Epidermis als klassische Langerhans-Zellen und in den peripheren lymphatischen Geweben vor, sondern in einer Häufigkeit von anteilig 0,1-1,0% der zirkulierenden peripheren Blutmonozyten (PBMC) auch im peripheren Blut [46]. Dendritische Zellen im peripheren Blut interagieren selektinvermittelt mit Gefäßendothel und können so bei Bedarf in periphere Gewebe auswandern. Ihre physiologische Rolle im peripheren Blut ist derzeit jedoch noch unklar [108]. Die direkte Isolierung dendritischer Zellen aus peripherem Blut ist seit kurzem technisch möglich [108]. Dendritische Zellen im peripheren Blut könnten als

direkt am Ort des Geschehens verfügbare antigenpräsentierende Zellen für Erythrozytenantigene eine wesentliche pathophysiologische Rolle bei der Entstehung der anti-erythrozytären Immunisierung spielen. Erste Hinweise für eine mögliche Funktion von dendritischen Zellen im Rahmen der Erythrozyten-Antigenpräsentation ergeben sich aus einer älteren experimentellen Arbeit, die die Fähigkeit epidermaler Langerhans-Zellen der Maus zeigt, Schaf-Erythrozyten-Antigene zu präsentieren und die Antikörperproduktion gegen Schaf-Erythrozyten zu induzieren [44]. Für eine Subpopulation dendritischer Zellen im peripheren Blut wurde zudem kürzlich die Fähigkeit zur Phagozytose opsonisierter Schaf-Erythrozyten beschrieben [117]. Ob dendritische Zellen des peripheren Blutes eine Rolle beim Pathomechanismus der anti-erythrozytären Autoimmunisierung spielen, ist auf dem Hintergrund der existierenden Literatur eine berechtigte Frage, die derzeit noch in keiner Weise experimentell angegangen worden ist.

Wie bereits dargestellt, ist in den letzten Jahren die Fähigkeit von Endothelzellen zur Antigenpräsentation evident geworden. Endothelzellen können zudem unter gewissen Bedingungen $Fc\gamma$ -Rezeptoren und Komplementrezeptoren exprimieren und opsonisierte Partikel binden und intrazellulär aufnehmen. Die Fähigkeit der Endothelzellen zur Opsonierung wurde in unterschiedlichem Kontext beobachtet. Sowohl Studien als auch epidemiologische Daten zeigen, dass die Pathogenese der Artherosklerose in deutlichem Zusammenhang zur Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* steht [132]. Ebenso wurden Immunphänomene, wie die Formation von zirkulierenden Immunkomplexen, bestehend aus LDL und korrespondierenden Antikörpern, mit der Entstehung von koronaren arteriellen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Die zirkulierenden Immunkomplexe verursachen Endothelschäden und initiieren den artherosklerotischen Prozess, wenn sie von Endothelzellen aufgenommen werden. Dieses ist nur möglich, indem Endothelzellen $Fc\gamma$ -Rezeptoren exprimieren. Eine Expression dieser Rezeptoren konnte jedoch nur bei infizierten Endothelzellen beobachtet werden. Die Studie der Arbeitsgruppe Vielma untersuchte, ob eine Infektion der Endothelzellen mit *Chlamydia pneumoniae* eine Expression von $Fc\gamma$ -Rezeptoren zur Folge hat. Es wurde die Expression von $Fc\gamma$ -Rezeptoren (CD64, 32 und 16) auf humanen aortalen Endothelzellen, die seit 4 h, 24 h und 36 h mit *Chlamydia pneumoniae* infiziert waren, untersucht. 24 h nach Infektion wiesen 30-40% der Endothelzellen Einschlusskörperchen auf, 8-9% aller Zellen (ca. 25% der infizierten Zellen) exprimierten $Fc\gamma$ -Rezeptor II, und ca. 1,5-2% (5% der infizierten Zellen) exprimierten $Fc\gamma$ -Rezeptor I und $Fc\gamma$ -Rezeptor III. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig,

dass eine Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* die Expression von Fc γ -Rezeptoren II induziert und einen Mechanismus darstellen könnte, der zur Erklärung der Pathogenese von Artherosklerose auf der Basis der antigenpräsentierenden Funktion der Endothelzellen beiträgt [132]. Von der Arbeitsgruppe Langeggen in Oslo wurden die Aufnahme von Zymosan A-Partikeln durch humane venöse Endothelzellen (HVEC), die Zymosan-Effekte auf zelluläre Zytokine sowie die Produktion von Sauerstoffradikalen untersucht [71]. Die humanen venösen Endothelzellen nahmen mehr von Serum opsoniertes Zymosan als nicht opsoniertes Zymosan auf. Die Aufnahme der Zymosan-Partikel war in Anwesenheit von anti-C3c Antikörpern inhibiert, ein Hinweis auf den komplementvermittelten Aufnahmemechanismus. Vermutlich wird die Aufnahme durch CR1 (CD35) vermittelt, wobei die Beteiligung anderer Rezeptoren nicht ausgeschlossen werden kann. Die mikroskopische Untersuchung zeigte, dass die humanen venösen Endothelzellen mit vollständig internalisierten Zymosan-Partikeln in ihrer Funktion alteriert waren. Eine verlängerte Inkubationszeit sowohl serumopsonierter als auch nicht serumopsonierter Zymosan-Partikel mit humanen venösen Endothelzellen induzierte eine gesteigerte Sekretion proinflammatorischer Zytokine IL-6 und IL-8 seitens der Endothelzellen, hatte aber keinen Effekt auf die Produktion von Sauerstoffradikalen. Die Resultate bestätigen frühere Ergebnisse, dass Endothelzellen Hefepilze und andere Pathogene internalisieren können, bestätigen das Komplementsystem als entscheidenden Faktor des Aufnahmemechanismus und zeigen gleichzeitig, dass die Endothelzellen bei diesem Prozess funktionell alteriert werden können. Darüber hinaus konnte bewiesen werden, dass Endothelzellen an der Abwehrreaktion beteiligt sind, indem sie proinflammatorische und chemotaktische Zytokine als Antwort auf Kontakt mit Pathogenen sezernieren [71]. In der Zirkulation kommt es unter physiologischen Bedingungen zu engen Interaktionen zwischen Erythrozyten und Endothelzellen vor allem im Bereich der kleinen Gefäße in der Mikrozirkulation. Es stellt sich die Frage, ob diese Interaktion – besonders im Fall der IgG-Beladung von Erythrozyten – zur Präsentation von Erythrozytenantigenen beitragen kann. Diese Frage ist bisher in der Literatur noch nicht thematisiert worden.

1.5 Fragestellung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss hämotherapeutisch relevanter antierythrozytärer Autoantikörper auf Erythrozyten-Zell-Interaktionen unter hämorheologischen und unter immunologischen Gesichtspunkten. Im Detail sollen die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Besteht ein Einfluss anti-erythrozytärer Autoantikörper auf hämorheologisch relevante Erythrozyten-Zell-Interaktionen?
 1. a) Haben anti-erythrozytäre Autoantikörper einen Einfluss auf hämorheologisch relevante Erythrozyten–Endothelzell-Interaktionen?
 1. b) Beeinflussen anti-erythrozytäre Autoantikörper die Interaktion der Erythrozyten mit antigenpräsentierenden Zellen (APC)?

Der Einfluss anti-erythrozytärer Autoantikörper auf hämorheologisch relevante Erythrozyten-Zell-Interaktionen wurde in dieser Arbeit am Beispiel der Erythrozyten-Interaktion mit humanen mikrovaskulären Endothelzellen und mit dendritischen Zellen des peripheren Blutes untersucht. Methodisch kam die biomolekulare Interaktionsanalyse unter Echt-Zeit-Bedingungen mittels IAsys®-Technologie zur Anwendung.

2. Ist der Einfluss anti-erythrozytärer Autoantikörper auf Erythrozyten-Zell-Interaktionen funktionell relevant ?
 2. a) Beeinflusst die Erythrozyten-APC-Interaktion in Gegenwart anti-erythrozytärer Autoantikörper das Genexpressionsprofil der antigenpräsentierenden Zellen (APC)?
 2. b) Beeinflusst die Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion in Gegenwart anti-erythrozytärer Autoantikörper das Genexpressionsprofil der Endothelzellen?

Die funktionelle Relevanz des Einflusses anti-erythrozytärer Autoantikörper auf Erythrozyten-Zell-Interaktionen wurde in dieser Arbeit am Beispiel der Erythrozyteninteraktion mit humanen mikrovaskulären Endothelzellen und mit Monozyten untersucht. Methodisch kam die Analyse des Genexpressionsprofils der Zielzellen mittels Microarray-Technologie zum Einsatz.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchung von Erythrozyten-Zell-Interaktionen unter Real-Time-Bedingungen mit Biosensor-Technologie

2.1.1 Funktionsprinzip des IAsys®-Gerätes

Die in dieser Arbeit eingesetzte Technologie zur Analyse der Interaktion der Erythrozyten mit Endothelzellen und antigenpräsentierenden Zellen sowie zur Charakterisierung der an der Interaktion beteiligten wesentlichen Strukturen ist die IAsys®-Technologie (IAsys®, Thermo Labsystems, Cambridge, England), die biomolekulare Interaktionen zweier Bindungspartner unter Echtzeit-Bedingungen mit Hilfe optischer Biosensoren (*Resonant Mirror-Spektroskopie*) detektiert und quantifiziert. Die zu analysierenden Zellen, die als Liganden bezeichnet werden, werden auf der Sensoroberfläche von Küvetten immobilisiert (Protokoll s. 2.1.2), welche in das IAsys®-Gerät eingeschoben werden (Abbildung 4).

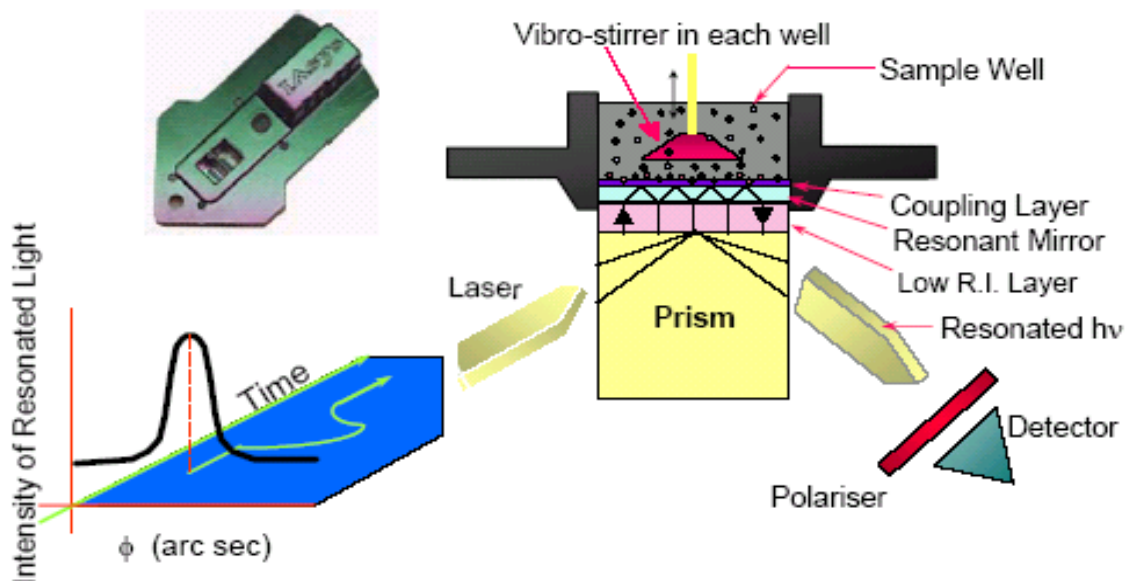


Abbildung 4: Funktionsprinzip des IAsys®-Gerätes, übernommen von IAsys®, Thermo Labsystems, Cambridge, England

Erythrozyten und das zu untersuchende Plasma werden auf die Küvette pipettiert und können mit den immobilisierten Zellen auf der Küvette interagieren. Um eine homogene Konzentration des Analyten auf der Küvette zu erhalten, wird die Lösung in der Küvette kontinuierlich mit einem automatischen Rührer (*Vibro-Stirrer*), der in das

Gerät integriert ist, durchmischt. Die Interaktionsstärke wird anhand der Intensität von Lichtresonanz gemessen. Linear polarisiertes, monochromatisches Licht wird beim Durchtritt durch zwei Medien unterschiedlich gebrochen. Ab einem bestimmten Einstrahlwinkel (kritischer Winkel) kommt es bei dem Durchtritt vom dichteren Medium zu einem weniger dichten Medium zur Totalreflexion. Durch ein Oberflächenmaterial mit einer dichten Titan- oder Hafniumschicht, die oben und unten von einer gering brechenden Silikatschicht umgeben ist, kann man eingestrahktes Laserlicht in der Titan- bzw. Hafniumschicht durch Totalreflexion fangen. Bei genauer Einstellung des Einstrahlwinkels zwischen dem kritischen Winkel und 90° ergibt sich ein Winkel, bei dem sich ein maximales elektrisches Feld am Rand der Metallschicht ausbildet und mit der gering brechenden Schicht interferiert. Hierbei wird Energie absorbiert und ein geringerer Teil total reflektiert (frustrierte totale innere Reflexion). Der Winkel ist abhängig von der Massenänderung der äußeren Oberfläche. Innerhalb dieses totalen inneren Reflektionsbereiches gibt es einen kleinen Winkelbereich, bei dem eine maximale Absorption der eingestrahkten Energie mit der Materie beobachtet wird. Dabei entsteht ein evaneszierendes Feld. Bei Änderung der Masse an der untersuchten Oberfläche ändert sich die Winkeleinstellung in Abhängigkeit von der Massenzunahme. Somit ist eine Interaktion (Massenzunahme) durch Winkeländerung des evaneszierenden Feldes detektierbar. Das Laserlicht wird also durch einen Prismenblock geworfen, auf dem sich ein Resonanzspiegel (*resonant mirror*), der sich aus einer Schicht mit hoher und einer Schicht mit niedriger Resonanz zusammensetzt (*low bzw. high resonant layer*), befindet. Hier wird das Licht entsprechend dem Interaktionsgrad von Ligand und Analyt reflektiert und auf der anderen Seite des Prismas hinausgeleitet. Dort wird es polarisiert und von einem Detektor in ein elektronisches Signal umgewandelt, welches von einem Signalprozessor in Daten der Einheit *arc sec* transferiert wird. Die Einheit *arc sec* wird zur Messung von kleinsten Winkeln verwendet. Eine *minute of arc* (*arc min* oder MOA) entspricht $1/60$ Grad. Ein Grad ist definiert als $1/360$ eines geschlossenen Kreises, eine *arc min* entspricht also einem $1/21\ 600$ eines geschlossenen Kreises und eine *arc sec* $1/60$ einer *arc min*, also $1/1\ 296\ 000$ eines geschlossenen Kreises:

1 geschlossener Kreis = $360^\circ = 21\ 600\ arc\ min = 1\ 296\ 000\ arc\ sec$

Der Gebrauch der Einheit *arc sec* ermöglicht die Angabe der Messwerte extrem kleiner Winkel. Es wird also der Winkel angegeben, in dem das resonante Licht aus dem Prisma tritt.

Nach Abschluss eines Messzyklus wird die Küvettenoberfläche nach Protokoll (s. 2.1.3) von dem Analyten gereinigt, so dass ein neuer Analyt zur Interaktionsanalyse auf die Küvette gebracht werden kann. Die jeweiligen Lösungen werden mittels eines Saugers, der durch Knopfdruck manuell betätigt werden kann, von der Küvettenoberfläche entfernt.

2.1.2 Immobilisierung der Liganden

Zur Untersuchung der Erythrozyten-Zell-Interaktion wurden die Zielzellen auf IAsys®-Küvetten nach den im Folgenden angegebenen Protokollen immobilisiert.

2.1.2.1 Immobilisierung der Endothelzellen

Mikrovaskuläre und venöse Endothelzellen wurden an Küvetten mit planaren Carboxylatoberflächen nach folgendem Arbeitsprotokoll immobilisiert:

- Einstellungen am IAsys®-Gerät: Stirrer: 75%
Temperatur: 20°C
- 3 x 200 µl PBS: ca. 15 min Vorlauf bis die Baseline 5 min stabil ist
- Absaugen
- 200 µl EDC/NHS (Gemisch 1:1) Kontaktzeit 7 min
- 3 x PBS 200 µl: Kontaktzeit 4 min
- Absaugen
- 3 x 120 µl Acetat-Puffer pH 4,5
- Letzte Pipettierung in der Küvette belassen
- 200 µl Zellpräparation hinzugeben: Kontaktzeit 20 min

Konzentration der Zellen:

1 x 10⁵ Zellen/ml HDMEC

1 x 10⁵ Zellen/ml HsaVec

- Absaugen
- 3 x 200 µl PBS: Kontaktzeit 8 min

- Absaugen
- 3 x 200 µl BSA/PBS 2 mg/ml pH 7,4: Kontaktzeit 3 min
- Absaugen
- 3 x 200 µl PBS: Kontaktzeit 2 min
- auf HBS umstellen

Der gesamte Vorgang der Immobilisierung der Zellen auf der Küvette konnte in Echtzeit auf dem Computerbildschirm verfolgt werden. (s. Abbildung 5).

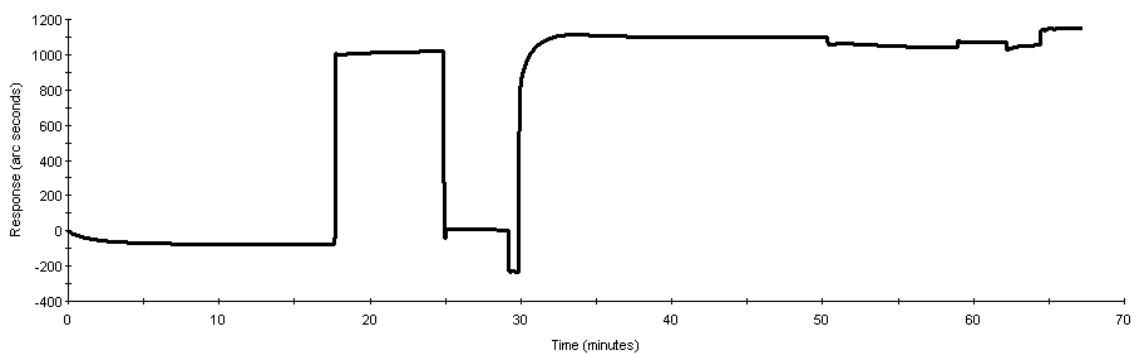


Abbildung 5: Graphische Darstellung der Immobilisierung von humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) im IAsys®-Gerät, Thermo LabSystems, Cambridge, England

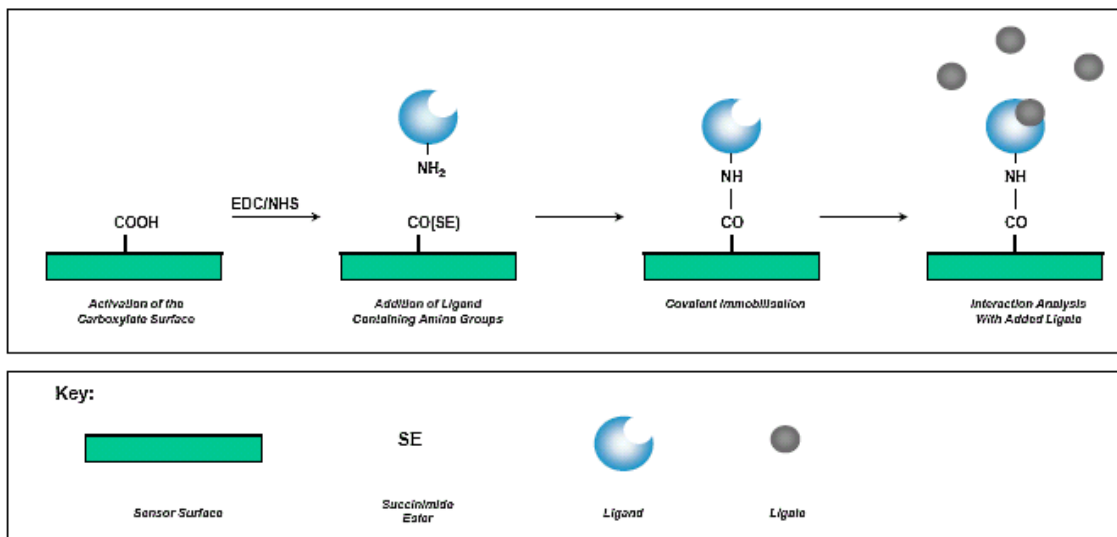


Abbildung 6: Prinzip der Liganden-Immobilisierung an einer Carboxylatoberfläche, übernommen von IAsys®, Thermo LabSystems, Cambridge, England

Um eine Aussage hinsichtlich der Effektivität des Immobilisierungsprozesses treffen zu können, wurde die Differenz zwischen dem Messwert nach Zugabe der Zellpräparation und dem Messwert nach Umstellung auf HBS am Ende des Vorganges gebildet. An der Küvette mit humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) zeigte sich eine Differenz von 1146,27 *arc sec*. An der Carboxylat-Oberfläche entspricht dies einer immobilisierten Menge von 5,24 ng Zellen/mm² (200 *arc sec*=1 ng Zellen/mm² an der Carboxylatoberfläche). An der Küvette mit humanen venösen Endothelzellen der Vena saphena (HsaVec) wurde eine effektive Immobilisierung mit einem Wert von 1061,47 *arc sec*, entsprechend 5,31 ng Zellen/mm², erzielt.

2.1.2.2 Immobilisierung der dendritischen Zellen und der Monozyten

Die dendritischen Zellen und die Monozyten wurden an Aminosilan-Küvetten nach folgendem Protokoll immobilisiert.

- Einstellungen am IAsys®-Gerät:
 - Stirrer: 75%
 - Temperatur: 20°C
- 3 x 200 µl PBS: ca. 15 min Vorlauf bis die Baseline 5 min stabil ist
- Absaugen
- 200 µl EDC/NHS (Gemisch 1:1): Kontaktzeit 7 min
- 3 x PBS 200 µl: Kontaktzeit 4 min
- Absaugen
- 3 x 120 µl Acetat-Puffer pH 4,5
- Letzte Pipettierung in der Küvette belassen
- 200 µl Zellpräparation hinzugeben: Kontaktzeit 20 min

Konzentration der Zellen:

2,16 x 10⁷ Zellen/ml DC

1 x 10⁸ Zellen/ml Monozyten

- Absaugen
- 3 x 200 µl PBS: Kontaktzeit 8 min
- Absaugen
- 3 x 200 µl BSA/PBS 2 mg/ml pH 7,4: Kontaktzeit 3 min
- Absaugen

- 3 x 200 μ l PBS: Kontaktzeit 2 min
- auf HBS umstellen

Für die Küvette mit dendritischen Zellen ergab sich ein Immobilisierungserfolg von 0,73 ng Zellen/mm², für die Monozyten-Küvette ein Immobilisierungserfolg von 1,76 ng Zellen/mm².

2.1.3 Messzyklus

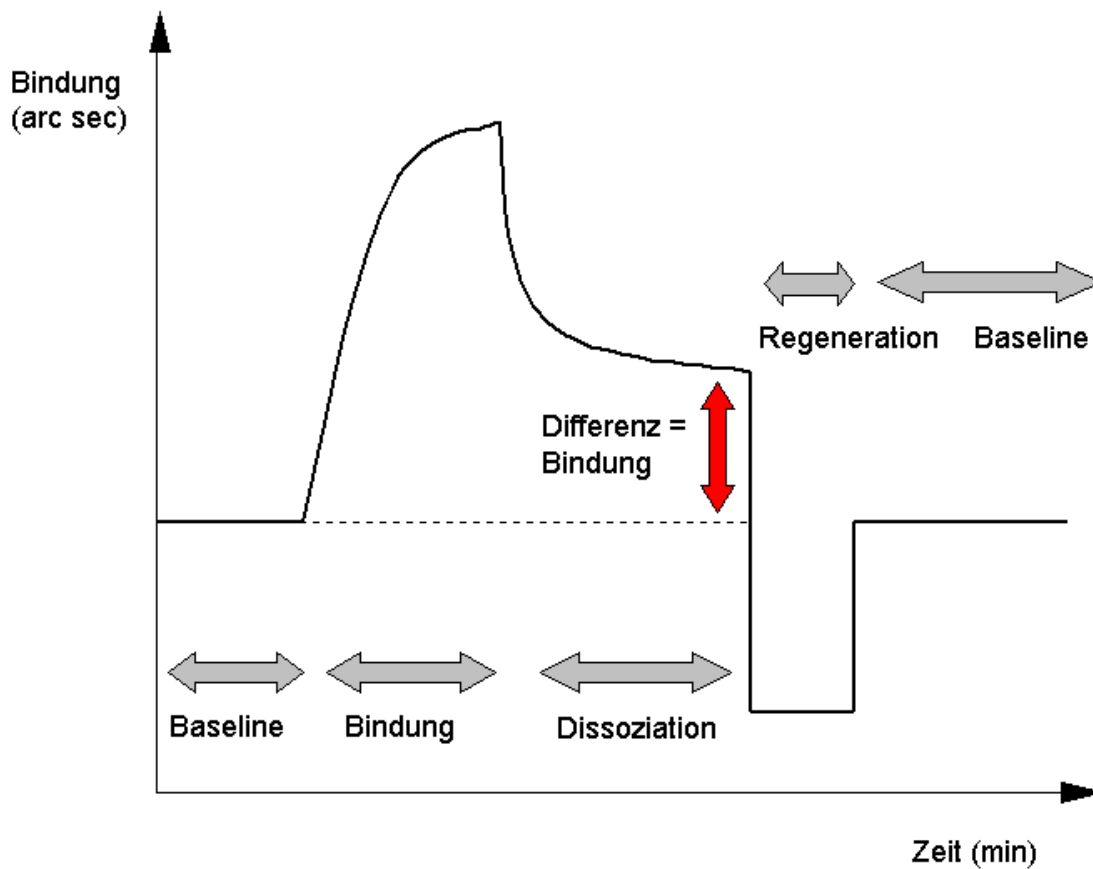


Abbildung 7: Prinzip der Darstellung eines Messzyklus modifiziert nach IAsys®, Thermo Labsystems, Cambridge, England

Die Messungen am IAsys®-Gerät wurden nach folgendem Messprotokoll durchgeführt:

- Einstellungen am IAsys®-Gerät:
 - Stirrer: 75%
 - Temperatur: 20°C bzw. 37°C
- 3 x 120 µl HBS: Vorlauf bis die *Baseline* 5 min stabil ist
- Absaugen
- Analyt (120 µl Erythrozyten 4×10^9 /ml Kochsalzlösung + 120 µl Plasmapräparation) auf die Küvette geben, Kontaktzeit 5 min:
 - *Phase der Bindung (binding)*:
 - Der Analyt geht gegebenenfalls eine Bindung mit dem Liganden ein.
- Absaugen

- 3 x 120 µl HBS, Kontaktzeit der letzten Pipettierung 10 min:
 - *Phase der Dissoziation:*
Der Analyt, der keine Bindung mit dem Liganden eingegangen ist, wird von der Küvettenoberfläche entfernt. Die antikörperbeladenen Erythrozyten, die eine Bindung mit den auf der Küvette immobilisierten Zellen eingegangen sind, werden in ihrem Bindungsverhalten weiterhin gemessen. Die Berechnung der Differenz zwischen Level der Baseline und Level des Graphen zu Ende der Dissoziations-Phase indiziert die Intensität der Erythrozyten-Zell-Interaktion.
- 3 x 120 µl HCl 10 mM (keine Einwirkzeit) und 3 x HCl 1 mM, Kontaktzeit der letzten Pipettierung 2 min:
 - *Phase der Regeneration:*
Jegliche Bindung an der Küvettenoberfläche wird gelöst.
- Absaugen
- 3 x 120 µl HBS, Kontaktzeit der letzten Pipettierung 2 min:
 - *Einstellung einer konstanten Baseline*
- Nach 2 min kann ein neuer Analyt aufgebracht werden.

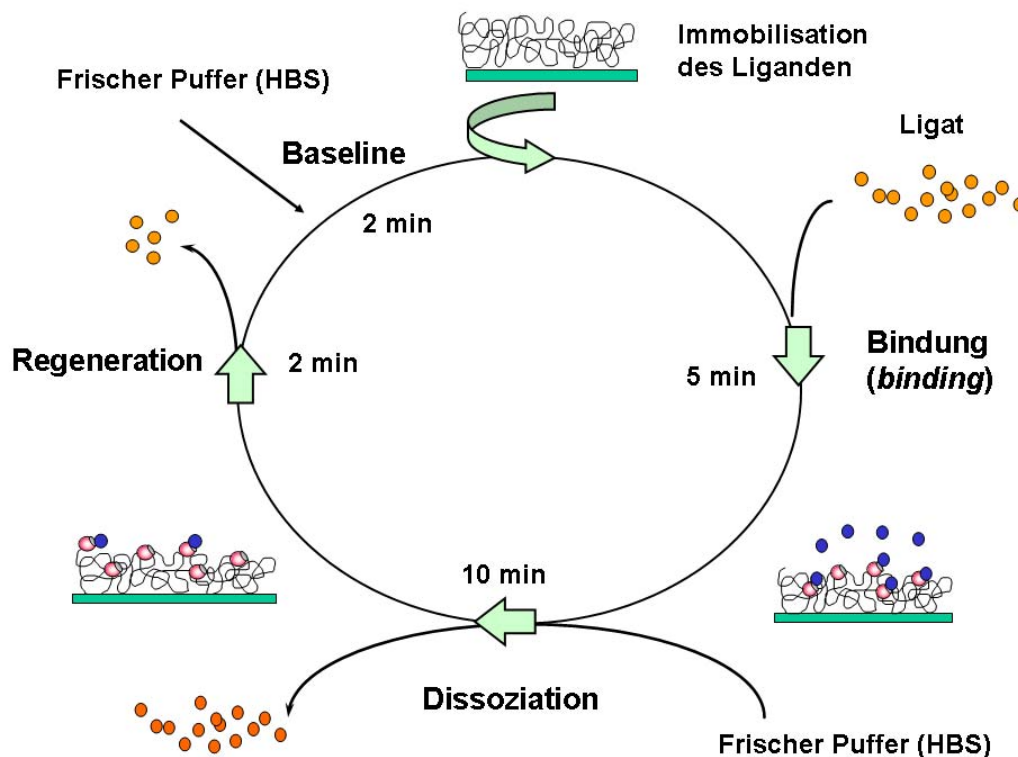


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Messzyklus modifiziert nach IAsys®, Thermo Labsystems, Cambridge, England

2.1.4 Herkunft und Eigenschaften der verwendeten Blutpräparate

2.1.4.1 Charakterisierung der eingesetzten Erythrozyten

Erythrozyten gesunder Blutspender wurden für die Versuchsreihen in unterschiedlichen Präparationsformen eingesetzt. Es wurden ausschließlich Erythrozyten der Blutgruppe 0 Rhesusfaktor (D) positiv verwendet. 2 verschiedene Präparationen kamen je nach Versuchsansatz zum Einsatz:

1. Gewaschene Erythrozyten aus EDTA-Röhrchen, Messung an Einzelspender-Erythrozyten:

Nach Bedarf wurden in der Blutspende des Instituts für Transfusionsmedizin EDTA-Vollblutröhrchen (10 ml) der Blutgruppe 0 Rh (D) positiv von gesunden Blutspendern bereitgestellt. Nach 5-minütiger Zentrifugation des Vollblutes bei 3000 U/min mit Bremse 9 bei Raumtemperatur wurden das Plasma sowie der *buffy coat* verworfen. Anschließend wurden die Erythrozyten (Sediment) 3 x mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und dann mit HBS auf 4×10^9 Zellen/ml eingestellt.

2. Gewaschene Erythrozyten aus EDTA-Röhrchen, Messung an gepoolten Erythrozyten:

Für einzelne Versuche wurde ein Erythrozyten-Pool aus 5 EDTA-Vollblutröhrchen eines jeweiligen Spenders nach dem Protokoll zur Vorbereitung von EDTA-Vollblutröhrchen erstellt.

2.1.4.2 Charakterisierung der verwendeten Plasmen

Die Erythrozyten-Zell-Interaktion wurde unter dem Einfluss von antikörperhaltigen Plasmen untersucht. Plasma gesunder Spender diente als Kontrollplasma. Folgende Plasmapräparationen wurden verwendet:

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

Die Plasmen sind definiert durch den Nachweis panreaktiver anti-erythrozytärer Wärmeautoantikörper des Isotyps IgG, detektierbar im indirekten Coombs-Test, mit einem Autoantikörper-Titer im Bereich von 2-128. Nach Autoabsorption der

anti-erythrozytären Wärmeautoantikörper an die Erythrozyten der Patientenblutproben konnte das zusätzliche Vorliegen anti-erythrozytärer Alloantikörper ausgeschlossen werden.

- Plasmapool gewonnen von Patienten mit Wärmeautoimmunhämolyse und dem zusätzlichen Vorliegen anti-erythrozytärer Alloantikörper, n=8, sowie die im Pool enthaltenen Einzelplasmen

Die Plasmen sind definiert durch den Nachweis panreaktiver anti-erythrozytärer Wärmeautoantikörper des Isotyps IgG, detektierbar im indirekten Coombs-Test, mit einem Autoantikörper-Titer im Bereich von 2-256. Nach Autoabsorption der anti-erythrozytären Wärmeautoantikörper an die Erythrozyten der Patientenblutproben wurden im indirekten Coombs-Test reaktive anti-erythrozytäre Alloantikörper der Spezifitäten Anti-c, Anti-E, Anti-C^w, Anti-Jk^a, Anti-Lu^a, Anti-Kell und Anti-S nachgewiesen.

- Plasmapool gewonnen von Patienten mit Kälteautoimmunhämolyse, n=10, sowie die im Pool enthaltenen Einzelplasmen

Die Plasmen sind definiert durch den Nachweis anti-erythrozytärer Kälteautoantikörper des Isotyps IgM, Spezifität Anti-I, Temperaturamplitude auf den 4°C-Bereich beschränkt, Titer 8–512. Das zusätzliche Vorliegen anti-erythrozytärer Alloantikörper konnte ausgeschlossen werden.

2.1.5 Herkunft und Isolierung der untersuchten Zielzellen

2.1.5.1 Monozyten

Zur Isolierung der Monozyten wurden zunächst die mononukleären Zellen aus Vollblut isoliert. Durch Zentrifugation (3000 U/min, 15 min, 20°C, Bremse 0) wurden die Bestandteile des Vollblutes separiert und die nun als oberste sichtbare Schicht der Leukozyten (*buffy coat*) konnten mit einer Pipette abgenommen werden. Dann wurden Tubes im Verhältnis 1:1 mit der Zellsuspension, die zuvor mit RPMI auf das Ausgangsvolumen gebracht wurde und Ficoll-Lösung (Biochrom Seromed, Berlin, Deutschland) befüllt. Die Ficoll-Trennung erfolgte in der Zentrifuge für 30 min bei 20°C, 2400 U/min und Bremse 0. Anschließend wurde die Schicht der mononukleären Zellen entnommen und nochmals 15 min, 2400 U/min und Bremse 2 bei 20°C zentrifugiert. Danach konnte der Überstand verworfen werden und die mononukleären Zellen wurden 2 x in RPMI gewaschen (1600 U/min, 7 min, 20°C, Bremse 9). Im Anschluss

wurde die Suspension der mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) resuspendiert. Mit Hilfe des Sysmex-Gerätes (Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland), dessen Messprinzip die Impedanzmessung ist, wurde ihre Konzentration gemessen. Im Anschluß konnten nun die Monozyten aus der Fraktion der mononukleären Zellen isoliert werden. Zu diesem Zweck wurden 8-Well-Platten (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) mit 2 ml 5%igem FCS (fetales Kälberserum, GIBCO BRL, Paisley, Schottland) pro Vertiefung bei 37°C und 5% CO₂ für 1 h inkubiert. Der nicht an die Vertiefungen adhärente Überschuss der Lösung wurde nach der Inkubationszeit abgegossen. Die mononukleären Zellen wurde in einer Konzentration von 1x10⁷/ml, gelöst in RPMI-FCS 5%, mit 1,5 ml/Well auf 8-Well-Platten verteilt. Anschließend wurden die beschickten Platten für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ Gehalt inkubiert, so dass die Monozyten am Grund der 8-Well-Platten anhafteten. Der flüssige Überstand konnte mit Hilfe einer Pasteurpipette abgenommen werden. Um die Monozyten vom Grund der Platte zu lösen, wurden erneut 2 ml/Well RPMI-FCS 5%ig auf die Wells gegeben, die Platten für 2 min auf einen Eisblock gestellt und die Zellen von der Oberfläche gelöst. Die Konzentration der Monozyten wurde am Sysmex-Gerät eingestellt.

2.1.5.2 Dendritische Zellen

Zur Gewinnung dendritischer Zellen aus peripherem Blut wurden ebenfalls mononukleäre Zellen aus einem *buffy coat* isoliert. Es konnten 2,16x10⁷ mononukleäre Zellen/ml als Ausgangsmaterial gewonnen werden.

Die dendritischen Zellen wurden mittels der Easy SepTM-Prozedur (CellSystems, Biotechnologie Vertrieb GmbH, St. Katharinen, Deutschland) nach folgendem Protokoll isoliert:

- Vorbereitung der Zellsuspension in einer Konzentration von 1x10⁸ Zellen/ml in einem Medium aus PBS (mit 2% FBS) und 1 mM EDTA in einem Tube
- Easy SepTM Positive Selection Cocktail (StemSepTM antibody cocktail) hinzugeben (100 µl/ml Zellen)
- Gut durchmischen und 15 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Easy SepTM Special Application Magnetic Nanoparticles hinzufügen (50 µl/ml)
- Gut durchmischen und 20 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Die Zellsuspension auf ein totales Volumen von 2,5 ml bringen

- Deckel des Tubes entfernen und das Tube in den Magneten einsetzen und für 5 min beiseite stellen
- Magnet in die Hand nehmen und in einer kontinuierlichen Bewegung um 180° auf den Kopf drehen
 - Die magnetisch markierten Zellen bleiben innerhalb des Tubes, weil sie durch das magnetische Feld des Easy Sep™-Magneten gehalten werden.
- Magneten für 2-3 sec in der umgedrehten Position halten, dann wieder in die aufrechte Position bringen
- Tube aus dem Magnet entfernen
- 2,5 ml Medium hinzugeben
- Zellsuspension erneut gut durchmischen
- Tube in den Magnet zurücksetzen und für 5 min ruhen lassen
- Magnet kopfüber drehen
 - Die positiv selektierten Zellen verbleiben im Tube

2.1.5.3 Endothelzellen

Messungen wurden an humanen Endothelzellen der Vena saphena (HSaVec) und an humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC), die aus der Dermis isoliert wurden, durchgeführt. In beiden Fällen handelte es sich nicht um Zelllinien, sondern um Primärkulturen. Die beiden Zelltypen wurden kryokonserviert bei -70°C von der Firma PromoCell (PromoCell GmbH, D-69126 Heidelberg, Deutschland) in Cryo-SFM (Cryo- serum-free medium) bezogen. PromoCell's Cryo-SFM enthält an Stelle von Serum DMSO (Dimethylsulfoxid), Methylcellulose und andere kryoprotektive Zusatzstoffe. Die Endothelzellpräparationen waren frei von Bakterien, Fungiziden, Mykoplasmen, HIV, Hepatitis B und Hepatitis C und wurden positiv auf den von-Willebrand-Faktor getestet. Ebenfalls von der Firma PromoCell bezogen wurden ein *Endothelial Cell Growth Medium* und ein *SupplementMix* für humane Vena saphena Endothelzellen sowie ein *Endothelial Cell Growth Medium MV* und ein *SupplementMix MV* für die humanen mikrovaskulären Endothelzellen. Nach dem Mischen des *Endothelial Cell Growth Medium MV* mit dem *SupplementMix MV* lagen Kulturmedien folgender Zusammensetzung vor (s. Tabelle 1):

| | HDMEC | HSaVec |
|-------------------------|--------------|---------------|
| ECGS/H | 0,4% | 0,4% |
| FCS | 5% | 2% |
| Epidermal Growth Factor | 10 ng/ml | 0,1 ng/ml |
| Hydrokortison | 1 µg/ml | 1 µg/ml |
| Basic Fibroblast Factor | – | 1 µg/ml |
| Amphotericin B | 50 µg/ml | 50 µg/ml |
| Gentamycin | 50µg/ml | 50µg/ml |

Tabelle 1: Zusammensetzung des Endothelzell-Kulturmediums

Auftauen und Kultivieren der Endothelzellen:

Die Tubes mit den kryokonservierten Endothelzellen wurden im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und die verflüssigte Zellsuspension wurde unter sterilen Bedingungen in jeweils mit 200 µl Medium/cm² Bodenfläche befüllte Kulturflaschen überführt. Die Kulturflaschen wurden im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt bebrütet. Sobald die Zellen 70-90% des Flaschengrundes bewachsen hatten und Zeichen der Zellteilung erkennbar waren, wurden Subkulturen der Zellpopulationen angelegt. Zur Ablösung der adhärennten Endothelzellen vom Grund der Kulturflasche diente das *Detach Kit* (PromoCell GmbH, D-69126 Heidelberg, Deutschland), das sich aus den folgenden Komponenten zusammensetzt:

- HebesBSS (enthält 30 mM Hebes, D-Glukose, NaCl, KaCl, NaPhosphate, Phenol Red)
- Trypsin/EDTA Solution (0,04%/0,03%)
- *Trypsin Neutralizing Solution* (TNS) aus Sojabohnen (0,05%)

Aus der Kulturflasche mit der gewachsenen Zellpopulation wurde das alte Medium entfernt, gegen 5 ml HebesBSS ausgetauscht und die Zellen 30 sec mit dieser Lösung gespült.

Die Zusammensetzung der *Hepes Buffered Saline Solution* (HepesBSS) ist im Folgenden aufgelistet:

- 10 mM Hepes (pH=7,4)
- 3,4 mM EDTA-Zusatz säuert den Puffer an
- 150 mM NaCl

Danach wurde die Lösung verworfen und 100 μ l Trypsin/cm² hinzugefügt. Anschließend wurde unter dem Mikroskop begutachtet, ob sämtliche Zellen vom Flaschengrund gelöst waren. Dann konnten 100 μ l TNS/cm² (*Trypsin Neutralising Solution*) in die Kulturflasche gegeben und die Zellsuspension in ein neues Tube überführt werden, welches mit 500 U/min bei 20°C und Bremse 9 für 4 min bei Raumtemperatur zentrifugiert wurde. Der klare Überstand wurde abgenommen, erneut 1,5 ml Medium hinzugegeben, um die Zellen am Grund des Tubes zu resuspendieren und schließlich die Lösung unter Verwendung des Mediums auf 2 ml aufgefüllt. Dann wurde die Konzentration der gewonnenen Zellen ermittelt. Danach konnten die Zellen in Lösung auf die vorbereiteten Kulturflaschen verteilt werden und wieder im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ bebrütet werden. Um einen Gasaustausch zu ermöglichen, wurden die Deckel der Kulturflaschen nicht vollständig geschlossen. Die Zellkulturen wurden nach 24 h mikroskopisch untersucht, um die ausreichende Adhärenz der Zellen (mind. 80%) sicherzustellen, und das Kulturmedium wurde erneuert. Nach weiteren 24 h waren in der mikroskopischen Untersuchung deutliche Mitosefiguren als Zeichen des proliferativen Zellstadiums zu beobachten. Zur optimalen Versorgung der Zellkulturen wurde das Kulturmedium alle 2-3 Tage ausgetauscht.

2.2 Untersuchung der funktionellen Bedeutung der Erythrozyten-Zell-Interaktion mit Gen-Chip-Analytik

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

Zur Untersuchung der funktionellen Relevanz des Einflusses anti-erythrozytärer Autoantikörper auf die Interaktion von Erythrozyten und Endothelzellen einerseits und von Erythrozyten und Monozyten andererseits wurden Experimente zur Analyse des Endothelzell- und Monozyten-Genexpressionsprofils durchgeführt, abhängig von der Interaktion mit Erythrozyten in Plasma von Wärmeautoimmunhämolyse- oder Kälteautoimmunhämolyse-Patienten. Zur Analyse des Genexpressionsprofils wurde der PIQOR™ Immunology Microarray eingesetzt (Memorec Biotec GmbH, Köln, Deutschland). Auf 8-Well-Platten (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) wurden die in Tabelle 2 (humane mikrovaskuläre Endothelzellen) und Tabelle 3 (Monozyten) aufgelisteten Proben angesetzt:

| Probenbezeichnung | Ansatz |
|--------------------------|-------------------------|
| EC_01 | EC + RBC + HBS |
| EC_02 | EC + RBC + Normalplasma |
| EC_06 | EC + RBC + WAIHA |
| EC_07 | EC + RBC + CAD |

Tabelle 2: Aufbau der Versuchsansätze mit Endothelzellen im Rahmen des PIQOR™ Immunology Microarray

EC: Humane mikrovaskuläre Endothelzellen

| Probenbezeichnung | Ansatz |
|--------------------------|-----------------------|
| M_01 | M + RBC + HBS |
| M_02 | M+ RBC + Normalplasma |
| M_06 | M + RBC + WAIHA |
| M_07 | M + RBC + CAD |

Tabelle 3: Aufbau der Versuchsansätze mit Monozyten im Rahmen des PIQOR™ Immunology Microarray
M: Monozyten

Es wurden 5×10^5 Endothelzellen mit 4×10^9 Erythrozyten und 5×10^6 Monozyten mit 4×10^9 Erythrozyten eingesetzt und jeweils 1 ml des entsprechenden Plasmas hinzugefügt. Die Zellen wurden nach 3 h, 6 h, 12 h und 24 h geerntet. Die Präparation der RNA aus den Monozyten und Endothelzellen und die Hybridisierung der Gen-Chips wurden von der Firma Memorec Biotec GmbH, Köln, Deutschland vorgenommen. Die Datenauswertung erfolgte am Institut für Transfusionsmedizin im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit.

Das Prinzip einer Genexpressionsprofil-Analyse zeigt Abbildung 9:

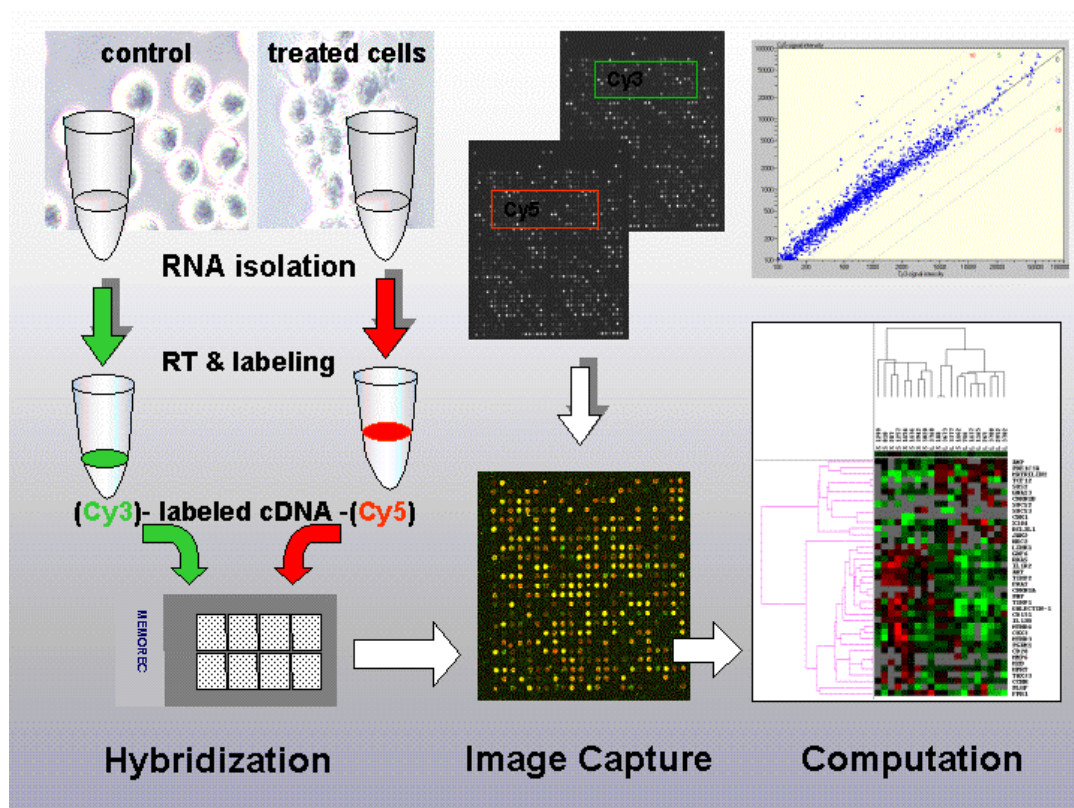


Abbildung 9: Prinzip der Erstellung eines Genexpressionsprofils modifiziert nach Memorec Biotec GmbH, Köln, Deutschland

2.2.1.1 Präparation der RNA

Die Reinigung und Isolierung der RNA erfolgte protokollgemäß mittels des *PAXgene Blood RNA Kit* (Qiagen, GmbH, Hilden, Deutschland) in folgenden Arbeitsschritten:

- Zentrifugation des *PAXgene*-Tubes zur Separation von Nukleinsäure-Pellets
- Waschen und Resuspension der Nukleinsäure-Pellets und
- Inkubation mit einem speziellen Puffer und Proteinase K, um die Protein-Verarbeitung in Gang zu bringen
- Zentrifugation in der *PAXgene Shredder spin column*, um das Zell-Lysat zu homogenisieren und Zelldetritus zu entfernen
- Abnehmen des Überstandes

- Zugabe von Ethanol, um die Bindungseigenschaften einzustellen, und die erneute Zentrifugation des Lysates in einer *PAXgene RNA spin column*
 - die RNA wird selektiv an die *PAXgene* Silikat-Membran gebunden, während Kontaminata entfernt werden
- Verbleibende Verunreinigungen werden in weiteren Waschgängen eliminiert
 - zwischen dem 1. und dem 2. Waschgang wird die Silikat-Membran mit DNase behandelt, um den Anteil gebundener DNA-Anteile zu entfernen
- Die RNA wird in Puffer gelöst und mittels Hitze denaturiert

Alle RNA Proben wurden danach bezüglich Reinheit, Konzentration und Ausbeute spektrophotometrisch mit dem Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, California, USA) vermessen (Abbildung 10).

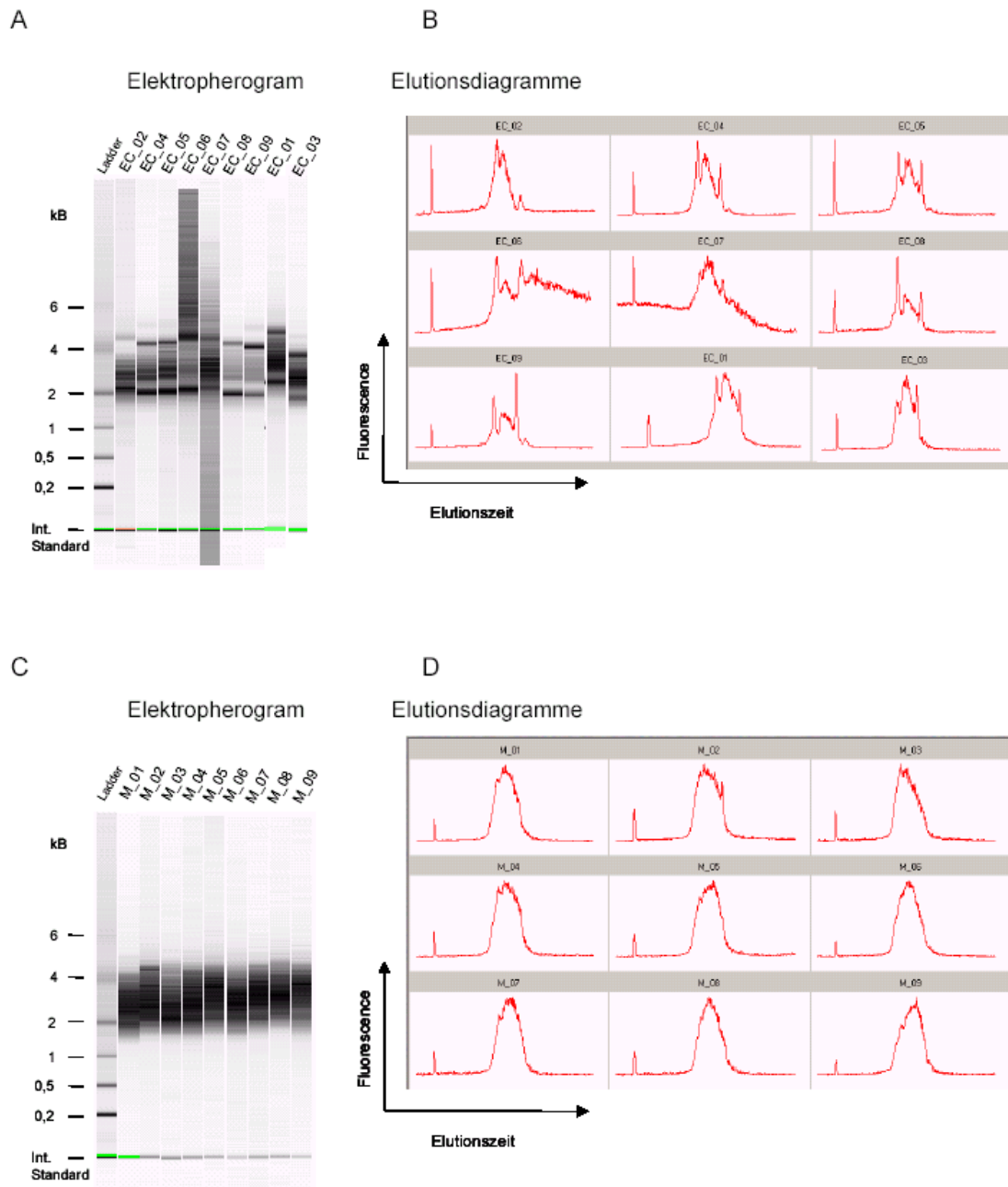


Abbildung 10: Elektropherogramme (A und C) sowie Elutionsdiagramme (B und D) der RNAs
 A und B stellen die Ergebnisse ausgehend von Monozyten dar. C und D stellen die Ergebnisse ausgehend von Endothelzellen dar. Erwartet würden zwei herausragende Peaks bei ca. 2 kB (18S RNA) und 4 kB (28S RNA), welche die ribosomale RNA repräsentieren. Der jeweils erste Peak (ganz links) repräsentiert einen internen Standard, der zur Quantifizierung der RNA herangezogen werden kann. Eine Zusammenfassung aus mehreren Gelläufen ist gezeigt [38].

2.2.1.2 Amplifikation der messenger RNA

Aufgrund der geringen Gesamt-RNA Ausbeuten wurde der mRNA-Anteil der präparierten RNA mit Hilfe eines oligo-dT-Primers vor der Hybridisierung amplifiziert. Die Beurteilung der RNA-Qualität wurde auf Ebene der aRNA und nicht auf Ebene der Gesamt-RNA durchgeführt. Nach reverser Transkription von 0.2–1.0 µg Gesamt-RNA (entspricht ca. 0.004 - 0.02 µg mRNA) und Zweitstrangsynthese wurden die entstandenen cDNAs *in vitro* transkribiert. Die Amplifikationsrate war ca. 200- bis 1000-fach. Die Produkte der Amplifikationen wurden spektrophotometrisch analysiert und die Gelelektrophorese belegte eine erfolgreiche Amplifizierung aller Ansätze. Alle aRNAs wiesen eine ähnliche Größenverteilung mit einer durchschnittlichen Transkriptlänge von ca. 1 kB auf.

2.2.1.3 Hybridisierungen der PIQOR™ Microarrays

Zur Herstellung der PIQOR™ Microarrays wurde seitens der Firma Memorec eine Kollektion von cDNA-Fragmenten der Spezies Mensch, Maus und Ratte erstellt, welche einzeln für bestimmte Fragestellungen ausgesucht, kloniert und sequenzverifiziert worden sind. Um eine möglichst hohe Selektivität zu erreichen und falsch positive bzw. falsch negative Ergebnisse aufgrund von Kreuzhybridisierung zu vermeiden, erfüllen die verwendeten cDNA-Fragmente folgende Kriterien:

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

Mit einem piezoelektrischen Spotter werden auf der Oberfläche einer Glasplatte cDNA kovalent gebunden. Die cDNA repräsentieren 642 Gene. Für die Bestimmung der Expressionsprofile wurde jeweils 1 µg aRNA aus den jeweiligen Versuchsansätzen verwendet. Die RNA wurde unter Einbau der fluoreszenzmarkierten Nukleotide Cy3-dCTP bzw. Cy5-dCTP (Cyanin-Fluoreszenzfarbstoffe) als Sonden durch reverse Transkription markiert und entsprechend des Hybridisierungsplanes zusammen auf einem PIQOR™ Immunology Microarray hybridisiert. Dabei wurden die unstimulierten Proben mit Cy3 grün markiert, die stimulierten Proben mit Cy5 rot markiert.

2.2.1.4 Erstellung der Expressionsprofile

Die Fluoreszenzsignale der hybridisierten Microarrays wurden mit einem Laser-Scanning-Gerät (ScanArray Lite, Packard Bioscience) eingelesen und die Bilder der beiden Fluoreszenzmarkierungen für die weitere Analyse digital übereinander gelegt (*Overlay*). Der Fluoreszenzscanner detektierte die Chip-Fluoreszenz. In der *Overlay*-Darstellung zeigt die Farbe Rot, dass Cy5-Fluoreszenz über Cy3-Fluoreszenz dominiert. Das Gen, das an diesem Punkt auf dem Chip analysiert wird, ist in der stimulierten Probe höher exprimiert als das entsprechende Gen der unstimulierten Probe. Hat die Grün-Fluoreszenz höhere Intensitäten als die Rot-Fluoreszenz, ist das Gen in der stimulierten Probe gegenüber der unstimulierten weniger stark exprimiert. Gelbe Fluoreszenz zeigt gleiche Intensitäten beider Signale und damit keine differenzielle Expression an. Die Helligkeitswerte der Fluoreszenz werden in absolute Expressionswerte umgewandelt.

In Abbildung 11 ist zur visuellen Qualitätskontrolle beispielhaft das *Overlay* des Experiments 1 dargestellt.

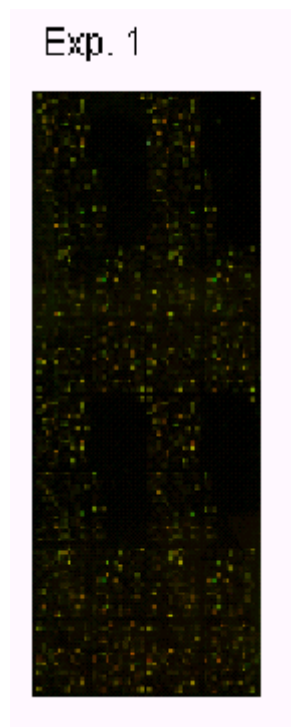


Abbildung 11: Beispielhafte Abbildung der digital übereinandergelegten Cy5-/Cy3-Bilder (*Overlay*) nach dem Einlesen der Microarrays (Experiment 1: Monozyten + Erythrozyten + HBS) [38]

Zunächst wurden für die hybridisierten Microarrays zur Erstellung der Expressionsprofile die Signal- und Hintergrund-Intensitäten für Cy3 und Cy5 mit Hilfe der ImaGene™ Software 5.1 (BioDiscovery) bestimmt. Die Hintergrundwerte wurden von den Signalintensitäten subtrahiert und der Quotient aus Cy5/Cy3-Signal berechnet. Die Werte wurden über den Median aller Signalquotienten normiert und dann der Mittelwert der 4-fach Replikate berechnet. Um Artefakte auszuschließen, wurden die Microarrays visuell kontrolliert. Signalquotienten (Cy5/Cy3) wurden in den Auswertungen nur dann dargestellt, wenn die gemessene Intensität eines Fluoreszenzfarbstoffes (Cy5 oder Cy3) mindestens 2-fach über dem Mittelwert des Hintergrundes aller validen Spots (unflagged) lag. Diese Gene werden als detektiert bezeichnet. Durch diese Ausschlusskriterien konnten sehr schwache Signalwerte, die bei geringen Hintergrundschwankungen häufig falsch positive Ergebnisse liefern, ausgeschlossen werden.

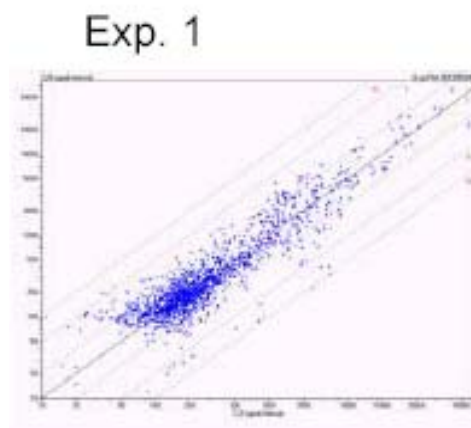


Abbildung 12: Beispielhafte Darstellung der Signalintensitäten der Spots im Experiment 1 (Monozyten + Erythrozyten + HBS)

Die Signalintensitäten der jeweiligen cDNA (als Punkt erkennbar) sind doppellogarithmisch dargestellt. Abszisse: Cy3-Signalintensität, Ordinate: Cy5-Signalintensität. Die gestrichelten Diagonalen definieren die Bereiche x-fach differentieller Signalintensitäten [38].

2.2.2 Datenanalyse

Die Ergebnisse der Genanalysen wurden von der Memorec Biotec GmbH (Köln, Deutschland) in Form von Excel-Tabellen geliefert. Ein Ausschnitt aus der Tabelle, die die Ergebnisse des Ansatzes M_01 mit der Microarray Nr. 041 darstellt, ist im Folgenden beispielhaft abgebildet.

| Gene # | Gene name | SProt/trEMBL | UniGene | 3050041 |
|--------|-------------|----------------------|------------------|-------------|
| 332 | IL3RA | P26951 | Hs.460433 | 2.40 / 24 % |
| 333 | IL4R | P24394 Q96P01 | Hs.75545 | 2.44 / 17 % |
| 335 | IL5RA | Q01344 | Hs.68876 | |
| 337 | IL6R | Q16202 P08887 | Hs.193400 | 1.97 / - % |
| 339 | IL7R | P16871 Q9UPC1 | Hs.362807 | 0.53 / 18 % |
| 341 | IL8RA-IL8RB | Q9P2T8 Q9P2T9 Q9P2T9 | Hs.194778 Hs.846 | |
| 343 | IL6ST | Q9UQ41 P40189 | Hs.71968 | |
| 345 | CSF2RB | P32927 | Hs.285401 | 0.97 / 36 % |
| 347 | IL2RG | P31785 | Hs.84 | 0.41 / 20 % |
| 349 | FLT3ASE 2 | P36888 Q13414 | Hs.385 | |
| 351 | MST1R | Q04912 | Hs.2942 | 0.86 / 8 % |
| 355 | PDGFRA | Q96KZ7 P16234 | Hs.74615 | |
| 357 | PDGFRB | Q8N5L4 P09619 | Hs.307783 | 1.11 / 9 % |
| 359 | THBD | P07204 | Hs.2030 | 4.92 / 18 % |

Tabelle 4: Ergebnisse der Genexpressionsprofile

Die Ergebnisse der Gen-Chip-Analysen wurden von Memorec in Form einer Excel-Tabelle übermittelt. Als Ergebnis wurde eine Kandidatenliste der Gene aufgestellt, die gleiche oder 2-fach größere Signalintensitäten gegenüber den Negativkontrollen hatten und die größer oder gleich 1,5-fach differenziell exprimiert wurden. In dieser Liste wurden die Nr. des Gens in der Memorec Kollektion von cDNA-Fragmenten (Spalte A), der Genname (Spalte B), der *SwissProt*- und *UniGene*-Eintrag (Spalte C) sowie der Signalquotient und der Variationskoeffizient der Doppelspots (Spalte D) aufgeführt. Der Signalquotient bildet sich aus dem Verhältnis der Fluoreszenzintensität von Cy5 zu Cy3. Der Kehrwert der Quotienten wurde für die reprimierten Gene mit -1 multipliziert. Die mindestens 2-fach hochregulierten Gene sind von Memorec Biotec GmbH rot unterlegt, während die mindestens 2-fach herunterregulierten Gene grün gekennzeichnet sind [38].

Die weitere Aufarbeitung der von der Firma Memorec gelieferten Rohdaten erfolgte eigenständig im Rahmen der hier vorgelegten Dissertation in Zusammenarbeit mit Dr. N. Osada, wissenschaftliche Mitarbeiterin des Institutes für Medizinische Informatik und Biomathematik der WWU Münster. Zentrales Element der Aufarbeitung war die SAM-Analyse (*Significance Analysis of Microarrays*). Mittels der Software „siggenes“ (Version 1.8.0.) von Bioconductor – eine *open source* und *open development* Software-Projekt zur Analyse und zum Verständnis genomischer Daten - wurden die signifikant unterschiedlich exprimierten Gene identifiziert und die FDR (false discovery rate) geschätzt [120]. Unter der Bedingung, die FDR auf maximal 10% zu begrenzen und die

Anzahl der falsch positiven Gene auf maximal 2 zu beschränken, wurden 20 Gene mit den signifikantesten Unterschieden bezüglich der Genexpression unter Einfluss der beiden Plasmapräparationen mittels *siggene*s identifiziert. Diese 20 signifikanten Gene wurden in die immunologischen Funktionsgruppen der Firma Memorec eingeordnet. Die Analyse der induzierten und reprimierten Genmuster ermöglicht es, eine Aussage über die biologische Relevanz des Plasmamilieus und der Erythrozyten-Zell-Interaktionen zu treffen.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung von Erythrozyten-Zell-Interaktionen unter Real-Time-Bedingungen mit Biosensor-Technologie

3.1.1 Messung der Erythrozyten-Zell-Interaktionen: Etablierung der biomolekularen Interaktionsanalytik

Als Voraussetzung für die Bearbeitung der in dieser Arbeit gestellten Fragen war zunächst das Prinzip der biomolekularen Interaktionsanalytik mittels IAsys®-Technologie als Messmethode für die Darstellung der Erythrozyten-Zell-Interaktionen zu etablieren. Die Immobilisierung der verschiedenen Zielzellpopulationen auf die Küvettenoberflächen als Vorbereitung der Messungen gelang reproduzierbar und ist im Abschnitt Material und Methoden einschließlich der immobilisierten Quantitäten dargestellt. Das Messprotokoll ist im Abschnitt Material und Methoden ebenfalls ausführlich dargestellt. Die besondere Herausforderung der Messungen bestand in der Standardisierung der Messungen. Es galt, die Interaktion biologisch aktiver Partner so zu erfassen, dass

1. Vergleichbarkeit der Messungen über den kompletten Messzeitraum von 6 Monaten hergestellt werden konnte und
2. Alterationen der Küvette innerhalb des Versuchszeitraumes, resultierend aus den regelmäßigen Regenerationsvorgängen an der Küvettenoberfläche, erfasst und in ihrer Relevanz für das Messergebnis eingeschätzt werden konnten.

Zur Standardisierung der Methode wurde neben den pro Messzyklus mitgeführten Messungen eines standardisierten Plasmapools als interner Kontrolle die mehrmals tägliche Überprüfung des so genannten Resonanzscans (s. Abbildung 13) eingesetzt.

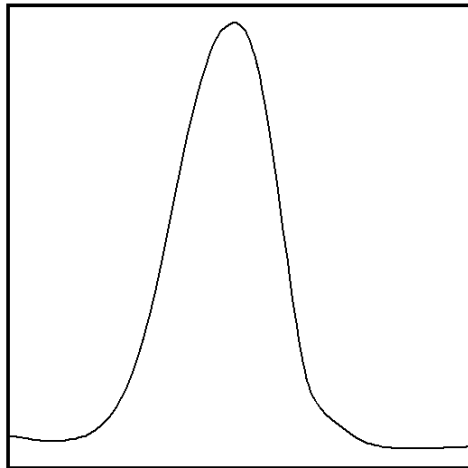


Abbildung 13: Resonanzscan des IASys®-Gerätes

Der Resonanzscan ermöglicht die Kontrolle des Küvettenzustandes bzw. des Zustandes der auf der Küvette immobilisierten Zellen. Durch regelmäßige Durchführung und Kontrolle des Resonanzscan kann die kontinuierliche Qualität der beladenen Küvette und somit der methodische Standard der Messungen gesichert werden. Ein gleichbleibend symmetrischer Resonanzscan bestätigte die gleichmäßige Qualität des immobilisierten Zellmaterials auf der Küvette, während eine Abweichung des Scans eine Änderung der Zellen und folglich eine Abweichung vom Standard der Methode signalisierte.

Der Plasmapool wurde aus dem Plasma 10 gesunder Blutspender angesetzt, portioniert tiefgefroren und während des gesamten Versuchszeitraums als interne Kontrolle eingesetzt. Er diente dazu, die Qualität der Messungen, die z. B. von der Beschaffenheit der häufig regenerierten Küvettenoberfläche abhängt, über den gesamten Untersuchungszeitraum zu überprüfen und vergleichbar zu gestalten. Zudem war der Plasmapool, gewonnen aus Plasma gesunder Blutspender, Bezugspunkt für die Normalisierung der Werte in der Datenanalyse. Die Normalisierung diente dem Ausgleich der tagesabhängigen Schwankungen der Messungen in diesem biologischen, anders nur schwer über den gesamten Messzeitraum zu standardisierenden System. Zur Normalisierung wurden die Messwerte der Versuchsgruppen auf den Messwert des am selben Tag auf derselben Küvette gemessenen Plasmapools bezogen, welcher gleich 100% gesetzt wurde. Diese Vorgehensweise ermöglichte die zuverlässige Beurteilung der Analysen über den gesamten Untersuchungszeitraum, da so auch geringfügige Alterationen der Küvette innerhalb des Versuchszeitraumes berücksichtigt werden konnten.

3.1.1.1 Reproduzierbarkeit der einzelnen Messungen

Grundsätzlich wurde jede Messung als 3-fach-Bestimmung durchgeführt. Zur Beurteilung der Qualität der Messmethodik wurde die Standardabweichung herangezogen, ermittelt aus den Werten der drei Messzyklen.

3.1.1.2 Reproduzierbarkeit der Messungen über den gesamten Untersuchungszeitraum

Bei der Messung des Plasmapools zeigte sich neben der hohen Reproduzierbarkeit der Messungen innerhalb der einzelnen Messzyklen die hohe Reproduzierbarkeit der Messwerte über einen langen Zeitraum hinweg, so dass Tagesschwankungen der Messergebnisse

1. eine nur untergeordnete Rolle spielen und
2. zudem durch die Normalisierung der Messungen am Plasmapool weiter in ihrer Bedeutung für das Endergebnis reduziert werden konnten.

Die folgende Abbildung stellt die Beständigkeit der Erythrozyten-Zell-Interaktion unter Einfluss von Normalplasma anhand von Absolutwerten exemplarisch am Beispiel der Erythrozyten-Interaktion mit mikrovaskulären Endothelzellen dar: An der mit humanen dermalen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) beladenen Küvette ergaben sich für die Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion an drei nicht aufeinanderfolgenden Tagen die nachstehenden Absolutwerte (s. Abbildung 15):

- 79,24 *arc sec* am 11.11.2003
- 74,67 *arc sec* am 19.11.2003
- 75,93 *arc sec* am 10.12.2003

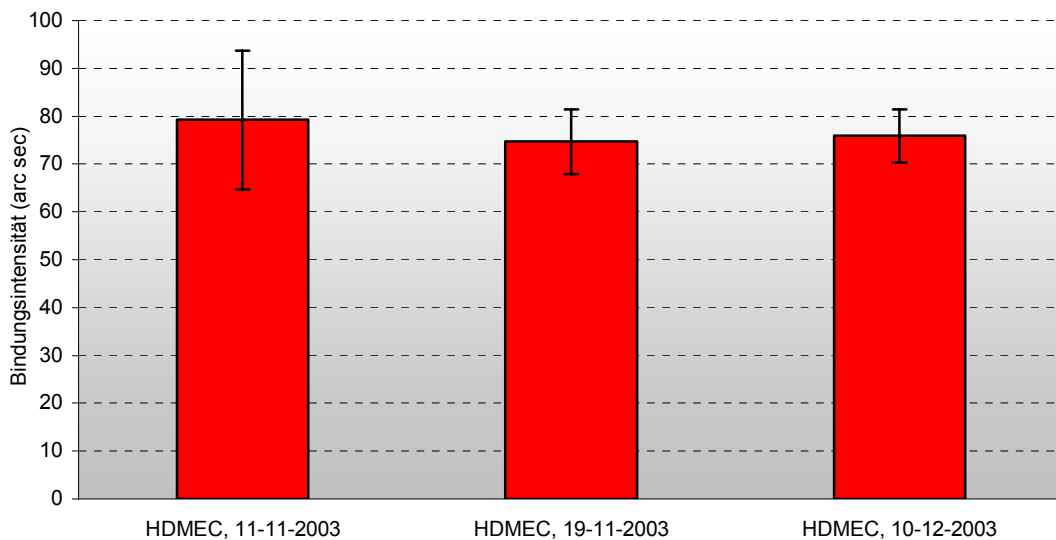


Abbildung 14: Reproduzierbarkeit der Messungen an mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC)

Die Abbildung zeigt 3 Einzelmessungen an mikrovaskulären Endothelzellen an 3 nicht aufeinanderfolgenden Tagen. Es wurden jeweils gewaschene Erythrozyten ($4 \times 10^9/\text{ml}$) mit dem zur Standardisierung eingesetzten Plasmapool in der Interaktion mit mikrovaskulären Endothelzellen untersucht. Bei den 3 dargestellten Werten handelt es sich um Absolutwerte (Mittelwert aus 3 Messungen und Standardabweichung).

3.1.1.3 Messung von Bindungsintensitäten in Abhängigkeit von der Temperatur des Systems (20°C vs. 37°C)

Zur Untersuchung der Frage, ob die Messtemperatur die Erythrozyten-Zell-Interaktion in Anwesenheit anti-erythrozytärer Autoantikörper beeinflusst, wurden vergleichende Messungen bei 20°C und bei 37°C durchgeführt. 6 Normalplasmen (Spender) als Kontrolle, 6 wärmeautoantikörperhaltige Plasmen und 5 kälteautoantikörperhaltige Plasmen wurden bei 20°C und bei 37°C mit gewaschenen Erythrozyten auf der Küvette mit mikrovaskulären Endothelzellen inkubiert. Es lässt sich beobachten, dass die Bindungsintensitäten bei 37°C leicht abgeschwächt sind. Die ermittelten Unterschiede sind nicht signifikant ($p > 0.01$, t-test). Abbildung 20 zeigt die Messungen bei 20°C und bei 37°C an der Küvette mit mikrovaskulären Endothelzellen.

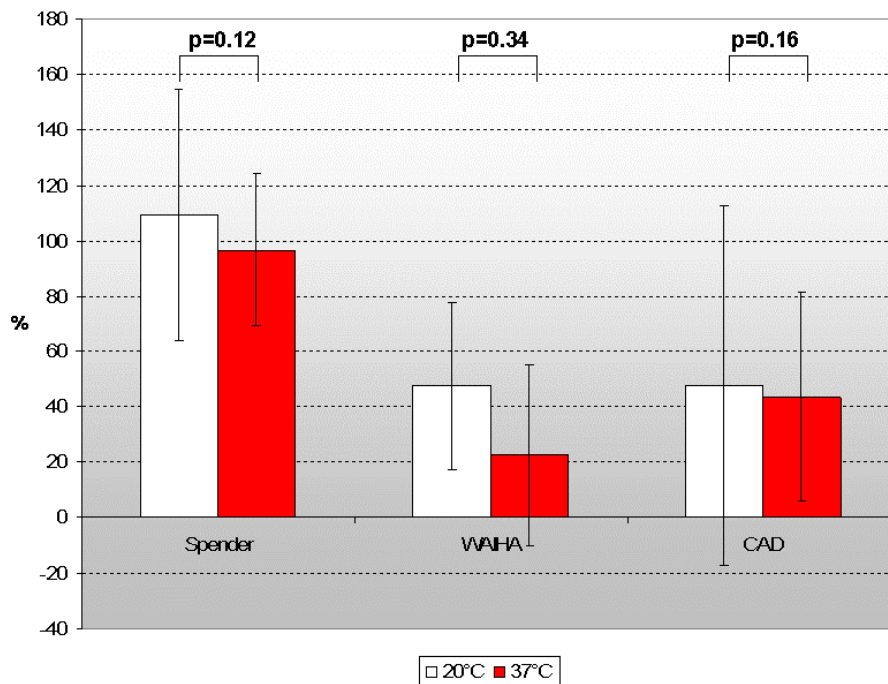


Abbildung 15: Messung 20°C vs. 37°C an mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC)

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte der Einzelmessungen von Plasma gesunder Spender, n=6, wärmeautoantikörperhaltigem Plasma (WAIHA-Plasma), n=6 und kälteautoantikörperhaltigem Plasma (CAD-Plasma) n=5 bei 20°C und bei 37°C.

Um den pathologischen Eigenschaften des kälteautoantikörperhaltigen Plasmas Rechnung zu tragen, wurden die Messungen der Plasmen von Patienten mit Kälteautoimmunhämolyse sowohl bei 20 °C als auch bei 37°C durchgeführt. Als korrespondierende Kontrolle wurde der Plasmapool gesunder Spender in diesen Fällen ebenfalls bei 20°C und bei 37°C gemessen. In den Fällen, in denen sich ein signifikanter Unterschied der Bindungsstärke der kälteautoantikörperhaltigen Plasmen im Vergleich zu den Normalplasmen bei einer Messtemperatur von 20°C ergab, wurde das Ergebnis anhand einer vergleichenden Messung bei 37°C reproduziert. Als signifikanter Unterschied der Erythrozyten-Zell-Interaktion in Gegenwart von kälteautoantikörperhaltigem Plasma wurden nur jene Messungen gewertet, die sich bei 37°C als signifikant unterschiedlich reproduzieren ließen.

3.1.2 Einfluss der anti-erythrozytären Autoantikörper auf die Interaktion der Erythrozyten mit mikrovaskulären Endothelzellen und mit dendritischen Zellen

3.1.2.1 Einfluss der anti-erythrozytären Autoantikörper auf die Interaktion der Erythrozyten mit mikrovaskulären Endothelzellen

Untersucht wurde der Einfluss von Plasma der folgenden Probandengruppen auf die Interaktion der Erythrozyten mit mikrovaskulären Endothelzellen:

- Plasma gesunder Blutspender
- Plasma von Patienten mit Wärmeautoimmunhämolyse
- Plasma von Patienten, die neben anti-erythrozytären Wärmeautoantikörpern gleichzeitig anti-erythrozytäre Alloantikörper aufweisen
- Plasma von Patienten mit Kälteautoimmunhämolyse

Abbildung 23 zeigt die Resultate der Analysen an der mit mikrovaskulären Endothelzellen beladenen Küvette.

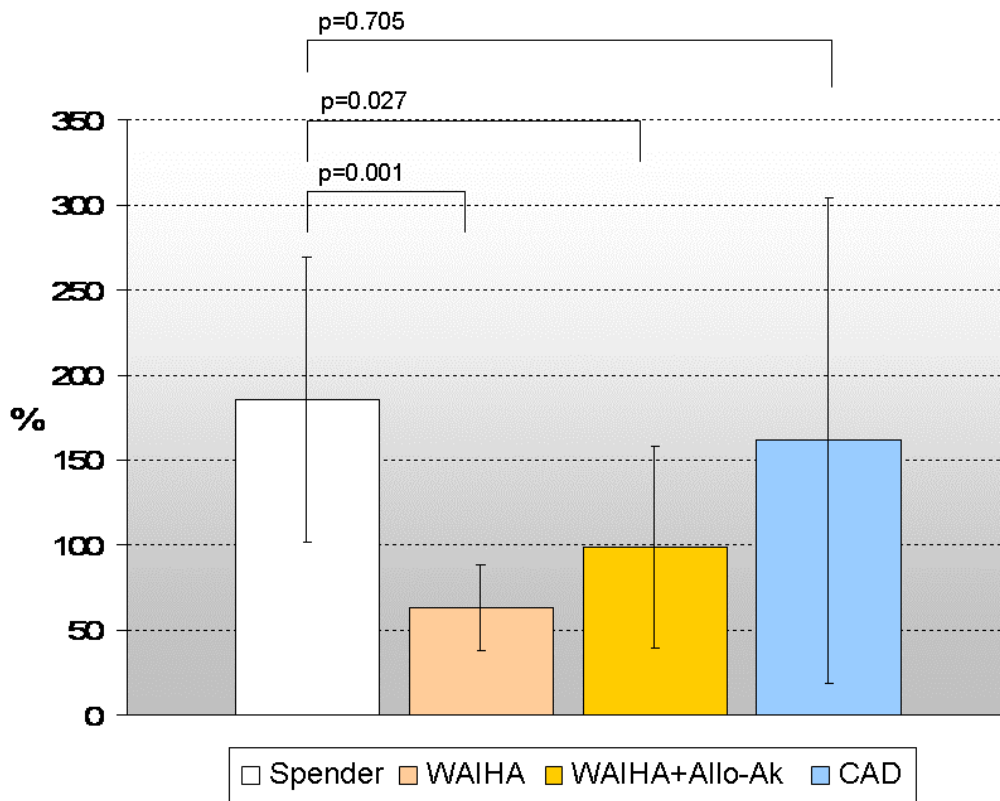


Abbildung 16: Beeinflussung der Interaktion von Erythrozyten und mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) durch Plasma mit Wärmeautoantikörpern (WAIHA), Plasma mit Wärmeautoantikörpern und Alloantikörpern (WAIHA+Allo-Ak) und Plasma mit Kälteautoantikörpern (CAD) im Vergleich zu Normalplasma gesunder Spender (Spender)

Die Darstellung zeigt Mittelwerte aus Einzelspenderplasmen-Messungen (Normalplasma (Spender) n=10, WAIHA n=10, WAIHA+Allo-Ak n=10, CAD n=8).

Die Interaktion von Erythrozyten und mikrovaskulären Endothelzellen ist in Gegenwart des Plasmas von Patienten mit Wärmeautoimmunhämolyse im Vergleich zur Interaktion von Erythrozyten und mikrovaskulären Endothelzellen in Gegenwart von Normalplasma signifikant vermindert ($p=0.001$). In Gegenwart des Plasmas von Patienten mit Wärmeautoimmunhämolyse und Alloantikörpern ergibt sich ebenfalls eine signifikante Verminderung gegenüber Normalplasma ($p=0.027$). Der die Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion abschwächende Effekt ist hier jedoch geringer ausgeprägt. Im Gegensatz dazu ist in Gegenwart des Plasmas von Patienten mit Kälteautoimmunhämolyse keine signifikante Änderung der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion ($p=0.705$) im Vergleich zum Normalplasma gesunder Spender erkennbar.

3.1.2.2 Einfluss der anti-erythrozytären Autoantikörper auf die Interaktion der Erythrozyten mit dendritischen Zellen

Um den Effekt anti-erythrozytärer Autoantikörper auf die Interaktion von Erythrozyten und dendritischen Zellen zu beurteilen, erfolgten auch an der Küvette mit immobilisierten dendritischen Zellen Messungen mit nachstehend aufgeführten Plasmen:

- Plasma gesunder Blutspender
- Plasma von Patienten mit Wärmeautoimmunhämolyse
- Plasma von Patienten, die neben anti-erythrozytären Wärmeautoantikörpern gleichzeitig anti-erythrozytäre Alloantikörper aufweisen
- Plasma von Patienten mit Kälteautoimmunhämolyse

Abbildung 17 zeigt die Resultate der Analysen an der mit dendritischen Zellen beladenen Küvette.

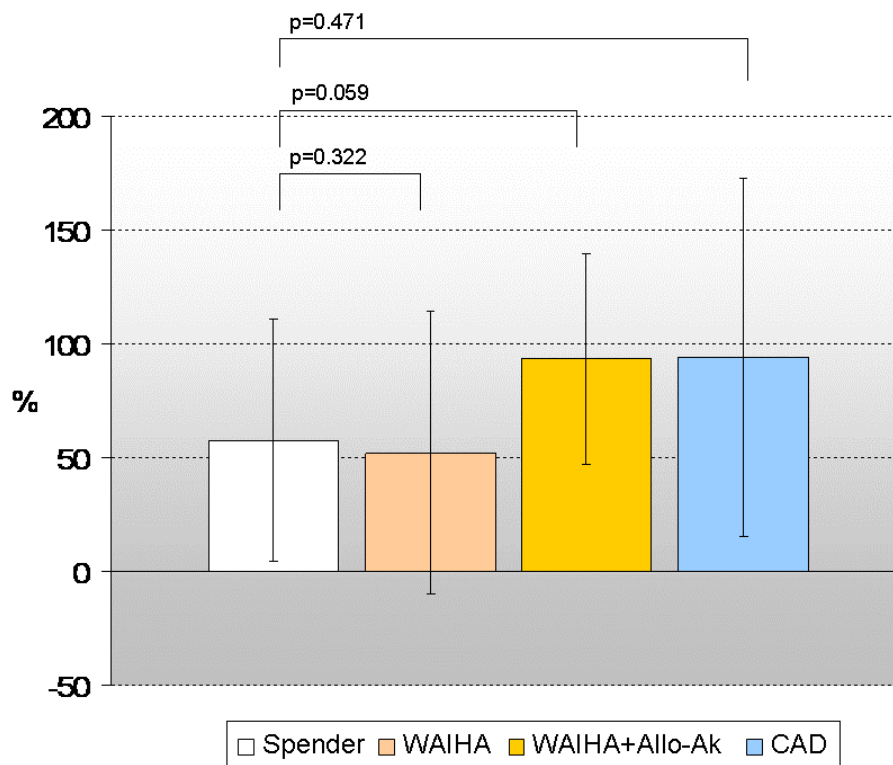


Abbildung 17: Beeinflussung der Interaktion von Erythrozyten und dendritischen Zellen durch Plasma mit Wärmeautoantikörpern, Plasma mit Wärmeautoantikörpern und Alloantikörpern und Plasma mit Kälteautoantikörpern im Vergleich zu Normalplasma gesunder Spender

Die Darstellung zeigt repräsentative Mittelwerte aus Einzelspenderplasma Messungen (Normalplasma (Spender) n=10, WAIHA n=10, WAIHA+Allo-Ak n=10, CAD n=8).

Die Interaktion von Erythrozyten und Endothelzellen ist in Gegenwart des Plasmas von Patienten mit Wärmeautoimmunhämolyse gegenüber der Anwesenheit von Normalplasma mit $p=0.322$ nicht signifikant verändert. Auch in Gegenwart des Plasmas von Patienten mit Wärmeautoimmunhämolyse und Alloantikörpern zeigt sich hinsichtlich der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion kein signifikanter Unterschied gegenüber Normalplasma ($p=0.059$). Der Trend in Anwesenheit des Plasmas von Patienten mit Wärmeautoimmunhämolyse und Alloantikörpern geht aber im Mittel in Richtung einer erhöhten Bindung gegenüber Normalplasma. Das Plasma von Patienten mit Kälteautoimmunhämolyse bewirkt im Vergleich zu Normalplasma keine signifikante Veränderung der Interaktion von Erythrozyten und dendritischen Zellen ($p=0.471$).

3.1.3 Einfluss der anti-erythrozytären Autoantikörper auf die Interaktion der Erythrozyten mit mikrovaskulären Endothelzellen und dendritischen Zellen im Vergleich

Abbildung 25 stellt die Bindung der verschiedenen Plasmapräparationen im Vergleich an mikrovaskulären Endothelzellen und dendritischen Zellen dar. Normalplasma verstärkt die Bindung der Erythrozyten an Endothelzellen, nicht aber an dendritischen Zellen, während die autoantikörperhaltigen Plasmapräparationen die Bindung der Erythrozyten an Endothelzellen und an dendritische Zellen gleichermaßen beeinflussen.

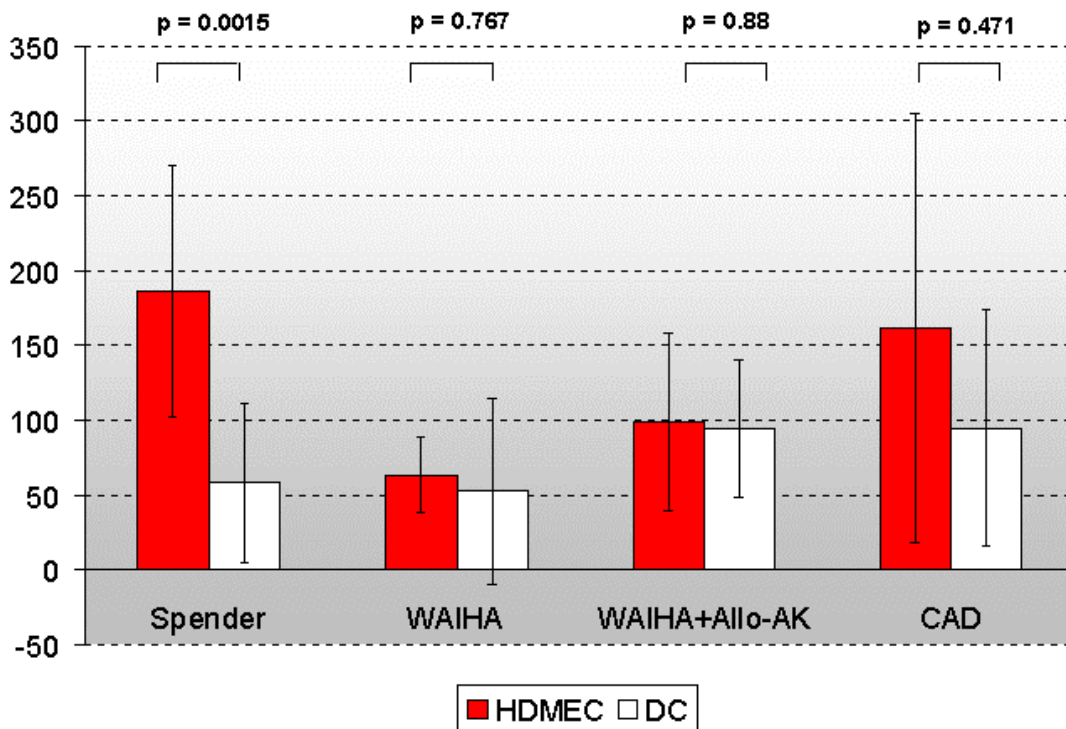


Abbildung 18: Einfluss von Plasma gesunder Spender (Spender), Plasma mit Wärmeautoantikörpern (WAIHA), Plasma mit Wärmeautoantikörpern und Alloantikörpern (WAIHA+Allo-Ak) und Plasma mit Kälteautoantikörpern (CAD) auf die Interaktion von Erythrozyten mit mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) und dendritischen Zellen im Vergleich. Die Darstellung zeigt den Mittelwert der Plasmengruppen mit Spender n=10, WAIHA n=10, WAIHA+Allo-Ak n=8, CAD n=10.

3.2 Untersuchung der funktionellen Bedeutung der Erythrozyten-Zell-Interaktion mit Gen-Chip-Analytik

Der Einfluss des Plasmas anti-erythrozytär autoimmunisierter Patienten auf das Genexpressionsprofil der Zielzellpopulation wurde mit dem PIQOR™ Immunology cDNA array untersucht. Der Gen-Chip deckt 1064 Gene ab, die repräsentativ für die folgenden Funktionsbereiche sind:

1. Immunantwort
2. Zelltod
3. Extrazelluläre Matrix
4. Signaltransduktion

Im Rahmen der Analyse werden diese 4 Themenfelder weiter differenziert, so dass sich insgesamt 12 Funktionsbereiche ergeben:

| |
|----------------------------------|
| 1. Oberflächenmarker |
| 2. Zytokine |
| 3. Signaltransduktion |
| 4. Transkriptionsfaktoren |
| 5. Stress |
| 6. Apoptose/Inflammation |
| 7. Extrazelluläre Matrix |
| 8. Zellzyklus |
| 9. Proteinabbau |
| 10. Akute-Phase Proteine |
| 11. Komplementsystem |
| 12. DNA-Reparatur /-Metabolismus |

Tabelle 5: Funktionsbereiche des Gen-Chip

Insgesamt stellt sich die Anzahl der ≥ 2 fach herauf- und herunterregulierten Gene für das Genexpressionsprofil der mikrovaskulären Endothelzellen und der Monozyten im Kontext der Erythrozyten-Zell-Interaktion unter Einfluss der verschiedenen Plasmapräparationen wie folgt dar:

| | Normalplasma | | WAIHA-Plasma | | CAD-Plasma | |
|-----------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|
| HDMEC | ↑ n = 15 | ↓ n = 20 | ↑ n = 18 | ↓ n = 12 | ↑ n = 23 | ↓ n = 55 |
| Monozyten | ↑ n = 6 | ↓ n = 1 | ↑ n = 6 | ↓ n = 60 | ↑ n = 22 | ↓ n = 60 |

Tabelle 6: Anzahl der herauf- und herunterregulierten Gene für das Genexpressionsprofil der mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) und der Monozyten im Kontext der Erythrozyten-Zell-Interaktion unter Einfluss der verschiedenen Plasmapräparationen

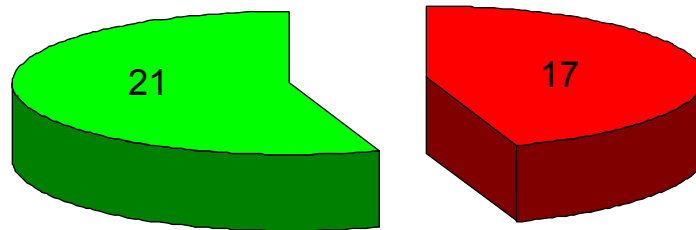
3.2.1.1 Einfluss des Plasmas anti-erythrozytär autoimmunisierter Patienten auf das Genexpressionsprofil von mikrovaskulären Endothelzellen im Kontext der Erythrozyten-Zell-Interaktion

Die Gene, die an mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) im Kontext der Endothelzell-Erythrozyten-Interaktion in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Plasmas heraufreguliert (↑) oder herunterreguliert (↓) werden, sind in Tabelle 7 quantitativ nach Anzahl der beeinflussten Genfunktionen in Zuordnung zu den entsprechenden Funktionsbereichen aufgelistet.

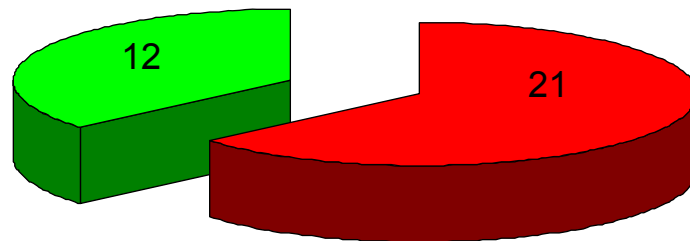
| HDMEC | Normalplasma | | WAIHA-Plasma | | CAD-Plasma | |
|--------------------------------|--|--|--|--|---|--|
| | ↑ n=17 | ↓ n=21 | ↑ n=21 | ↓ n=12 | ↑ n=36 | ↓ n=64 |
| 1. Oberflächenmarker | 6 BY55,MCAM, ITGB4, THBD, TNFRSF6, CD34 | 1 ICAM1 | 3 TFRC,CD48, CXCR4 | | 3 IL3RA,SELE, ICAM1 | 5 IFNGR1,CD58, TFRC,ITGB1,CD4 |
| 2. Zytokine | 1 TNFRSF6 | 4 INHBA, VEGC, CCL20, CSF2 | 3 CXCR4,TGFA, IL18R1 | 6 TNFC, IL3RA, SCYA2, CCL20 CSF 2 | 7 IL8,LTB,IL3RA, SCYA20, SCYA2 IFNG2, CSF2 | 5 TNFSF10, IFNGR1, BMP6,WSB1, SMAD1 |
| 3. Signaltransduktion | 5 RASA1, VAV2, MDC9, AMSH, TNFRSF6 | 2 PLA2G4, IKBE | 7 CBLB,MAP3K2,PAR2, SAP30,MMP20, CXCR4,MMP7 | 1 NBS1 | 7 LITAF,JAK1, RELB,MMP1, GAS3,NBS1 | 15 WSB1,PCNA, CTGF, LAP18,PAR2,RRAS2, MAPK9,MCL1,BARD1, EBI2,PRKCH,PLCG1, PLCG2,ALG2,SMAD1, SPRY1,RHOIP3 |
| 4. Transkriptions- faktoren | 2 FOS, EGR1 | 1 IKBE | | 1 IRF1 | 5 CREB5,JUNB,IRF1, RELB,IKBE | 5 JUN,CREM,FOS, TCF4,ZF9 |
| 5. Stress | | 4 HSC73,HSPA6, BNIP3L, IKBE | | 1 HSPD1 | 3 IKBE,RELB,GAS3 | 7 BAX,RRAS2,MCL1,BIP, HSPA1L,HSPA9,BNIP3 |
| 6. Apoptose/ Inflammation | 2 AMSH, TNFRSF6 | 3 BNIP3L,IAP1, IKBE | | 1 TNFC | 5 LITAF,KAK1,IKBE, RELB,LTB | 9 BAX,WSB1,ALG2, BNIP3, TNFSF10, RRAS2, MAPK9, MCL1,MGST2 |
| 7. Extrazelluläre Matrix | 4 ITGB, BGN, MDC9, NIDOGEN | 5 PAI1, FN1, MMP10,MMP1, HSPA1A | 4 MMP7,MMP20, TGFA,COL2A1 | 1 MMP10 | 3 PAI1,FN1,MMP1 | 9 TIMP3,BAM,LTBP1, LOX, MAGP1, OSF,MMP17, SERPINB1,PTEN |
| 8. Zellzyklus | 1 AMSH | | 1 SAP30 | 1 NBS1 | | 7 CCNG2,PCNA,CCNH, TUBA1,BARD1, PRSS11,AC15 |
| 9. Proteinabbau | | 1 IAP1 | 3 CBLB,MMP20,MMP7 | | 1 MMP1 | 2 BARD1,GRB2 |
| 10. Akute-Phase Proteine | 1 THBD | | | | 2 SELE,FN1 | |

Tabelle 7: In Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Plasmas regulierte Genfunktionen an mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) während der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion in Zuordnung zu ihren Funktionsbereichen

Normalplasma:



WAIHA-Plasma:



CAD-Plasma:

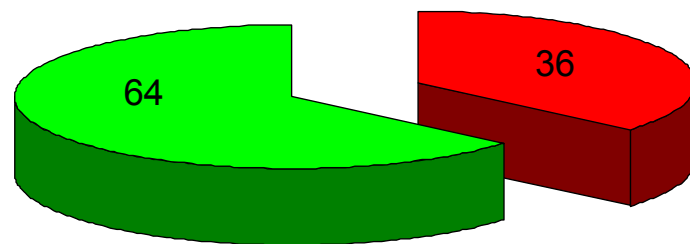


Abbildung 19: In Abhängigkeit von der eingesetzten Plasmapräparation regulierte Genfunktionen an mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC)
Die Anzahl der heraufregulierten Genfunktionen ist rot, die Anzahl der herunterregulierten Genfunktionen ist grün dargestellt.

Abbildung 20 zeigt die Anzahl der Gene, die bei der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion unter Einfluss von Normalplasma, wärmeautoantikörperhaltigem Plasma (WAIHA-Plasma) und kälteautoantikörperhaltigem Plasma (CAD-Plasma) im Vergleich der verschiedenen Plasmen gemeinsam herauf- oder herunterreguliert werden (Gen-Schnittmengen).

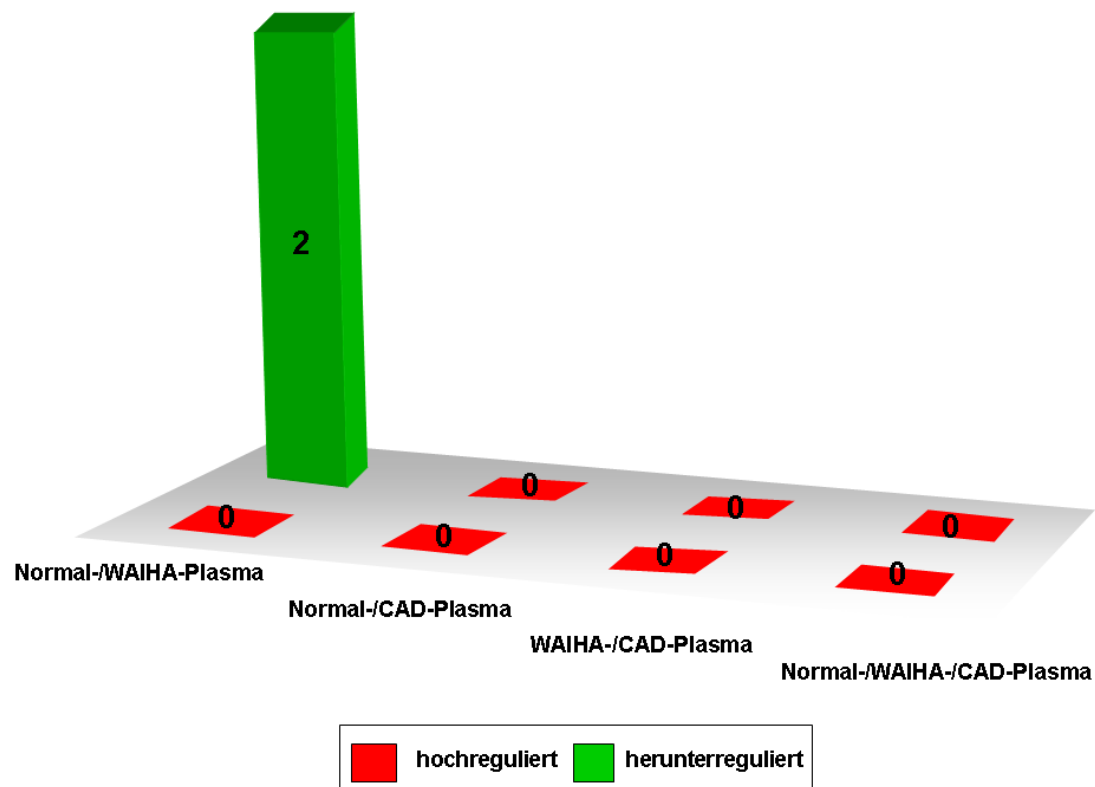


Abbildung 20: Schnittmengen der unter Einfluss von Normalplasma, WAIHA-Plasma und CAD-Plasma regulierten Gene an mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC)

Die zwei sowohl durch Normalplasma als auch durch wärmeautoantikörperhaltiges Plasma herunterregulierten Gene sind Interleukin-8 (Funktionsbereich Zytokine, Interleukine) und CD69 (Funktionsbereich Akute-Phase Proteine, Oberflächenmarker).

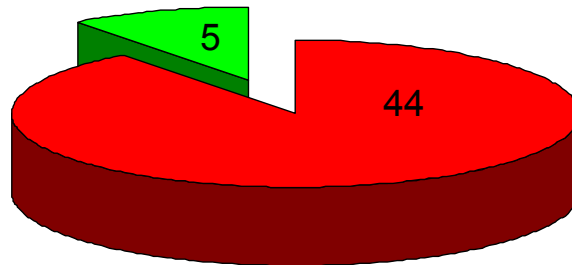
3.2.1.2 Einfluss des Plasmas anti-erythrozytär autoimmunisierter Patienten auf das Genexpressionsprofil von Monozyten im Kontext der Erythrozyten-Zell-Interaktion

Die Tabelle 9 zeigt die Gene, die an Monozyten im Kontext der Monozyten-Erythrozyten-Interaktion in Gegenwart von Normalplasma, Plasma von Patienten mit Wärmeautoimmunhämolyse oder Plasma von Patienten mit Kälteautoimmunhämolyse in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Plasmas heraufreguliert (↑) oder herunterreguliert (↓) werden, quantitativ nach Anzahl der beeinflussten Genfunktionen in Zuordnung zu den entsprechenden Funktionsbereichen.

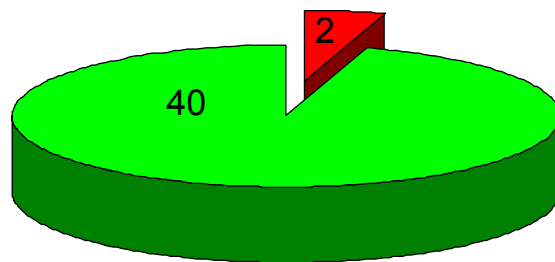
| Monozyten | Normalplasma | | WAIHA-Plasma | | CAD-Plasma | |
|---------------------------------|--|-----------------------|-------------------|--|--|--|
| Funktionsbereich | ↑ n=44 | ↓ n=5 | ↑ n=2 | ↓ n=40 | ↑ n=22 | ↓ n=29 |
| 1. Oberflächenmarker | 10 THBD,PLAUR, LRP1,MDU1, CD14,CD44, NTE,IL2RA, IL3RA,IL4R | | | 11 TNFRSF6,CD40,CD81, CD83,IFNGR1,KAI1, ANPEP,ITGB1, PECAM1,IL13RA1 | | 5 LAMP1,CD74, CD86, CD3D,PROC |
| 2. Zytokine | 7 IL3RA,IL4R, SOCS3, CX3CR1,IL2RA, TGFB,VEGF | 1 TLR5 | 1 CXCL2 | 5 TNFRSF, CD40, IFNGR1, IL13RA1, WSB1 | 4 IL10,TLR2, CSF3, ZMDA1 | 6 TNFC, CD86, IL10RA, CXCL1, CXCL7, CXCL16 |
| 3. Signaltransduktion | 6 NFKB3,EBI2, RGS1, CX3CR1,NTE, SOCS3 | 1 MMP1 9 | | 8 TNFRSF,MCL1,WSB1, FBXW1B, PRKCB1, NFKB1, PTPN7, ABIN-3 | 4 MMP20, TNFAIP2, IRAK2, TM4SF1 | 6 PCNA, EBI2, PRKCB1, CAPN2, BIRC5, IKKB |
| 4. Transkriptionsfaktoren | 6 BTG1,ILF,NFKB3, ATF3,ATF4,PC3B, MAF,MAFF | | | 2 NFKB1, HIF1A | 2 TEF, ESR2 | 1 TCF4 |
| 5. Stress | 6 HMOX2,PC3B, NFKB3,SOCS3, BTG1 | | 1 OSP94 | 3 TNFRSF6, MCL1, NFKB1 | 1 IRAK2 | 3 BAX, CXCL1, IKKB |
| 6. Apoptose/Inflammation | 4 BCL2A1, CD14, NFKB3, SOCS3 | 1 TLR5 | | 6 CD40,TNFRSF6,MCL1, NFKB1, WSB1, ABIN-3 | 3 TNFAIP2, IRAK2, PDL2 | 4 BAX,BIRC5, TNFC, IKKB |
| 7. Extrazelluläre Matrix | 3 COL7A1, Serpina1, MAPG2 | 1 MMP1 9 | | 2 COL7A1, OSF | 3 COL5A2, PAI2, MMP20 | 2 SERPINB1, TIMP2 |
| 8. Zellzyklus | 2 BTG1, PC3B | | | 2 G22P1, ABIN-3 | | 1 PCNA |
| 9. Proteinabbau | | 1 MMP1 9 | | 1 FBXW1B | 2 MMP20, C2 | 1 IKKB |
| 10. Akute-Phase Proteine | | | | | 1 C2 | |
| 11. Komplementsystem | | | | | 1 C2 | |
| 12. DNA-Reparatur/-Metabolismus | | | | | 1 NBS1 | |

Tabelle 8: In Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Plasmas regulierte Genfunktionen in Monozyten während der Erythrozyten-Monozyten-Interaktion in Zuordnung zu ihren Funktionsbereichen

Normalplasma:



WAIHA-Plasma:



CAD-Plasma

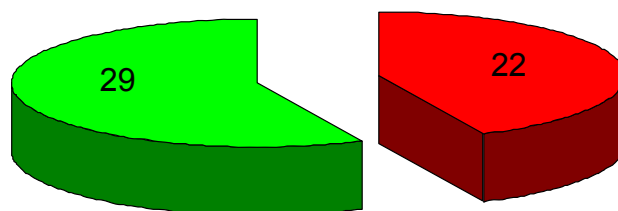


Abbildung 21: In Abhängigkeit von der eingesetzten Plasmapräparation regulierte Genfunktionen an Monozyten
Die Anzahl der heraufregulierten Genfunktionen ist rot, die Anzahl der herunterregulierten Genfunktionen ist grün dargestellt.

Abbildung 22 zeigt die Anzahl der Gene, die bei der Erythrozyten-Monozyten-Interaktion unter Einfluss von Normalplasma, wärmeautoantikörperhaltigem Plasma (WAIHA-Plasma) und kälteautoantikörperhaltigem Plasma (CAD-Plasma) im Vergleich der verschiedenen Plasmen gemeinsam herauf- oder herunterreguliert werden (Genschnittmengen).

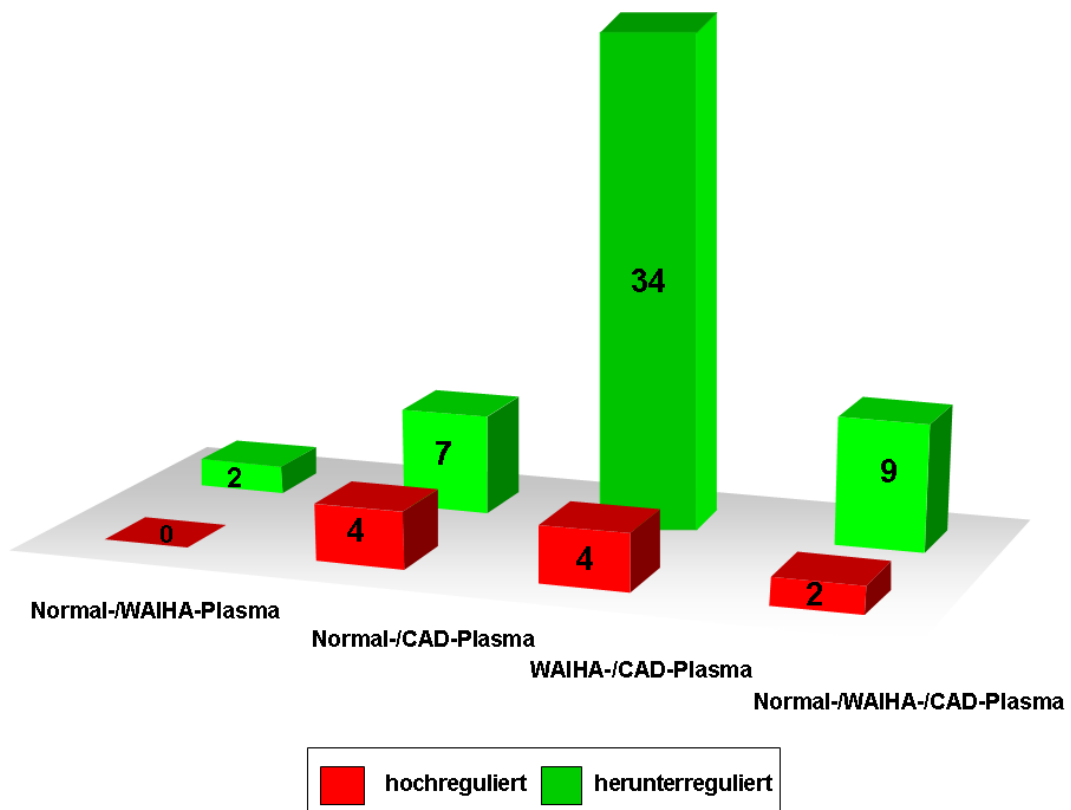


Abbildung 22: Schnittmengen der unter Einfluss von Normalplasma, wärmeautoantikörperhaltigem Plasma (WAIHA-Plasma) und kälteautoantikörperhaltigem Plasma (CAD-Plasma) an Monozyten regulierten Gene

Tabelle 9 zeigt, welche Gene hinsichtlich ihrer Regulation in Abhängigkeit von dem untersuchten Plasma Schnittmengen bilden.

| Schnittmengen an Monozyten | Normal-/WAIHA-Plasma | | Normal-/CAD-Plasma | | CAD-/WAIHA-Plasma | | Normal-/WAIHA-/CAD-Plasma | |
|----------------------------|----------------------|--------------------|------------------------|---------------------|----------------------|---|---------------------------|--|
| | ↑ n=0 | ↓ n=2 | ↑ n=4 | ↓ n=7 | ↑ n=4 | ↓ n=34 | ↑ n=2 | ↓ n=9 |
| 1. Oberflächenmarker | | 2 CD97, CD33 | | 2 IL2RG, CD69 | 1 IL1R2 | 12 CD14,FCG2,MCP, CD18,CD44x5CD44, CD9 CD45 | | 1 CD52 |
| 2. Zytokine | | | 1 IL6 | 1 IL2RG | 2 IL1R2 SCYA20 | 3 INHBA,OPN, CCR1 | | 2 SCYA2, AIF1 |
| 3. Signaltransduktion | | | | 1 MMP9 | | 9 C3R1,PAFR,VAV, SMAC,PKCB, TDAG8,HCP,PLCG2, CCR1 | | 4 ALG2, AIF1, CALM2, TGFB1 |
| 4. Transkriptionsfaktoren | | | 2 IL3BP1, FKHRL1 | | | | | |
| 5. Stress | | | 1 HMOX1 | | | 1 CLARP | 1 BNIP3L | |
| 6. Apoptose/Inflammation | | | | | 1 IL1R2 | 6 CLARP,CD1,SMAC, OPN,TDAG8,MGST2 | 1 BNIP3L | 1 ALG2 |
| 7. Extrazelluläre Matrix | | | | 1 MMP9 | | 2 CD18,OPN | | 1 TGFB1 |
| 9. Proteinabbau | | | | 1 MMP9 | | | | |
| 10. Akute-Phase Proteine | | | | 1 CD69 | | | | |
| 11. Komplementsystem | | | | | | 1 CRR1 | | |

Tabelle 9: Aufschlüsselung der Schnittmengen der unter Einfluss von Normalplasma, wärmeautoantikörperhaltigem Plasma (WAIHA-Plasma) und kälteautoantikörperhaltigem Plasma (CAD-Plasma) an Monozyten regulierten Gene

3.2.2.1 Vergleichende Analyse des Einflusses anti-erythrozytärer Wärme- und Kälteautoantikörper auf die während der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion regulierten Endothelzell-Gene

In einem weiteren Schritt wurde zur Einschätzung der immunologischen Bedeutung des Einflusses der anti-erythrozytären Wärme- und Kälteautoantikörper auf die während der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion in Gegenwart von Autoantikörpern regulierten Endothelzell-Gene untersucht, welche 20 Gene mit höchster Signifikanz durch anti-erythrozytäre Wärmeautoantikörper und anti-erythrozytäre Kälteautoantikörper unterschiedlich reguliert werden. Tabelle 10 zeigt die 20 unter Autoantikörper einfluss in Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Plasmas am signifikantesten unterschiedlich regulierten Gene (wärmeautoantikörperhaltiges Plasma vs. kälteautoantikörperhaltiges Plasma).

| Genename | UniGene | Exp_54 | Exp_55 |
|------------|-----------|--------|--------|
| SELE | Hs.89546 | 0,19 | 3,8 |
| CCL20 | Hs.75498 | 0,14 | 2,73 |
| TNFC | Hs.376208 | 0,34 | 2,69 |
| IL3RA | Hs.460433 | 0,47 | 3,12 |
| IRF1 | Hs.80645 | 0,46 | 2,63 |
| NBS1 | Hs.25812 | 0,4 | 2,37 |
| ICAM1 | Hs.386467 | 0,52 | 2,79 |
| BNIP3L | Hs.132955 | 3,01 | 0,73 |
| IL8_HUMAN | Hs.624 | 0,24 | 2,3 |
| JAK1 | Hs.436004 | 0,7 | 2,55 |
| GM-CSF | Hs.1349 | 0,08 | 2,69 |
| SOD2 | Hs.384944 | 0,23 | 2,2 |
| MMP1_HUMAN | Hs.83169 | 0,62 | 2,44 |
| BNIP3 | Hs.79428 | 2,45 | 0,38 |
| SAP30 | Hs.512813 | 2,04 | 0,54 |
| WSB-1 | Hs.315379 | 1,78 | 0,26 |
| PAI1 | Hs.414795 | 0,99 | 2,96 |
| CCL2_HUMAN | Hs.303649 | 0,5 | 2,51 |
| PAR2 | Hs.154299 | 2,24 | 0,39 |
| RELB | Hs.307905 | 1,01 | 2,23 |

Tabelle 10: Die 20 Gene, die mit höchster Signifikanz durch anti-erythrozytäre Wärmeautoantikörper und anti-erythrozytäre Kälteautoantikörper im Vergleich während der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion unterschiedlich reguliert werden

Verglichen wird der Einfluss von wärmeautoantikörperhaltigem Plasma (WAIHA) und kälteautoantikörperhaltigem Plasma (CAD) auf die Genexpression der Endothelzellen. Die Tabelle zeigt die Gene, bei denen der Einfluss der beiden Plasmapräparationen im Vergleich die signifikantesten Unterschiede in der Genexpression bewirkte.

3.2.2.2 Vergleichende Analyse des Einflusses anti-erythrozytärer Wärme- und Kälteautoantikörper auf die während der Erythrozyten-Monozyten-Interaktion regulierten Monozyten-Gene

Zur Einschätzung der immunologischen Bedeutung des Einflusses der anti-erythrozytären Wärme- und Kälteautoantikörper auf die während der Erythrozyten-Monozyten-Interaktion in Gegenwart von Autoantikörpern regulierten Monozyten-Gene wurde untersucht, welche 20 Gene mit höchster Signifikanz durch anti-erythrozytäre Wärmeautoantikörper und anti-erythrozytäre Kälteautoantikörper unterschiedlich reguliert werden.

| Genename | UniGene | Exp_45 | Exp_46 |
|----------|-----------|--------|--------|
| CCL20 | Hs.75498 | 4,59 | 10,26 |
| TLR2 | Hs.519033 | 0,71 | 2,44 |
| BNIP3L | Hs.132955 | 4,02 | 2,30 |
| FKHRL1 | Hs.14845 | 0,90 | 2,16 |
| HSPA1L | Hs.80288 | 1,66 | 0,64 |
| HSPA6 | Hs.3268 | 0,85 | 1,89 |
| TM4SF1 | Hs.351316 | 1,88 | 4,39 |
| IL1R2 | Hs.25333 | 2,84 | 5,30 |
| LCK | Hs.1765 | 1,22 | 0,57 |
| TNFAIP3 | Hs.211600 | 0,53 | 1,17 |
| CD3D | Hs.95327 | 1,27 | 0,44 |
| PCNA | Hs.78996 | 0,87 | 0,33 |
| TNFAIP6 | Hs.407546 | 0,71 | 1,31 |
| PAI2 | Hs.75716 | 1,60 | 2,29 |
| MGST1 | Hs.389700 | 1,08 | 1,76 |
| ZF9 | Hs.285313 | 0,54 | 1,07 |
| CSF3 | Hs.2233 | 1,23 | 2,26 |
| BAG-3 | Hs.15259 | 1,03 | 1,82 |
| E4BP4 | Hs.79334 | 1,29 | 2,12 |
| SOD2 | Hs.384944 | 0,89 | 1,45 |

Tabelle 11: Die 20 Gene, die mit höchster Signifikanz durch anti-erythrozytäre Wärmeautoantikörper und anti-erythrozytäre Kälteautoantikörper im Vergleich während der Erythrozyten-Monozyten-Interaktion unterschiedlich reguliert werden

Verglichen wird der Einfluss von wärmeautoantikörperhaltigem Plasma (WAIHA) und kälteautoantikörperhaltigem Plasma (CAD) auf die Genexpression der Monozyten. Die Tabelle zeigt die Gene, bei denen der Einfluss der beiden Plasmapräparationen im Vergleich die signifikantesten Unterschiede in der Genexpression bewirkte.

3.2.3 Analyse des Einflusses anti-erythrozytärer Wärme- und Kälteautoantikörper auf die regulierten Gene in mikrovaskulären Endothelzellen und Monozyten im Hinblick auf die verschiedenen immunologischen Funktionsgruppen

Tabelle 13 zeigt die durch anti-erythrozytäre Wärme- im Vergleich zu Kälteautoantikörpern regulierten Gene in Endothelzellen und Monozyten differenziert nach den verschiedenen immunologischen Funktionsgruppen.

| Endothelzellen | | | | Monozyten | | | |
|-------------------------------|-----------|--------|--------|-----------|-----------|--------|--------|
| Zytokine | | | | | | | |
| Genename | UniGene | Exp 54 | Exp 55 | Genename | UniGene | Exp 45 | Exp 46 |
| CCL20 | Hs.75498 | 0,14 | 2,73 | CCL20 | Hs.75498 | 4,59 | 10,26 |
| TNFC | Hs.376208 | 0,34 | 2,69 | TLR2 | Hs.519033 | 0,71 | 2,44 |
| IL3RA | Hs.460433 | 0,47 | 3,12 | IL1R2 | Hs.25333 | 2,84 | 5,3 |
| IL8 | Hs.624 | 0,24 | 2,3 | CSF3 | Hs.2233 | 1,23 | 2,26 |
| GM-CSF | Hs.1349 | 0,08 | 2,69 | | | | |
| WSB-1 | Hs.315379 | 1,78 | 0,26 | | | | |
| CCL2 | Hs.303649 | 0,5 | 2,51 | | | | |
| Signaltransduktion | | | | | | | |
| NBS1 | Hs.25812 | 0,4 | 2,37 | LCK | Hs.1765 | 1,22 | 0,57 |
| JAK1 | Hs.436004 | 0,7 | 2,55 | TNFAIP3 | Hs.211600 | 0,53 | 1,17 |
| MMP1 | Hs.83169 | 0,62 | 2,44 | PCNA | Hs.78996 | 0,87 | 0,33 |
| SAP30 | Hs.512813 | 2,04 | 0,54 | BAG-3 | Hs.15259 | 1,03 | 1,82 |
| WSB-1 | Hs.315379 | 1,78 | 0,26 | | | | |
| PAR2 | Hs.154299 | 2,24 | 0,39 | | | | |
| RELB | Hs.307905 | 1,01 | 2,23 | | | | |
| Apoptose/Inflammation | | | | | | | |
| TNFC | Hs.376208 | 0,34 | 2,69 | TLR2 | Hs.519033 | 0,71 | 2,44 |
| BNIP3L | Hs.132955 | 3,01 | 0,73 | BNIP3L | Hs.132955 | 4,02 | 2,3 |
| JAK1 | Hs.436004 | 0,7 | 2,55 | IL1R2 | Hs.25333 | 2,84 | 5,3 |
| BNIP3 | Hs.79428 | 2,45 | 0,38 | TNFAIP3 | Hs.211600 | 0,53 | 1,17 |
| WSB-1 | Hs.315379 | 1,78 | 0,26 | TNFAIP6 | Hs.407546 | 0,71 | 1,31 |
| RELB | Hs.307905 | 1,01 | 2,23 | BAG-3 | Hs.15259 | 1,03 | 1,82 |
| Stress | | | | | | | |
| BNIP3L | Hs.132955 | 3,01 | 0,73 | BNIP3L | Hs.132955 | 4,02 | 2,3 |
| BNIP3 | Hs.79428 | 2,45 | 0,38 | HSPA1L | Hs.80288 | 1,66 | 0,64 |
| RELB | Hs.307905 | 1,01 | 2,23 | HSPA6 | Hs.3268 | 0,85 | 1,89 |
| | | | | TNFAIP3 | Hs.211600 | 0,53 | 1,17 |
| | | | | BAG-3 | Hs.15259 | 1,03 | 1,82 |
| Oberflächenmarker | | | | | | | |
| SELE | Hs.89546 | 0,19 | 3,8 | IL1R2 | Hs.25333 | 2,84 | 5,3 |
| IL3RA | Hs.460433 | 0,47 | 3,12 | CD3D | Hs.95327 | 1,27 | 0,44 |
| ICAM1 | Hs.386467 | 0,52 | 2,79 | | | | |
| Transkriptionsfaktoren | | | | | | | |
| IRF1 | Hs.80645 | 0,46 | 2,63 | FKHRL1 | Hs.14845 | 0,9 | 2,16 |
| SAP30 | Hs.512813 | 2,04 | 0,54 | ZF9 | Hs.285313 | 0,54 | 1,07 |
| RELB | Hs.307905 | 1,01 | 2,23 | E4BP4 | Hs.79334 | 1,29 | 2,12 |

| Extrazelluläre Matrix | | | | | | | |
|--|-----------|----------|------|------|----------|------|------|
| MMP1 | Hs.83169 | 0,62 | 2,44 | PAI2 | Hs.75716 | 1,6 | 2,29 |
| PAI1 | Hs.414795 | 0,99 | 2,96 | | | | |
| Zellzyklus | | | | | | | |
| SAP30 | Hs.512813 | 2,04 | 0,54 | PCNA | Hs.78996 | 0,87 | 0,33 |
| DNA-Reparaturmechanismen/-metabolismus | | | | | | | |
| 1.244 | NBS1 | Hs.25812 | 0,4 | | | | |
| Akute-Phase Proteine | | | | | | | |
| SELE | Hs.89546 | 0,19 | 3,8 | | | | |
| Proteinabbau | | | | | | | |
| MMP1 HUMAN | Hs.83169 | 0,62 | 2,44 | | | | |

Tabelle 12: Die 20 Gene, die im Vergleich von wärmeautoantikörperhaltigem Plasma vs. kälteautoantikörperhaltigem Plasma die signifikantesten Unterschiede bezüglich der Genregulation in Anwesenheit von Erythrozyten aufweisen, in Zuordnung zu ihren immunologischen Funktionsbereichen

Durch kälteautoantikörperhaltiges Plasma im Vergleich zu wärmeautoantikörperhaltigem Plasma stärker induzierte Gene sind rot unterlegt. Durch wärmeautoantikörperhaltiges Plasma im Vergleich zu kälteautoantikörperhaltigem Plasma stärker induzierte Gene sind nicht unterlegt.

Die nachstehende Tabelle zeigt Vorangehendes in der Zusammenfassung.

| | EC | M | EC | M | EC | M |
|-----------------------------|-----------------------|---|---|---|--|---|
| Funktionsbereich | regulierte Funktionen | | Bei WAIHA- induziert im Vergleich zu CAD-Plasma | | Bei WAIHA- reprimiert im Vergleich zu CAD-Plasma | |
| Zytokine | 7 | 4 | 6 | 4 | 1 | 0 |
| Signaltransduktion | 7 | 4 | 4 | 2 | 3 | 2 |
| Apoptose/Inflammation | 6 | 6 | 3 | 5 | 3 | 1 |
| Stress | 3 | 5 | 1 | 1 | 2 | 4 |
| Oberflächenmarker | 3 | 2 | 3 | 1 | | 1 |
| Transkriptionsfaktoren | 3 | 3 | 2 | 3 | 1 | |
| Extrazelluläre Matrix | 2 | 1 | 2 | 1 | | |
| Zellzyklus | 1 | 1 | | | 1 | 1 |
| DNA-Reparatur/-Metabolismus | 1 | | 1 | | | |
| Akute-Phase Proteine | 1 | | 1 | | | |
| Proteinabbau | 1 | | 1 | | | |

Tabelle 13: Verteilung der regulierten Genfunktionen auf die immunologischen Funktionsbereiche und Vergleich des Einflusses von wärmeautoantikörperhaltigem Plasma und kälteautoantikörperhaltigem Plasma auf die Genexpression Die Tabelle zeigt die Verteilung der Funktionen der 20 signifikant unterschiedlich während der Erythrozyten-Endothelzell- bzw. Erythrozyten-Monozyten-Interaktion regulierten Gene (wärmeautoantikörperhaltiges Plasma vs. kälteautoantikörperhaltiges Plasma) auf die immunologischen Funktionsbereiche.

EC=Endothelzellen/M=Monozyten

4 Diskussion

Ziel der Transfusionsmedizin ist die sichere hämotherapeutische Versorgung von Patienten. Anti-erythrozytäre Autoimmunerkrankungen wie die IgM-vermittelte Kälteautoimmunhämolyse oder die IgG-vermittelte Wärmeautoimmunhämolyse führen bei der transfusionsmedizinischen Versorgung von Patienten häufig zu Komplikationen der Hämotherapie, nicht zuletzt deshalb, weil sie ein relevantes Risiko der transfusionsassoziierten Alloimmunisierung implizieren [127]. In Anbetracht des hohen Anteils präexistenter Alloantikörper und der hohen Raten der Alloimmunisierungen unter laufendem Transfusionsregime bei Patienten mit anti-erythrozytären Autoantikörpern wird deutlich, dass es zur Gewährleistung einer sicheren Hämotherapie notwendig ist, Mechanismen der Immunisierung gegen erythrozytäre Autoantigene zu verstehen. Die Präsentation erythrozytärer Allo- oder Autoantigene ist in der Literatur nicht im Detail gesondert untersucht worden. Man nimmt derzeit an, dass die üblichen Antigenpräsentationsmechanismen auch im Fall der Erythrozytenantigene sowohl bei der anti-erythrozytären Alloimmunantwort im Rahmen von Transfusionen als auch bei der anti-erythrozytären Autoimmunantwort zum Tragen kommen. Erythrozyten unterliegen jedoch der Besonderheit, bereits in ihrem physiologischen Milieu - dem peripheren Blut - in Interaktion mit Zellen zu stehen, die grundsätzlich oder unter besonderen induzierenden Bedingungen wie der Entzündung zur Antigenpräsentation befähigt sind. Die klinisch-immunologische Relevanz von Erythrozyten-Zell-Interaktionen in der peripheren Zirkulation im Hinblick auf die Präsentation erythrozytärer Allo- oder Autoantigene ist bisher in der Literatur nicht thematisiert worden. Das Verständnis der klinisch-immunologischen Relevanz von Erythrozyten-Zell-Interaktionen in der peripheren Zirkulation im Hinblick auf die Präsentation erythrozytärer Antigene könnte jedoch für das Verständnis der Pathophysiologie von Allo- und Autoimmunisierungsprozessen gegen Erythrozytenantigene und deren Prophylaxe von wesentlicher Bedeutung sein.

Die vorliegende Arbeit nimmt die offenen Fragen zur Pathophysiologie des Allo- und Autoimmunisierungsprozesses gegen Erythrozytenantigene und deren Prophylaxe zum Anlass, den Einfluss hämotherapeutisch relevanter anti-erythrozytärer Autoantikörper auf Erythrozyten-Zell-Interaktionen unter hämorheologischen und unter immunologischen Gesichtspunkten zu untersuchen. Im Detail sollten die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Besteht ein Einfluss anti-erythrozytärer Autoantikörper auf hämorheologisch und immunologisch relevante Erythrozyten-Zell-Interaktionen?
2. Ist der Einfluss anti-erythrozytärer Autoantikörper auf Erythrozyten-Zell-Interaktionen funktionell relevant ?

Es war Voraussetzung für die Durchführung der Arbeit, als Erstes ein experimentelles System zuverlässig zu etablieren und zu validieren, das es erlaubt, den funktionellen Impact von verschiedenen Plasmapräparationen auf die Erythrozyten-Zell-Interaktion und auf das Genexpressionsprofil der mit den Erythrozyten interagierenden Zellen in Abhängigkeit von dieser Interaktion zu untersuchen. Der für diese Arbeit gewählte methodische Ansatz kombiniert die biomolekulare Interaktionsanalyse und die Genexpressionsanalyse mit cDNA-Chips. Die biomolekulare Interaktionsanalyse erlaubt die markierungsfreie und zeitaufgelöste Messung der Bindung von Biomolekülen. Einer der beiden Interaktionspartner wird an eine geeignete Oberfläche gekoppelt, der andere befindet sich in Lösung. Seine Bindung an den immobilisierten Reaktionspartner wird online verfolgt. Zur Untersuchung von Zell-Zell-Interaktionen wurde das offene Küvetten-system eines IAsys®-single-well-Instrumentes eingesetzt. Die Zielzellen wurden an Carboxylat- oder Aminosilanoberflächen immobilisiert. Ligat sind die Erythrozyten. Die Interaktion fand in Gegenwart von verschiedenen Plasmapräparationen statt.

Die Genexpressionsanalyse wurde mit cDNA Chips der Firma Memorec durchgeführt: Die Erythrozyten-Zell-Interaktion fand in Gegenwart der verschiedenen Plasmapräparationen statt, es erfolgte die RNA-Präparation der Zielzellen, die reverse Transkription der RNA, die Markierung der cDNA mit Fluoreszenzfarbstoffen, die Hybridisierung der Microarrays, das Scannen der Arrays und die PC-gestützte Analyse.

Neben den so genannten professionellen antigenpräsentierenden Zellen (dendritische Zellen, Monozyten/Makrophagen, B-Lymphozyten) könnten zwei weitere Zelltypen bei der Induktion anti-erythrozytärer Immunantworten eine Rolle spielen, die bisher im Kontext der Frage der Induktion anti-erythrozytärer Antikörperantworten kaum Beachtung finden:

Dendritische Zellen kommen nicht nur in der Epidermis als klassische Langerhans-Zellen und in den peripheren lymphatischen Geweben vor, sondern in einer Häufigkeit von anteilig 0,1-1,0% der zirkulierenden Monozyten im peripheren Blut (PBMC) auch im peripheren Blut [46]. Dendritische Zellen im peripheren Blut interagieren

selektinvermittelt mit Gefäßendothel und können so bei Bedarf in periphere Gewebe auswandern. Ihre physiologische Rolle im peripheren Blut ist derzeit jedoch noch unklar [108]. Die direkte Isolierung dendritischer Zellen aus peripherem Blut ist seit kurzem technisch möglich [108]. Dendritische Zellen im peripheren Blut könnten als direkt am Ort des Geschehens verfügbare antigenpräsentierende Zellen für Erythrozyten-Antigene eine wesentliche pathophysiologische Rolle bei der Entstehung der anti-erythrozytären Immunisierung spielen. Für eine Subpopulation dendritischer Zellen im peripheren Blut wurde kürzlich die Fähigkeit zur Phagozytose opsonierter Schaf-Erythrozyten beschrieben [117]. Ob dendritische Zellen des peripheren Blutes eine Rolle beim Pathomechanismus der anti-erythrozytären Immunisierung im Humansystem spielen, ist auf dem Hintergrund der existierenden Literatur eine berechnete Frage, die derzeit noch in keiner Weise experimentell angegangen worden ist.

In den letzten Jahren ist die Fähigkeit von Endothelzellen zur Antigenpräsentation zunehmend evident geworden: Arbeiten der letzten Jahre haben gezeigt, dass vaskuläre Endothelzellen opsonierte Partikel via Fc γ -Rezeptor oder komplementrezeptorvermittelte Mechanismen internalisieren können [133]. Was geschieht mit diesen in die Endothelzelle internalisierten Partikeln? Vaskuläre Endothelzellen haben direkten Kontakt zu den Zellen des peripheren Blutes, unter anderem zu T-Lymphozyten. Sowohl vaskuläre Endothelzellen als auch T-Lymphozyten weisen Zelloberflächenrezeptoren auf, die die Endothelzell-T-Zell-Interaktion ermöglichen. Arbeiten der letzten 3-4 Jahre zeigen, dass Endothelzellen in der Tat *in vivo* als antigenpräsentierende Zellen fungieren können und dass Antigenpräsentation via Endothelzelle zumindest im transgenen Mausmodell eine Rolle bei der Transplantatabstoßung spielen kann [111]. In der Zirkulation kommt es unter physiologischen Bedingungen zu engen Interaktionen zwischen Erythrozyten und Endothelzellen, vor allem im Bereich der kleinen Gefäße in der Mikrozirkulation. Es stellt sich die Frage, ob diese Interaktion – besonders im Fall der IgG-Beladung von Erythrozyten – zur Präsentation von Erythrozytenantigenen beitragen kann. Diese Frage ist bisher in der Literatur noch nicht thematisiert worden.

Auf der Basis dieser Überlegungen wurden für die biomolekulare Interaktionsanalyse als Zielzellen der plasmaabhängigen Erythrozyteninteraktion mikrovaskuläre Endothelzellen und dendritische Zellen des peripheren Blutes gewählt. Für die Genexpressionsanalysen wurden als Zielzellen neben mikrovaskulären Endothelzellen

Monozyten des peripheren Blutes als klassische Antigen-präsentierende Zellen gewählt.

4.1 Untersuchung von Erythrozyten-Zell-Interaktionen unter Real-Time Bedingungen mit Biosensor-Technologie

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss anti-erythrozytärer Autoantikörper auf hämorheologisch relevante Erythrozyten-Zell-Interaktionen zu analysieren. Die Analyse wurde exemplarisch an mikrovaskulären Endothelzellen und an dendritischen Zellen des peripheren Blutes durchgeführt.

Die Untersuchungsergebnisse zeigen, dass anti-erythrozytäre Wärmeautoantikörper die Erythrozyten-Zell-Interaktion an mikrovaskulären Endothelzellen, nicht aber an dendritischen Zellen des peripheren Blutes, statistisch signifikant vermindern: Anti-erythrozytäre Wärmeautoantikörper haben somit einen Einfluss auf hämorheologisch relevante Erythrozyten-Endothelzell-Interaktionen, aber nicht auf die Interaktion der Erythrozyten mit den primär unter dem immunologischen Aspekt der Antigenpräsentation relevanten dendritischen Zellen des peripheren Blutes. Enthält das wärmeautoantikörperhaltige Plasma zusätzlich anti-erythrozytäre Alloantikörper ist der die Erythrozyten-Zell-Interaktion abschwächende Effekt des Wärmeautoantikörper enthaltenden Plasmas teilweise aufgehoben. Die Präsenz anti-erythrozytärer Kälteautoantikörper hingegen beeinflusst weder die Erythrozyten-Zell-Interaktion an mikrovaskulären Endothelzellen noch die an dendritischen Zellen des peripheren Blutes.

Der Großteil der bisher veröffentlichten Daten zur Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion bezieht sich auf pathologisch veränderte Erythrozyten, d. h. Erythrozyten mit Membranveränderungen und geht nicht auf den Einfluss der Plasmazusammensetzung ein. In einigen Studien konnte jedoch eine durch Plasmaeigenschaften vermittelte Verminderung der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion im Bezug auf gesunde Erythrozyten beobachtet werden. Diese Studien dokumentierten *in vitro*, dass die Adhäsion von Erythrozyten an Endothelzellen unter physiologischen Bedingungen und der Einwirkung von Scherkräften in der Anwesenheit eines Albumin-Puffers abnimmt [55, 123] und im Vergleich zur Anwesenheit von Normalplasma um das 5-fache vermindert ist [50, 90, 124]. Eine durch die Plasmazusammensetzung herbeigeführte Verstärkung der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion wurde hingegen in Anwesenheit

des Plasmas von Patienten mit Sichelzellanämie in der Sichelzellkrise erfasst. Es zeigte sich, dass 90% der Sichelzellerythrozyten in Anwesenheit von autologem Plasma an Endothelzellen adhärten [47-50, 90]. Unter dem Einfluss von Normalplasma reduzierte sich die Adhäsionsfraktion der Sichelzellen auf 20%. Gleichzeitig wurde beschrieben, dass auch die Adhäsionsneigung gesunder Erythrozyten in Gegenwart des Plasmas von Sichelzellanämiepatienten, das während einer Sichelzellkrise entnommen wurde, gegenüber Normalplasma geringfügig gesteigert war [47, 48, 50, 90]. Als Plasmakomponenten, die für den adhäsionsfördernden Effekt des Plasmas von Sichelzellanämiepatienten verantwortlich sind, werden unter anderem Fibrinogen [31, 32, 72] sowie Thrombin [78] diskutiert. Auch eine Hyperosmolarität des Plasmas kann zu einer gesteigerten Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion beitragen [124]. Vor dem Hintergrund dieser Beobachtungen wird deutlich, dass Plasma grundsätzlich als Modulator der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion fungiert. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten belegen zusammenfassend, dass Plasma als Modulator der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion auch im Fall von Patienten mit IgG-vermittelter Wärmeautoimmunhämolyse signifikant beteiligt ist, nicht aber im Fall von Patienten mit IgM-vermittelter Kälteautoimmunhämolyse.

Im Widerspruch zu der verminderten Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion im Rahmen der Wärmeautoimmunhämolyse stehen Ergebnisse, welche die Erythrozyten-Endothelzell-Interaktionen im Rahmen des physiologischen Erythrozytenabbaus untersuchen. Demzufolge werden gealterte Erythrozyten durch eine verstärkte Bindung von IgG auf ihrer Oberfläche an Zellen des phagozytotischen Systems an der Gefäßwand und an Endothelzellen gebunden [17, 66-68, 90, 123]. Es stellt sich die Frage, warum die Bindung von IgG in diesem Fall die Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion verstärkt, während das Coating mit IgG im Rahmen der Wärmeautoimmunhämolyse die Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion vermindert. Eine Erklärung für diesen scheinbaren Widerspruch könnte sein, dass die *freien* IgG-Moleküle im Serum der entscheidende Faktor für die verminderte Interaktion von Erythrozyten und Endothelzellen sind und nicht die erythrozytengebundenen Immunglobuline, also das Coating der Erythrozyten. Diesbezüglich erfasste die Studie von Barker et al. eine signifikante Beziehung ($p < 0.02$) zwischen der Serumkonzentration von *freiem* IgG im Serum und dem Schweregrad der Hämolyse. Ursächlich wird vermutet, dass freies IgG im Serum die Interaktion von IgG -

sensitivierten Erythrozyten mit Makrophagen vermindert [5]. Aufgrund der vorliegenden Studie lässt sich dieses Phänomen auf der Basis einer verminderten Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion erklären [30].

Die Phase der akuten Hämolyse ist die Phase der maximalen IgG-Antikörperbeladung. Es gibt Daten, die darauf hinweisen, dass es in dieser Phase der akuten Hämolyse seltener zur Bildung von anti-erythrozytären Alloantikörpern bei Patienten mit Wärmeautoimmunhämolyse kommt als in der Phase der Rekonvaleszenz [114]. Das Coating der Erythrozyten mit IgG vermindert die Interaktion der Erythrozyten mit den Endothelzellen. Es ist also zu vermuten, dass eine potentiell antigenpräsentierende Funktion der Endothelzellen in der Phase der akuten Hämolyse, in der die Erythrozyten maximal mit IgG beladen sind, gehemmt sein könnte. Es könnte sich dabei um einen Schutzmechanismus handeln, der die Bildung der Alloantikörper verhindert. In der Rekonvaleszenz-Phase der Wärmeautoimmunhämolyse sind die Erythrozyten in geringerem Maße mit IgG beladen. In dieser Phase kommt es häufiger zur Bildung der Alloantikörper [127]. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Versuchsreihen zeigten, dass der auf die Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion abschwächend wirkende Effekt der Wärmeautoantikörper durch die gleichzeitige Anwesenheit von Alloantikörpern wieder aufgehoben wird und unterstützen die Vermutung, dass Endothelzellen in der Rekonvaleszenz-Phase der Wärmeautoimmunhämolyse wieder eine aktive antigenpräsentierende Funktion übernehmen könnten [114]. Zusammenfassend zeigen hinsichtlich des Einflusses anti-erythrozytärer Autoantikörper auf Erythrozyten-Zell-Interaktionen anti-erythrozytäre Wärmeautoantikörper – im Gegensatz zu anti-erythrozytären Kälteautoantikörpern - einen Einfluss auf hämorheologisch und immunologisch relevante Erythrozyten-Endothelzell-Interaktionen im kapillaren Gefäßsystem und sind somit nicht nur im Hinblick auf die Lyseprozesse und die damit verbundenen klinischen Folgen klinisch relevant. Weitere Studien werden die Einflüsse anti-erythrozytärer Wärmeautoantikörper auf Hämorheologie und immunologische Aspekte der Endothelzellfunktion in der Mikrozirkulation im Detail klären müssen.

4.2 Untersuchung der funktionellen Bedeutung der Erythrozyten-Zell-Interaktion mit Genchip-Analytik

Durch die Analyse des Genexpressionsprofils unter Einsatz des PIQOR™ Immunology Microarray (Memorec Biotec GmbH, Köln, Deutschland) wurde der Frage nachgegangen, ob der Einfluss anti-erythrozytärer Autoantikörper auf Erythrozyten-

Zell-Interaktionen durch Änderung des Genexpressionsprofils manifestierte funktionelle Relevanz besitzen könnte.

Die Anwesenheit von sowohl wärmeautoantikörperhaltigem Plasma als auch kälteautoantikörperhaltigem Plasma hatte einen signifikanten Einfluss auf das Genexpressionsprofil beider analysierter Zelltypen, mikrovaskuläre Endothelzellen und Monozyten. Die Endothelzellen reagierten stärker auf das veränderte Plasmamilieu. Während die durch Wärmeautoantikörper und Kälteautoantikörper beeinflussten Gene an den Endothelzellen in insgesamt 36 immunologisch relevanten Funktionsbereichen fungieren, wurden an den Monozyten nur 26 immunologisch relevante Funktionsbereiche der Zellen beeinflusst.

Gleichzeitig zeigten sich signifikant unterschiedliche Effekte auf das Genexpressionsprofil im Vergleich der beiden Plasmapräparationen zueinander. Eine deutlich unterschiedliche Einflussnahme des Plasmamilieus im Kontext Wärmeautoantikörper vs. Kälteautoantikörper zeigte sich in den immunologisch relevanten Funktionsbereichen Zytokine, Signaltransduktion und Apoptose/Inflammation. Im wärmeautoantikörperhaltigen Plasmamilieu wurden im Funktionsbereich Apoptose im Vergleich zum kälteautoantikörperhaltigen Plasmamilieu 8 Gene vermindert exprimiert. Bemerkenswert ist, dass 3 dieser Genprodukte eine antiinflammatorische Wirkung haben, so dass folglich unter dem Einfluss von Wärmeautoantikörpern die antiinflammatorische Zellfunktion unterdrückt zu sein scheint. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass unter dem Einfluss von Wärmeautoantikörpern ein proinflammatorisches Plasmamilieu entsteht. Des Weiteren wird in der Anwesenheit von wärmeautoantikörperhaltigem Plasma das Gen *BCL2-associated athanogene 3* an Monozyten im Vergleich zur Anwesenheit von Kälteautoantikörpern vermindert exprimiert. Das Produkt dieses Gens hat eine adhäsionsvermindernde Wirkung. Dass es also im wärmeautoantikörperhaltigen Plasmamilieu vermindert exprimiert wird, würde für eine verstärkte Monozyten-Zell-Interaktion unter dem Einfluss von wärmeautoantikörperhaltigem Plasma sprechen. Einen weiteren interessanten Aspekt bietet die Analyse der Expression des *Janus kinase 1*-Gens. Mutationen des *Janus kinase 1*-Gens wurden als initialer molekularer Defekt bei der Entstehung von Krebserkrankungen und Autoimmunerkrankungen identifiziert. Vor diesem Hintergrund scheint dieses Gen also entscheidend für die Aufrechterhaltung der zellulären Integrität und der autologen Immuntoleranz zu sein.

Im wärmeautoantikörperhaltigen Plasmamilieu ist das *Janus kinase 1*-Gen signifikant schwächer exprimiert als im kälteautoantikörperhaltigen Plasmamilieu. Die pathogenetische Bedeutung einer gestörten oder verminderten Expression dieses Gens könnte sich so auch in der vorliegenden Studie bestätigt finden.

Auffällig ist darüber hinaus, dass die die Apoptoseregulierenden Gene im Vergleich zum wärmeautoantikörperhaltigen im kälteautoantikörperhaltigen-Plasmamilieu vermindert exprimiert werden. Von diesem Einfluss sind sowohl proapoptotische als auch Apoptoseprotektive Genprodukte kodierende Gene betroffen. Die Endothelzellen werden diesbezüglich stärker in ihrer Funktion beeinflusst als die Monozyten.

Zusammenfassend zeigen die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Daten, dass die Erythrozyten-Zell-Interaktion in Gegenwart von autoantikörperhaltigem Plasma im Vergleich zur Erythrozyten-Zell-Interaktion in Gegenwart von Normalplasma zu charakteristischen Veränderungen des Genexpressionsprofils der mit den Erythrozyten interagierenden Zellen führt. Der in dieser Arbeit etablierte experimentelle Ansatz erlaubt zudem prinzipiell die Identifizierung von Markergenen, die für Erythrozyten-Zell-Interaktion unter den verschiedenen Bedingungen charakteristisch ist. Ein wesentliches Ergebnis der Analyse der 20 Gene, die mit höchster Signifikanz durch Wärmeautoantikörper und durch Kälteautoantikörper reguliert werden, zeigt, dass unter dem Einfluss von Wärmeautoantikörpern die immunologische Balance in Richtung einer proinflammatorischen Immunantwort verschoben sein könnte. Diese Daten bedürfen der weiteren Verifizierung in weiteren Versuchen und können erheblichen Einfluss gewinnen auf das Verständnis der Pathophysiologie der Wärmeautoimmunhämolyse.

4.3 Zusammenfassung und Ausblick

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

- Plasma von Wärmeautoimmunhämolyse-Patienten vermittelt eine signifikant verminderte Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion im mikrovaskulären System im Vergleich zu Normalplasma ($p < 0.0001$), während Plasma von Kälteautoimmunhämolyse-Patienten eine ähnlich starke Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion vermittelt wie Normalplasma.
- Die Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion induziert spezifische Genexpressionsprofile in den Endothelzellen in Abhängigkeit von der eingesetzten Plasmapräparation.
- Das experimentelle Design der hier vorgelegten Studie erlaubt prinzipiell die Identifizierung verschiedener Marker-Gene für immunologisch und darüber hinaus auch hämorheologisch relevante Erythrozyten-Zell-Interaktionen.

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

- die Rolle anti-erythrozytärer Autoantikörper für immunologisch und darüber hinaus auch hämorheologisch relevante Erythrozyten-Zell-Interaktionen zu beschreiben und
- die Rolle mikrovaskulärer Endothelzellen bei der Entstehung anti-erythrozytärer Immunantworten zu untersuchen.

5 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| ADP | Adenosindiphosphat |
| APC | antigen presenting cell |
| <i>arc min</i> | Winkelminuten (Bogenmaß) |
| <i>arc sec</i> | Winkelsekunden (Bogenmaß) |
| aRNA | <i>amplified</i> ribonucleic acid |
| bp | Basenpaare |
| BS ³ | bis(sulfosuccinimidyl)suberate |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Celsius |
| Ca ²⁺ | Calcium |
| CAD | Cold Agglutinin Disease |
| CD | cluster of differentiation |
| cm | Zentimeter |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CRNA | <i>coding</i> ribonucleic acid |
| d. h. | das heißt |
| Dc's | dendritische Zellen |
| E | Exponent |
| EC | endothelial cell |
| ECGS | endothelial cell growth supplement |
| EDC | 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide |
| EDC-NHS | siehe „EDC“ und „NHS“ |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EK | Erythrozytenkonzentrat |
| et al. | et alteri |
| Fa. | Firma |
| FACS | Fluorescence activated cell sorting |
| FCS | Fetal Calf Serum |
| h | Stunde |
| HAoEC | Human Aortic Endothelial Cell |
| HBS | siehe HepesBSS |
| HCl | Salzsäure |
| HDMEC | Human Microvascular Endothelial Cell, aus Dermis isoliert |
| Hepes | N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulphonic acid] |
| HepesBSS | Hepes Buffered Saline Solution |
| HLA | Human Leukocyte Antigene |
| HIV | human immunodeficiency virus |
| HSaVEC | Human Saphenous Vein Endothelial Cell |
| HVEC | Human Venous Endothelial Cell |
| IASys® | interaction analysis systems |
| LDL | Low Density Lipoprotein |
| Mg | Magnesium |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mM | millimolar |
| MACS | Magnetic Cell Sorting |
| MAP | mean arterial pressure |
| MHC | Major Histocompatibility Complex |
| µg | Mikrogramm |

| | |
|-------------------|---|
| µl | Mikroliter |
| ng | Nanogramm |
| NADPH | Nicotinsäureamid-Adenosin-Dinucleotid-Phosphat |
| NHS | N-Hydroxysuccinimide |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| O ₂ | Dioxygen, molekularer Sauerstoff |
| o. g. | oben genannt |
| PBMC | Peripheral Blood Mononuclear Cell |
| PC | Personal Computer |
| PBL | periphere blood lymphocytes |
| PBS | phosphate buffered saline |
| PBS/T | PBS, welches Tween 20 TM mit einer Konzentration von 0,05% enthält |
| pH | Pondus Hydrogenii |
| RBC | red blood cell |
| Rh pos. | Rhesus positive |
| RNA | ribonucleic acid |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute (Kulturmedium) |
| SAG | saline Adenin-Glukose |
| sec | Sekunde |
| s.o. | siehe oben |
| s.u. | siehe unten |
| TM | Trade Mark |
| TNS | Trypsin Neutralising Solution |
| T ^{regs} | Regulatorische T-Zellen |
| U | Umdrehung |
| vs. | versus |
| WAIHA | Warm Antibody Autoimmune Hemolytic Anemia |
| WWU | Westfälische Wilhelms-Universität |
| z. B. | zum Beispiel |
| ZNS | Zentralnervensystem |
| zym. | zymosanaktiviert |

6 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Schematische Darstellung der quantitativen Zusammensetzung des Blutes (links), des Blutplasmas (Mitte) sowie der Plasmaproteine (rechts) modifiziert nach P. Deetjen und E.-J. Speckmann, Physiologie [26]
- Abbildung 2: Heterogenität der Endothelzellen modifiziert nach Choi et al. [16]
- Abbildung 3: Darstellung der physiologischen Bedeutung der Endothelzellen anhand ihres Interaktionsradius modifiziert nach Thilo et al. [129]
- Abbildung 4: Funktionsprinzip des IAsys®-Gerätes, übernommen von IAsys®, Thermo Labsystems, Cambridge, England
- Abbildung 5: Graphische Darstellung der Immobilisierung von humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) im IAsys®-Gerät, Thermo Labsystems, Cambridge, England
- Abbildung 6: Prinzip der Liganden-Immobilisierung an eine Carboxylatoberfläche, übernommen von IAsys®, Thermo Labsystems, Cambridge, England
- Abbildung 7: Prinzip der Darstellung eines Messzyklus modifiziert nach IAsys®, Thermo Labsystems, Cambridge, England
- Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Messzyklus modifiziert nach IAsys®, Thermo Labsystems, Cambridge, England
- Abbildung 9: Prinzip der Erstellung eines Genexpressionsprofils modifiziert nach Memorec Biotec GmbH, Köln, Deutschland
- Abbildung 10: Elektropherogramme (A und C) sowie Elutionsdiagramme (B und D) der RNAs
- Abbildung 11: Beispielhafte Abbildung der digital übereinandergelegten Cy5-/Cy3-Bilder (*Overlay*) nach dem Einlesen der Microarrays (Experiment 1: Monozyten + Erythrozyten + HBS) [38]

Abbildung 12: Beispielhafte Darstellung der Signalintensitäten der Spots im Experiment 1 (Monozyten + Erythrozyten + HBS)

Abbildung 13: Resonanzscan des IASys®-Gerätes

Abbildung 14: Reproduzierbarkeit der Messungen an mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC)

Abbildung 15: Messung 20°C vs. 37°C an mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC)

Abbildung 16: Beeinflussung der Interaktion von Erythrozyten und mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) durch Plasma mit Wärmeautoantikörpern (WAIHA), Plasma mit Wärmeautoantikörpern und Alloantikörpern (WAIHA+Allo-Ak) und Plasma mit Kälteautoantikörpern (CAD) im Vergleich zu Normalplasma gesunder Spender (Spender)

Abbildung 17: Beeinflussung der Interaktion von Erythrozyten und dendritischen Zellen durch Plasma mit Wärmeautoantikörpern, Plasma mit Wärmeautoantikörpern und Alloantikörpern und Plasma mit Kälteautoantikörpern im Vergleich zu Normalplasma gesunder Spender

Abbildung 18: Einfluss von Plasma gesunder Spender (Spender), Plasma mit Wärmeautoantikörpern (WAIHA), Plasma mit Wärmeautoantikörpern und Alloantikörpern (WAIHA+Allo-Ak) und Plasma mit Kälteautoantikörpern (CAD) auf die Interaktion von Erythrozyten mit mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) und dendritischen Zellen im Vergleich

Abbildung 19: In Abhängigkeit von der eingesetzten Plasmapräparation regulierte Genfunktionen an mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC)

Abbildung 20: Schnittmengen der unter Einfluss von Normalplasma, WAIHA-Plasma und CAD-Plasma regulierten Gene an mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC)

Abbildung 21: In Abhängigkeit von der eingesetzten Plasmapräparation regulierte Genfunktionen an Monozyten

Abbildung 22: Schnittmengen der unter Einfluss von Normalplasma, wärmeautoantikörperhaltigem Plasma (WAIHA-Plasma) und kälteautoantikörperhaltigem Plasma (CAD-Plasma) an Monozyten regulierten Gene

7 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Zusammensetzung des Endothelzell-Kulturmediums
- Tabelle 2: Aufbau der Versuchsansätze mit Endothelzellen im Rahmen des PIQOR™ Immunology Microarray
- Tabelle 3: Aufbau der Versuchsansätze mit Monozyten im Rahmen des PIQOR™ Immunology Microarray
- Tabelle 4: Ergebnisse der Genexpressionsprofile
- Tabelle 5: Funktionsbereiche des Gen-Chip
- Tabelle 6: Anzahl der herauf- und herunterregulierten Gene für das Genexpressionsprofil der mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) und der Monozyten im Kontext der Erythrozyten-Zell-Interaktion unter Einfluss der verschiedenen Plasmapräparationen
- Tabelle 7: In Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Plasmas regulierte Genfunktionen an mikrovaskulären Endothelzellen (HDMEC) während der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion in Zuordnung zu ihren Funktionsbereichen
- Tabelle 8: In Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Plasmas regulierte Genfunktionen in Monozyten während der Erythrozyten-Monozyten-Interaktion in Zuordnung zu ihren Funktionsbereichen
- Tabelle 9: Aufschlüsselung der Schnittmengen der unter Einfluss von Normalplasma, wärmeautoantikörperhaltigem Plasma (WAIHA-Plasma) und kälteautoantikörperhaltigem Plasma (CAD-Plasma) an Monozyten regulierten Gene
- Tabelle 10: Die 20 Gene, die mit höchster Signifikanz durch anti-erythrozytäre Wärmeautoantikörper und anti-erythrozytäre Kälteautoantikörper im

Vergleich während der Erythrozyten-Endothelzell-Interaktion unterschiedlich reguliert werden

Tabelle 11: Die 20 Gene, die mit höchster Signifikanz durch anti-erythrozytäre Wärmeautoantikörper und anti-erythrozytäre Kälteautoantikörper im Vergleich während der Erythrozyten-Monozyten-Interaktion unterschiedlich reguliert werden

Tabelle 12: Die 20 Gene, die im Vergleich von wärmeautoantikörperhaltigem Plasma vs. kälteautoantikörperhaltigem Plasma die signifikantesten Unterschiede bezüglich der Genregulation in Anwesenheit von Erythrozyten aufweisen, in Zuordnung zu ihren immunologischen Funktionsbereichen

Tabelle 13: Verteilung der regulierten Genfunktionen auf die immunologischen Funktionsbereiche und Vergleich des Einflusses von wärmeautoantikörperhaltigem Plasma und kälteautoantikörperhaltigem Plasma auf die Genexpression

8 Literaturverzeichnis

1. Agar, N.S., et al., *Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense?* J Clin Invest, 1986. **77**(1): p. 319-21.
2. Akbar, A.N., et al., *Immunological abnormalities in thalassaemia major. I. A transfusion-related increase in circulating cytoplasmic immunoglobulin-positive cells.* Clin Exp Immunol, 1985. **62**(2): p. 397-404.
3. Arosa, F.A., C.F. Pereira, and A.M. Fonseca, *Red blood cells as modulators of T cell growth and survival.* Curr Pharm Des, 2004. **10**(2): p. 191-201.
4. Austrup, F., et al., *P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues.* Nature, 1997. **385**(6611): p. 81-3.
5. Barker, R.N., et al., *Autoimmune haemolysis in the dog: relationship between anaemia and the levels of red blood cell bound immunoglobulins and complement measured by an enzyme-linked antiglobulin test.* Vet Immunol Immunopathol, 1992. **34**(1-2): p. 1-20.
6. Blum, A., et al., *Endothelial function in patients with sickle cell anemia during and after sickle cell crises.* J Thromb Thrombolysis, 2005. **19**(2): p. 83-6.
7. Boehlen, F. and K.J. Clemetson, *Platelet chemokines and their receptors: what is their relevance to platelet storage and transfusion practice?* Transfus Med, 2001. **11**(6): p. 403-17.
8. Bonomini, M., et al., *Enhanced adherence of human uremic erythrocytes to vascular endothelium: role of phosphatidylserine exposure.* Kidney Int, 2002. **62**(4): p. 1358-63.
9. Bourin, M.C. and U. Lindahl, *Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation.* Biochem J, 1993. **289** (Pt 2): p. 313-30.
10. Brand, A., *Immunological aspects of blood transfusions.* Transpl Immunol, 2002. **10**(2-3): p. 183-90.
11. Broze, G.J., Jr., *Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation.* Annu Rev Med, 1995. **46**: p. 103-12.
12. Burns, E.R., W.H. Wilkinson, and R.L. Nagel, *Adherence properties of sickle erythrocytes in dynamic flow systems.* J Lab Clin Med, 1985. **105**(6): p. 673-8.
13. Butcher, E.C. and L.J. Picker, *Lymphocyte homing and homeostasis.* Science, 1996. **272**(5258): p. 60-6.
14. Caccese, D., et al., *Superoxide anion and hydroxyl radical release by collagen-induced platelet aggregation--role of arachidonic acid metabolism.* Thromb Haemost, 2000. **83**(3): p. 485-90.
15. Cainelli, F., E. Concia, and S. Vento, *MHC class I molecules and progression to AIDS.* N Engl J Med, 2001. **345**(12): p. 924-5.
16. Choi, J., et al., *T lymphocyte-endothelial cell interactions.* Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 683-709.
17. Cines, D.B., *Antibodies reactive with surface membranes of cellular elements in the blood.* Hum Pathol, 1983. **14**(5): p. 429-41.
18. Cines, D.B., et al., *Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders.* Blood, 1998. **91**(10): p. 3527-61.
19. Claas, F.H., E.L. Lagaay, and J.J. van Rood, *Immunological consequences of blood transfusions.* Schweiz Med Wochenschr Suppl, 1991. **43**: p. 70-2.
20. Claas, F.H., et al., *Modulation of the alloimmune response by blood transfusions.* Transfus Clin Biol, 2001. **8**(3): p. 315-7.
21. Clawson, C.C. and J.G. White, *Platelet interaction with bacteria. I. Reaction phases and effects of inhibitors.* Am J Pathol, 1971. **65**(2): p. 367-80.
22. Clawson, C.C. and J.G. White, *Platelet interaction with bacteria. II. Fate of the bacteria.* Am J Pathol, 1971. **65**(2): p. 381-97.

23. Closse, C., J. Dachary-Prigent, and M.R. Boisseau, *Phosphatidylserine-related adhesion of human erythrocytes to vascular endothelium*. Br J Haematol, 1999. **107**(2): p. 300-2.
24. Cotran, R.S., et al., *Induction and detection of a human endothelial activation antigen in vivo*. J Exp Med, 1986. **164**(2): p. 661-6.
25. Dacie, J.V., *Autoimmune hemolytic anemia*. Arch Intern Med, 1975. **135**(10): p. 1293-300.
26. Deetjen P., S.E.-J., *Physiologie*. 1999: p. 257.
27. ElMasry, M.N., E.J. Fox, and R.R. Rich, *Sequential effects of prostaglandins and interferon-gamma on differentiation of CD8+ suppressor cells*. J Immunol, 1987. **139**(3): p. 688-94.
28. Embury, S.H., et al., *The contribution of endothelial cell P-selectin to the microvascular flow of mouse sickle erythrocytes in vivo*. Blood, 2004. **104**(10): p. 3378-85.
29. Esmon, C.T., *Thrombomodulin as a model of molecular mechanisms that modulate protease specificity and function at the vessel surface*. Faseb J, 1995. **9**(10): p. 946-55.
30. Fabijanska-Mitek, J., et al., *Quantitation of red cell-bound IgG by an enzyme-linked antiglobulin test in the patients with warm-type autoimmune haemolytic anaemia*. Clin Lab Haematol, 2006. **28**(4): p. 241-4.
31. Famodu, A.A., M.O. Adedeji, and H.L. Reid, *Serial plasma fibrinogen changes accompanying sickle cell pain crisis*. Clin Lab Haematol, 1990. **12**(1): p. 43-7.
32. Famodu, A.A. and H.L. Reid, *Plasma fibrinogen levels in sickle cell disease*. Trop Geogr Med, 1987. **39**(1): p. 36-8.
33. Fischer, A., et al., *Separation of a population of human T lymphocytes that bind prostaglandin E2 and exert a suppressor activity*. J Immunol, 1985. **134**(2): p. 815-9.
34. Fischer, E., et al., *Blood transfusion-induced suppression of cellular immunity in man*. Hum Immunol, 1980. **1**(3): p. 187-94.
35. Fonseca, A.M., et al., *Red blood cells promote survival and cell cycle progression of human peripheral blood T cells independently of CD58/LFA-3 and heme compounds*. Cell Immunol, 2003. **224**(1): p. 17-28.
36. Fonseca, A.M., et al., *Red blood cells upregulate cytoprotective proteins and the labile iron pool in dividing human T cells despite a reduction in oxidative stress*. Free Radic Biol Med, 2003. **35**(11): p. 1404-16.
37. Fonseca, A.M., et al., *Red blood cells inhibit activation-induced cell death and oxidative stress in human peripheral blood T lymphocytes*. Blood, 2001. **97**(10): p. 3152-60.
38. Gerstmayer, B. and A. Bosio, *Untersuchung des Einflusses von Erythrozyten und unterschiedlichen Blutplasmen auf die Genexpression von Monozyten und Endothelzellen mittels PIQOR™ Immunology Microarrays*. 2004, Memorec Biotec GmbH. p. 1-33.
39. Ghebrehiwet, B. and E.I. Peerschke, *Structure and function of gC1q-R: a multiligand binding cellular protein*. Immunobiology, 1998. **199**(2): p. 225-38.
40. Giacchino, F., et al., *Effects of blood transfusion on cellular immunity*. Proc Eur Dial Transplant Assoc, 1981. **18**: p. 465-8.
41. Gladwin, M.T., *Hemoglobin as a nitrite reductase regulating red cell-dependent hypoxic vasodilation*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **32**(5): p. 363-6.
42. Gladwin, M.T., et al., *Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm*. Nat Med, 2003. **9**(5): p. 496-500.
43. Gladwin, M.T., et al., *S-Nitrosohemoglobin is unstable in the reductive erythrocyte environment and lacks O2/NO-linked allosteric function*. J Biol Chem, 2002. **277**(31): p. 27818-28.

44. Halliday, G.M. and H.K. Muller, *Langerhans cell presentation of sheep red blood cells induces antibody production*. Immunol Cell Biol, 1987. **65 (Pt 1)**: p. 71-6.
45. Harrison, *Principles of Internal Medicine*. 2004.
46. Hart, D.N., *Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response*. Blood, 1997. **90(9)**: p. 3245-87.
47. Hebbel, R.P., *Extracorporeal factors in the pathogenesis of sickle cell disease*. Am J Pediatr Hematol Oncol, 1982. **4(3)**: p. 316-9.
48. Hebbel, R.P., et al., *Erythrocyte/endothelial interactions in the pathogenesis of sickle-cell disease: a "real logical" assessment*. Blood Cells, 1982. **8(1)**: p. 163-73.
49. Hebbel, R.P., C.F. Moldow, and M.H. Steinberg, *Modulation of erythrocyte-endothelial interactions and the vasocclusive severity of sickling disorders*. Blood, 1981. **58(5)**: p. 947-52.
50. Hebbel, R.P., et al., *Abnormal adherence of sickle erythrocytes to cultured vascular endothelium: possible mechanism for microvascular occlusion in sickle cell disease*. J Clin Invest, 1980. **65(1)**: p. 154-60.
51. Hebert, P.C., et al., *Do blood transfusions improve outcomes related to mechanical ventilation?* Chest, 2001. **119(6)**: p. 1850-7.
52. Hebert, P.C., et al., *Is a low transfusion threshold safe in critically ill patients with cardiovascular diseases?* Crit Care Med, 2001. **29(2)**: p. 227-34.
53. Heltianu, C., M. Simionescu, and N. Simionescu, *Histamine receptors of the microvascular endothelium revealed in situ with a histamine-ferritin conjugate: characteristic high-affinity binding sites in venules*. J Cell Biol, 1982. **93(2)**: p. 357-64.
54. Hobbs, A.J., et al., *Haemoglobin: NO transporter, NO inactivator or NO one of the above?* Trends Pharmacol Sci, 2002. **23(9)**: p. 406-11.
55. Hochmuth, R.M., et al., *Surface adhesion, deformation and detachment at low shear of red cells and white cells*. Trans Am Soc Artif Intern Organs, 1972. **18(0)**: p. 325-34.
56. Jain, R.K., *Molecular regulation of vessel maturation*. Nat Med, 2003. **9(6)**: p. 685-93.
57. Janeway, C.A. and P. Travers, *Immunology*. 1997.
58. Joshi, M.S., et al., *Nitric oxide is consumed, rather than conserved, by reaction with oxyhemoglobin under physiological conditions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99(16)**: p. 10341-6.
59. Junqueira, L.C. and J. Carneiro, *Histologie*. 1996.
60. Jurk, K. and B.E. Kehrel, *[Platelets and the new comprehension of haemostasis]*. Hamostaseologie, 2005. **25(1)**: p. 39-49.
61. Jurk, K. and B.E. Kehrel, *Platelets: physiology and biochemistry*. Semin Thromb Hemost, 2005. **31(4)**: p. 381-92.
62. Kalechman, Y., et al., *The effect of a single whole-blood transfusion on cytokine secretion*. J Clin Immunol, 1990. **10(2)**: p. 99-105.
63. Kalechman, Y., et al., *Enhancing effects of autologous erythrocytes on human or mouse cytokine secretion and IL-2R expression*. Cell Immunol, 1993. **148(1)**: p. 114-29.
64. Kaplan, J., et al., *Diminished helper/suppressor lymphocyte ratios and natural killer activity in recipients of repeated blood transfusions*. Blood, 1984. **64(1)**: p. 308-10.
65. Katamura, K., et al., *Prostaglandin E2 at priming of naive CD4+ T cells inhibits acquisition of ability to produce IFN-gamma and IL-2, but not IL-4 and IL-5*. J Immunol, 1995. **155(10)**: p. 4604-12.

66. Kay, M.M., *The IgG autoantibody binding determinant appearing on senescent membranes resides on a 62000 MW peptide*. Acta Biol Med Ger, 1981. **40**(4-5): p. 385-91.
67. Kay, M.M., *Isolation of the phagocytosis-inducing IgG-binding antigen on senescent somatic cells*. Nature, 1981. **289**(5797): p. 491-4.
68. Kay, M.M., *Mechanism of removal of senescent cells by human macrophages in situ*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3521-5.
69. Kehrel, B.E., [*Blood platelets: biochemistry and physiology*]. Hamostaseologie, 2003. **23**(4): p. 149-58.
70. Kreisel, D., et al., *Non-hematopoietic allograft cells directly activate CD8+ T cells and trigger acute rejection: an alternative mechanism of allorecognition*. Nat Med, 2002. **8**(3): p. 233-9.
71. Langeggen, H., et al., *HUVEC take up opsonized zymosan particles and secrete cytokines IL-6 and IL-8 in vitro*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2003. **36**(1-2): p. 55-61.
72. Lawrence, C. and M.E. Fabry, *Objective indices of sickle cell painful crisis: decrease in RDW and percent dense cells and increase in ESR and fibrinogen*. Prog Clin Biol Res, 1987. **240**: p. 329-36.
73. Leddy, J.P., et al., *Erythrocyte membrane proteins reactive with human (warm-reacting) anti-red cell autoantibodies*. J Clin Invest, 1993. **91**(4): p. 1672-80.
74. Lewis, J.C., J.E. Maldonado, and K.G. Mann, *Phagocytosis in human platelets: localization of acid phosphatase-positive phagosomes following latex uptake*. Blood, 1976. **47**(5): p. 833-40.
75. Löffler, G. and P. Petrides.
76. Mach, B., *MHC class II regulation--lessons from a disease*. N Engl J Med, 1995. **332**(2): p. 120-2.
77. Malcolm, D.S., et al., *Characterization of the hemodynamic response to intravenous dapsirin crosslinked hemoglobin solution in rats*. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol, 1994. **22**(1): p. 91-107.
78. Manodori, A.B., et al., *Enhanced adherence of sickle erythrocytes to thrombin-treated endothelial cells involves interendothelial cell gap formation*. Blood, 1998. **92**(9): p. 3445-54.
79. Marcus, A.J. and D.P. Hajjar, *Vascular transcellular signaling*. J Lipid Res, 1993. **34**(12): p. 2017-31.
80. Marcus, A.J., et al., *Thrombosis and inflammation as multicellular processes: significance of cell-cell interactions*. Thromb Haemost, 1995. **74**(1): p. 213-7.
81. Marcus, A.J., et al., *Principles of thromboregulation: control of platelet reactivity in vascular disease*. Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res, 1995. **23**: p. 413-8.
82. Marelli-Berg, F.M., et al., *Antigen recognition influences transendothelial migration of CD4+ T cells*. J Immunol, 1999. **162**(2): p. 696-703.
83. Martin, N.B., A. Jamieson, and D.P. Tuffin, *The effect of interleukin-4 on tumour necrosis factor-alpha induced expression of tissue factor and plasminogen activator inhibitor-1 in human umbilical vein endothelial cells*. Thromb Haemost, 1993. **70**(6): p. 1037-42.
84. Matsui, N.M., et al., *P-selectin mediates the adhesion of sickle erythrocytes to the endothelium*. Blood, 2001. **98**(6): p. 1955-62.
85. McEver, R.P., et al., *GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies*. J Clin Invest, 1989. **84**(1): p. 92-9.
86. Megson, I.L., et al., *Inhibition of human platelet aggregation by a novel S-nitrosothiol is abolished by haemoglobin and red blood cells in vitro*.

- implications for anti-thrombotic therapy.* Br J Pharmacol, 2000. **131**(7): p. 1391-8.
87. Melder, R.J., et al., *Selectin- and integrin-mediated T-lymphocyte rolling and arrest on TNF-alpha-activated endothelium: augmentation by erythrocytes.* Biophys J, 1995. **69**(5): p. 2131-8.
 88. Melder, R.J., et al., *Erythrocytes enhance lymphocyte rolling and arrest in vivo.* Microvasc Res, 2000. **59**(2): p. 316-22.
 89. Mohan, J.S., et al., *Plasma levels of tissue factor and soluble E-selectin in sickle cell disease: relationship to genotype and to inflammation.* Blood Coagul Fibrinolysis, 2005. **16**(3): p. 209-14.
 90. Mohandas, N. and E. Evans, *Adherence of sickle erythrocytes to vascular endothelial cells: requirement for both cell membrane changes and plasma factors.* Blood, 1984. **64**(1): p. 282-7.
 91. Morris, P.J., A. Ting, and J. Stocker, *Leukocyte antigens in renal transplantation. 1. The paradox of blood transfusions in renal transplantation.* Med J Aust, 1968. **2**(24): p. 1088-90.
 92. Munn, L.L., R.J. Melder, and R.K. Jain, *Role of erythrocytes in leukocyte-endothelial interactions: mathematical model and experimental validation.* Biophys J, 1996. **71**(1): p. 466-78.
 93. Murphy, M.M., et al., *Role of Rap1 in promoting sickle red blood cell adhesion to laminin via BCAM/LU.* Blood, 2005. **105**(8): p. 3322-9.
 94. Opelz, G., et al., *Effect of blood transfusions on subsequent kidney transplants.* Transplant Proc, 1973. **5**(1): p. 253-9.
 95. Pawloski, J.R., R.V. Swaminathan, and J.S. Stamler, *Cell-free and erythrocytic S-nitrosohemoglobin inhibits human platelet aggregation.* Circulation, 1998. **97**(3): p. 263-7.
 96. Peerschke, E.I. and B. Ghebrehiwet, *Platelet receptors for the complement component C1q: implications for hemostasis and thrombosis.* Immunobiology, 1998. **199**(2): p. 239-49.
 97. Pober, J.S. and R.S. Cotran, *The role of endothelial cells in inflammation.* Transplantation, 1990. **50**(4): p. 537-44.
 98. Pober, J.S., M.S. Kluger, and J.S. Schechner, *Human endothelial cell presentation of antigen and the homing of memory/effector T cells to skin.* Ann N Y Acad Sci, 2001. **941**: p. 12-25.
 99. Pries, A.R., T.W. Secomb, and P. Gaehtgens, *Biophysical aspects of blood flow in the microvasculature.* Cardiovasc Res, 1996. **32**(4): p. 654-67.
 100. Pries, A.R., T.W. Secomb, and P. Gaehtgens, *Relationship between structural and hemodynamic heterogeneity in microvascular networks.* Am J Physiol, 1996. **270**(2 Pt 2): p. H545-53.
 101. Pries, A.R., et al., *Microvascular blood flow resistance: role of endothelial surface layer.* Am J Physiol, 1997. **273**(5 Pt 2): p. H2272-9.
 102. Prince, H.E., *Requirement for both the CD3/T cell receptor complex and the CD2/lymphocyte function-associated antigen-3 adhesion system in monocyte-independent T cell activation by oxidized erythrocytes.* Immunol Invest, 1989. **18**(9-10): p. 1081-93.
 103. Przybelski, R.J., et al., *Phase I study of the safety and pharmacologic effects of d aspirin cross-linked hemoglobin solution.* Crit Care Med, 1996. **24**(12): p. 1993-2000.
 104. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada, *The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide.* Br J Pharmacol, 1987. **92**(3): p. 639-46.
 105. Reinhart, W.H., et al., *Influence of endothelial surface on flow velocity in vitro.* Am J Physiol, 1993. **265**(2 Pt 2): p. H523-9.

106. Rice, G.E., et al., *Vascular and nonvascular expression of INCAM-110. A target for mononuclear leukocyte adhesion in normal and inflamed human tissues*. Am J Pathol, 1991. **138**(2): p. 385-93.
107. Richards, R.S., et al., *Erythrocyte antioxidant systems protect cultured endothelial cells against oxidant damage*. Biochem Mol Biol Int, 1998. **46**(5): p. 857-65.
108. Robert, C., et al., *Interaction of dendritic cells with skin endothelium: A new perspective on immunosurveillance*. J Exp Med, 1999. **189**(4): p. 627-36.
109. Roelcke, D., *Cold agglutination*. Transfus Med Rev, 1989. **3**(2): p. 140-66.
110. Roelen, D., A. Brand, and F.H. Claas, *Pretransplant blood transfusions revisited: a role for CD(4+) regulatory T cells?* Transplantation, 2004. **77**(1 Suppl): p. S26-8.
111. Rothermel, A.L., et al., *Endothelial cells present antigens in vivo*. BMC Immunol, 2004. **5**(1): p. 5.
112. Royer, H.D. and E.L. Reinherz, *T lymphocytes: ontogeny, function, and relevance to clinical disorders*. N Engl J Med, 1987. **317**(18): p. 1136-42.
113. Sakhalkar, V.S., et al., *Elevated plasma sVCAM-1 levels in children with sickle cell disease: impact of chronic transfusion therapy*. Am J Hematol, 2004. **76**(1): p. 57-60.
114. Salama, A., H. Berghofer, and C. Mueller-Eckhardt, *Red blood cell transfusion in warm-type autoimmune haemolytic anaemia*. Lancet, 1992. **340**(8834-8835): p. 1515-7.
115. Santos, M.T., et al., *Enhancement of platelet reactivity and modulation of eicosanoid production by intact erythrocytes. A new approach to platelet activation and recruitment*. J Clin Invest, 1991. **87**(2): p. 571-80.
116. Savinov, A.Y., et al., *Presentation of antigen by endothelial cells and chemoattraction are required for homing of insulin-specific CD8+ T cells*. J Exp Med, 2003. **197**(5): p. 643-56.
117. Schakel, K., et al., *A novel dendritic cell population in human blood: one-step immunomagnetic isolation by a specific mAb (M-DC8) and in vitro priming of cytotoxic T lymphocytes*. Eur J Immunol, 1998. **28**(12): p. 4084-93.
118. Schechter, A.N. and M.T. Gladwin, *Hemoglobin and the paracrine and endocrine functions of nitric oxide*. N Engl J Med, 2003. **348**(15): p. 1483-5.
119. Schneeberger, E.E. and M. Hamelin, *Interaction of serum proteins with lung endothelial glycocalyx: its effect on endothelial permeability*. Am J Physiol, 1984. **247**(2 Pt 2): p. H206-17.
120. Schwender, H., *Identifying differentially expressed genes with siggenes*. 2006: p. 1-15.
121. Scott, M.D., et al., *Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase*. J Lab Clin Med, 1991. **118**(1): p. 7-16.
122. Sjobring, U., U. Ringdahl, and Z.M. Ruggeri, *Induction of platelet thrombi by bacteria and antibodies*. Blood, 2002. **100**(13): p. 4470-7.
123. Smith, B.D. and P.L. La Celle, *Erythrocyte-endothelial cell adherence in senescence and in hemolytic disorders*. Biomed Biochim Acta, 1987. **46**(2-3): p. S93-7.
124. Smith, B.D. and P.L. La Celle, *Erythrocyte-endothelial cell adherence in sickle cell disorders*. Blood, 1986. **68**(5): p. 1050-4.
125. Snijdewint, F.G., et al., *Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes*. J Immunol, 1993. **150**(12): p. 5321-9.
126. Speckmann, E., *Physiology*. 3 ed. Vol. 3. 1992, München: Urban & Fischer Verlag. 700.

127. Stahl, D., et al., *Red blood cell transfusions are associated with alterations in self-reactive antibody repertoires of plasma IgM and IgG, independent of the presence of a specific immune response toward RBC antigens.* Clin Immunol, 2002. **105**(1): p. 25-35.
128. Tang, Y.Q., M.R. Yeaman, and M.E. Selsted, *Antimicrobial peptides from human platelets.* Infect Immun, 2002. **70**(12): p. 6524-33.
129. Thilo, D.G., et al., *Isolation of human venous endothelial cells by different proteases.* Artery, 1980. **8**(3): p. 259-66.
130. Thursz, M.R., et al., *Association between an MHC class II allele and clearance of hepatitis B virus in the Gambia.* N Engl J Med, 1995. **332**(16): p. 1065-9.
131. Valles, J., et al., *Platelet-erythrocyte interactions enhance alpha(IIb)beta(3) integrin receptor activation and P-selectin expression during platelet recruitment: down-regulation by aspirin ex vivo.* Blood, 2002. **99**(11): p. 3978-84.
132. Vielma, S., et al., *Chlamydomphila pneumoniae infection of human aortic endothelial cells induces the expression of FC gamma receptor II (FcgammaRII).* Clin Immunol, 2002. **104**(3): p. 265-73.
133. Volkel, T., et al., *Targeting of immunoliposomes to endothelial cells using a single-chain Fv fragment directed against human endoglin (CD105).* Biochim Biophys Acta, 2004. **1663**(1-2): p. 158-66.
134. von Zabern, I., et al., *Release of mediators of systemic inflammatory response syndrome in the course of a severe delayed hemolytic transfusion reaction caused by anti-D.* Transfusion, 1998. **38**(5): p. 459-68.
135. Wagner, M.C., J.R. Eckman, and T.M. Wick, *Sickle cell adhesion depends on hemodynamics and endothelial activation.* J Lab Clin Med, 2004. **144**(5): p. 260-7; discussion 227-8.
136. Weyrich, A.S., S. Lindemann, and G.A. Zimmerman, *The evolving role of platelets in inflammation.* J Thromb Haemost, 2003. **1**(9): p. 1897-905.
137. Witte, S., *The influence of the fibrinolytic system on the affinity of fibrinogen for the endothelial-plasma interface.* Thromb Res, 1988. **52**(2): p. 111-7.
138. Wolf, M.W. and D. Roelcke, *Incomplete warm hemolysins. I. Case reports, serology, and immunoglobulin classes.* Clin Immunol Immunopathol, 1989. **51**(1): p. 55-67.
139. Wolf, M.W. and D. Roelcke, *Incomplete warm hemolysins. II. Corresponding antigens and pathogenetic mechanisms in autoimmune hemolytic anemias induced by incomplete warm hemolysins.* Clin Immunol Immunopathol, 1989. **51**(1): p. 68-76.
140. Wood, K., et al., *Differential expression of E- and P-selectin in the microvasculature of sickle cell transgenic mice.* Microcirculation, 2004. **11**(4): p. 377-85.
141. Wu, W.C., et al., *Blood transfusion in elderly patients with acute myocardial infarction.* N Engl J Med, 2001. **345**(17): p. 1230-6.
142. Yeaman, M.R., *The role of platelets in antimicrobial host defense.* Clin Infect Dis, 1997. **25**(5): p. 951-68; quiz 969-70.
143. Yeaman, M.R. and A.S. Bayer, *Staphylococcus aureus, Platelets, and the Heart.* Curr Infect Dis Rep, 2000. **2**(4): p. 281-298.
144. Youssefian, T., et al., *Host defense role of platelets: engulfment of HIV and Staphylococcus aureus occurs in a specific subcellular compartment and is enhanced by platelet activation.* Blood, 2002. **99**(11): p. 4021-9.
145. Zindrou, D., K.M. Taylor, and J.P. Bagger, *Preoperative haemoglobin concentration and mortality rate after coronary artery bypass surgery.* Lancet, 2002. **359**(9319): p. 1747-8.

146. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *Chemokines: a new classification system and their role in immunity*. *Immunity*, 2000. **12**(2): p. 121-7.

9 Lebenslauf

Name: Katharina Marie Mahncke

Geburtsdatum: 05.05.1980

Geburtsort: Minden

Eltern: Carl-Wilhelm Mahncke, Vizepräsident des Verwaltungsgerichts
Monika Mahncke geb. Hufendiek, Realschullehrerin

Schulen: 1986-1990 Domschule, Minden
1990-1999 Ratsgymnasium, Minden

Studium: Westfälische Wilhelms-Universität Münster
Fachbereich Humanmedizin
Ärztliche Vorprüfung: im März 2002
Erstes Staatsexamen: im März 2003
Zweites Staatsexamen: im März 2005
Drittes Staatsexamen: 2. November 2006

Münster, den 15.01.2007

10 Danksagung

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

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

Mein ganz besonderer und herzlicher Dank gilt Frau Prim. Prof. Dr. Dorothea Stahl, die mich über den gesamten Entwicklungszeitraum der Arbeit in jeder Phase mit unglaublichem Einsatz und größter Zuverlässigkeit unterstützt hat.

Bei allen Mitarbeitern des Institutes für Transfusionsmedizin, die mir während der Laborarbeiten stets sehr hilfsbereit und kooperativ begegnet sind, möchte ich mich sehr bedanken.

Ich danke Frau Dr. Nani Osada herzlich für ihre Unterstützung und die nette und interessante Zusammenarbeit.

Meinen Eltern danke ich herzlich, dass sie mich auf meinem Lebensweg stets unterstützt haben.