

**Einfluss des antierythrozytären Alloantikörpers K11 auf die Erythropoese**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn**

**Yousef Yasin  
aus Mönchengladbach**

**2009**

Angefertigt mit Genehmigung der  
medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. B. Poetzsch
2. Gutachter: Prof. Dr. I. Schmidt-Wolf

Tag der Mündlichen Prüfung: 20.04.2009

Aus dem Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin am  
Universitätsklinikum Bonn

Direktor: Prof. Dr. med. J. Oldenburg

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

*Für  
meine Eltern*



## Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis-----	7
1. Einleitung-----	8
-1.1. Das erythrozytäre System-----	8
-1.2. Die Blutgruppenmerkmale-----	10
-1.2.1. Die Hauptblutgruppenmerkmale oder das ABO-System-----	10
-1.2.2. Das Rhesus-System-----	11
-1.2.3. Das Kell-System-----	11
-1.2.3.1. Der Mc-Leod-Typ-----	12
-1.2.4. Expression von Blutgruppenantigenen während der Erythropoese-----	14
-1.2.5. Transfusionsmedizinische Relevanz von K11-----	15
2. Fragestellung-----	16
3. Material und Methoden-----	17
-3.1. Gewinnung von hämatopoetischen Stammzellen-----	17
-3.2. Quantifizierung der Stammzellen-----	17
-3.3. Bestimmung des Anteils CD34 <sup>+</sup> Zellen aus den Proben-----	17
-3.4. Vitalitätsbestimmung der Stammzellen-----	18
-3.5. Zellkultur nach dem semisolid Assay -----	18
-3.6. Testung der Sensitivität des Zellkulturmodells -----	19
-3.7. Testung des Effektes normaler Antikörper auf das Zellkulturmodell -----	20
-3.8. Testung des Effektes von humanem Normalserum und –Plasma auf die Zellkultur-----	20
-3.9. Testung des Einflusses des Alloantikörpers Anti-K11 auf die Erythropoese-----	20
-3.10. Aufreinigung des IgG´s mit der Protein-G-Säule-----	21
-3.11. Auswertung der Kulturen-----	21
-3.12. Etablierung Des HALO-Tests-----	22
4. Ergebnisse -----	24
-4.1. Etablierung eines Zellkulturmodells-----	24
-4.1.1. Präzision und Reproduzierbarkeit der hämatopoetischen Stammzellkultur-----	24

-4.1.2. Überprüfung der Sensitivität des Zellkulturmodells zum Nachweis einer Proliferationshemmung-----	25
-4.1.3. Ausschluss eines proliferationshemmenden Effektes von Normal-IgG auf die Erythropoese-----	27
-4.1.4. Matrixeffekt des Zellkulturmodells-----	29
-4.1.5. Ausarbeitung der Bestimmung der absoluten Zellzahl pro Well-----	31
-4.2. Versuche zur Beantwortung der Fragestellung-----	32
-4.2.1. Vergleich zwischen Normal-, Heparin- und Anti-K11-Plasma-----	33
-4.2.2. Einsatz aufgereinigter IgG-Lösungen zur Spezifikation des effektiven Agens-----	37
-4.3. Etablierung des HALO-Tests-----	40
-4.3.1. Prinzip des HALO-Tests-----	40
-4.3.2. Erstellung der ATP-Eichkurve-----	40
-4.3.3. Korrelation der ATP-Lumineszenzmessung mit der Zellzahl-----	41
5. Diskussion-----	43
-5.1. Beantwortung der Fragestellung -----	43
-5.1.1. Einfluss von Anti-K11 auf die Erythropoese -----	44
-5.1.2. Einsatz des aufgereinigten IgGs -----	45
-5.2. Der HALO-Test-----	46
-5.3. Fehlerquellen-----	47
-5.3.1. Die Aufbereitung der Stammzellen-----	47
-5.3.2. Die Verwendung von Antikörpergemischen-----	47
-5.4. Schlussfolgerungen-----	48
6. Ausblick-----	50
7. Zusammenfassung-----	51
8. Literaturverzeichnis-----	52
9. Danksagung-----	57
10. Lebenslauf-----	58

**Abkürzungsverzeichnis**

AIHA	=	Autoimmunhämolytische Anämie
BFU-E	=	Burst Forming Unit – Erythroid
CD	=	Cluster of Differentiation
CFU	=	Colony Forming Unit
CFU-GM	=	Colony Forming Unit- Granulomyelocytic
CFU-GEMM	=	Colony Forming Unit – Granulocytic, Erythroid, Myelomonocytic
CGD	=	Chronische septische Granulomatose
EPO	=	Erythropoetin
Fab	=	Alternierendes Ig-Fragment
Fc	=	Konstantes Ig-Fragment
GM-CSF	=	Granulomyelocytic Colony Stimulating Factor
Gp	=	Glycophorin
Ig	=	Immunglobulin
IMDM	=	Iscove's Modifiziertes Dulbecco Medium
IL	=	Interleukin
ITP	=	Immun-Thrombozytopenische Purpura
K	=	Kell
KDa	=	Kilodalton
MHN	=	Morbus hämolyticus neonatorum
MTX	=	Methotrexat
NaCl	=	Natriumchlorid
NP	=	Normalplasma
PCR	=	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
R	=	Reihe
RPMI	=	Roswell Park Memorial Institute
SA	=	Standardabweichung
SCF	=	Stem-Cell-Factor
μM	=	Mikromolar

## 1. Einleitung

### 1.1. Das Erythrozytäre System

Erythrozyten sind hochspezialisierte kernlose Zellen, die als Sauerstoff- und Kohlendioxidträger eine wesentliche Rolle im Metabolismus spielen. Sie sind bikonkav disciform und ihr größter Durchmesser beträgt 7,5  $\mu\text{m}$ . (39). Die Erythropoese erfolgt beim Erwachsenen im roten oder blutbildenden Knochenmark, welches sich überwiegend in den platten Knochen und den Köpfen der Röhrenknochen befindet. (18, 4). Außerdem findet die Hämatopoese auch in den Wirbelkörpern statt. (18, 42). Im Kindesalter ist auch das Mark der Diaphysen der langen Röhrenknochen hämatopoetisch aktiv. (16, 42). In der Embryonal- und Fetalphase findet die Blutbildung auch in der Leber und Milz statt. (42, 16, 18). Diese frühen hämatopoetischen Phasen können im Bedarfsfall auch im Erwachsenenalter auftreten und sind dann meist im Zusammenhang mit einer generellen Hyperplasie der Vorläuferzellen des vom Mangel betroffenen Teils des peripheren Blutbildes zu sehen. (16). Die Hämatopoese verläuft im Knochenmark über Vorläuferzellen, die letztlich aus einer einzigen, pluripotenten Zellpopulation, den hämatopoetischen Stammzellen, hervorgehen. (16). Diese Stammzellen sind durch die Expression eines bestimmten Membranproteins, des CD34, charakterisiert und haben morphologisch Ähnlichkeit mit Lymphozyten. Bei dem CD34-Molekül handelt es sich um ein stark glykosyliertes, d. h. mit Kohlenhydratresten versehenes Oberflächenantigen mit einem Molekulargewicht von 115 kDa. (41, 3). Es scheint bei der Regulation der Teilungskinetik hämatopoetischer Stammzellen eine herausragende Rolle zu spielen. (8). Erwähnenswert ist auch, dass nur 1-2 % der CD34<sup>+</sup> adulten Stammzellpopulation wirklich pluripotent sind, also uneingeschränkt in jede hämatopoetische Zelllinie differenzieren können. Der weitaus größte Anteil ist bereits in der Differenzierung weiter fortgeschritten und kann nur in eine, z. B. die erythropoetische Richtung, reifen. Der Unterschied ist, dass die pluripotenten CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen eine niedrige oder fehlende Expression des HLA-DR- und des CD38-Antigens und eine starke Expression des Thy-1-Antigens zeigen, das Antigen-Profil der weiterentwickelten hämatopoetischen Vorläuferzellen jedoch durch eine starke Expression von CD38, HLA-DR und durch linienspezifische Marker charakterisiert ist. So findet sich CD33 beispielsweise auf CD34<sup>+</sup> Zellen, die in Granulozyten oder Monozyten ausreifen können, während CD71 für erythropoetische Vorläuferzellen typisch ist. (5). Durch die kombinierte Einwirkung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen



wird die Differenzierung gesteuert. So wird die Erythropoese durch ein komplexes Zusammenspiel des Hormons Erythropoitin (EPO) aus der Niere mit verschiedenen Mediatoren und Interleukinen, z. B. IL3, SCF und anderen getriggert. (31, 51). Im Gegensatz zu früheren Annahmen kann jedoch durch Umstellung der auf die hämatopoetischen Stammzellen einwirkenden IL- und Mediatorkombination die schon eingesetzte Differenzierung zur erythropoetischen Zelllinie zur myeloischen Differenzierung umschlagen und umgekehrt. (9, 10). Die Sekretion von EPO ist der stärkste Stimulus für die Erythropoese und essentiell für das Wachstum und die Ausreifung der BFU-E. (31, 51). Der adäquate Reiz für diese Sekretion ist ein Abfall der Sauerstoffsättigung im arteriellen Blut, der durch spezifische Rezeptoren in den zuführenden Arteriolen des juxtaglomerulären Apparates gemessen wird. Diese Rezeptoren erkennen das Häm-Protein, welches bei Hypoxie vermehrt anfällt. (3, 51). Wenn die Wirkung des EPO gegriffen und die arterielle Sauerstoffsättigung im Blut sich normalisiert hat, wird die Sekretion von EPO gehemmt. (2, 3, 51).

Die Progenitoren der Erythrozyten besitzen ab einem bestimmten Differenzierungsgrad, dem Stadium der polychromatischen Erythroblasten, auch Makroblasten genannt, den charakteristischen Blutfarbstoff Hämoglobin, an Hand dessen sie schon durch einfache Mikroskopie durch das inverse Lichtmikroskop identifizierbar sind. (42).

Die Funktion der Erythrozyten ist hauptsächlich der Sauerstofftransport im Blut in Form von Oxyhämoglobin. (16). Hierbei fällt auf, dass die Sauerstoffsättigungskurve des Hämoglobins sigmoid verläuft, was auf diverse allosterische Effekte (Veränderung der Raumstruktur des vierkettigen Hämoglobins bei Bindung von Sauerstoff an eine oder mehr Ketten) zurückzuführen ist. (4, 22). Auch unterscheidet sich das Bindungsverhalten des Hämoglobins in den Erythrozyten von dem des freien Hämoglobins. (21, 22). Die Erythrozyten werden nach Ablauf ihrer Lebensdauer, die im Mittel ca. 120 Tage beträgt, abgebaut. Täglich werden über 200 Milliarden Erythrozyten gebildet und eben diese Anzahl abgebaut. (4, 18, 42, 25). Der Abbau erfolgt in der Milz, die alte Erythrozyten in einem siebartigen Geflecht aus Retikulinfasern regelrecht auffängt und herausfiltert. Alte oder funktionsunfähige Erythrozyten werden dabei im Rahmen der Erythrozytenmauserung (Pooling) abgebaut. Bei Splenomegalie werden schließlich auch vermehrt normale Erythrozyten abgebaut. (45). Das Eisen aus dem Hämoglobinmolekül wird dabei isoliert und im Körper gespeichert, zumeist gebunden am Eisenspeicherprotein Ferritin. (42, 4, 18, 16).

## **1.2. Die Blutgruppenmerkmale**

Die Blutgruppen sind genetisch festgelegte, vererbare Merkmale von Blutbestandteilen, die als antigene Determinanten wirken und sich auf Grund eines genetischen Polymorphismus in verschiedenen Individuen, Familien oder menschlichen Rassen unterscheiden. Sie lassen sich mit Hilfe spezifischer Antikörper nachweisen und systematisieren. Die Antigene können als Membranstrukturen von Blutzellen, als intrazelluläre Bestandteile oder in Form polymorpher Serumproteine vorliegen. Sie werden in verschiedene Systeme unterteilt. (4).

### **1.2.1. Die Hauptblutgruppenmerkmale oder das ABO-System**

Die Hauptblutgruppenmerkmale wurden 1901/1902 von Landsteiner et al. entdeckt. Sie liefern die Erklärung für die damals bei der Bluttransfusion unkalkulierbare und scheinbar willkürlich auftretende Gefahr der intravasalen Hämolyse mit Todesfolge. Dieses System umfasst hauptsächlich die Antigene A1, A2 und B, die im Rahmen der Multiplen Allelie alle von einem Genlocus codiert werden. Dieser Genlocus codiert genau genommen für eine Glycosyltransferase, die das Blutgruppenvorläuferantigen H1(s. u.) entweder zu A oder zu B glycosyliert. (30, 4). Für das A-Antigen existieren noch weitere Untertypen. Die Beschränkung auf A1 und A2 dient der Vereinfachung. Das häufigste ABO-Blutgruppenmerkmal in Deutschland ist A mit ca. 43%, B ist mit 13% deutlich seltener. A und B verhalten sich kodominant. (47). A1 dominiert über A2. Das H1-Antigen ist als Vorläufer der anderen ABO-Antigene aufzufassen. Es wird durch verschiedene Glycosylierungsschritte in das A- oder B-Antigen überführt. (4, 18, 48, 30). Wird auf den Erythrozyten keines der genannten Antigene oder nur das H1-Antigen exprimiert, spricht man von der Blutgruppe 0. Dies beruht auf der fehlenden oder unvollständigen Expression der Glycosyltransferase. (30, 31, 32, 4). Die Blutgruppe 0 ist mit 39% in Deutschland am zweithäufigsten.

Gegen die AB-Blutgruppenmerkmale existieren im Serum des Menschen physiologischerweise präformierte Antikörper der Klasse IgM (sogenannte Isoagglutinine), und zwar blutgruppenkonträr, d.h. das Serum der Blutgruppe A enthält Anti-B-Isoagglutinine und umgekehrt. Das Serum der Blutgruppe AB enthält keine und das der Blutgruppe 0 beide Isoagglutininformen. (42). Der Bildungsmechanismus der Isoagglutinine ist bis heute nicht hinreichend geklärt. Diskutiert werden bestimmte Darmbakterien, die durch einen

immunologischen Stimulus die Generierung dieser speziellen Antikörper induzieren sollen. Hieraus ergibt sich die Tatsache, dass Blut nicht wahllos transfundiert werden kann, wie vor Landsteiner nur in Einzelfällen und meist mit fatalem Ausgang praktiziert, sondern am besten blutgruppenübereinstimmend oder zumindest –kompatibel transfundiert werden sollte (29, 18). Menschen mit der Blutgruppe AB gelten als Universalempfänger für Erythrozytenkonzentrate. Die Blutgruppe 0 hingegen als Universalspender. Bei der Plasmaspende ist der Sachverhalt umgekehrt. (42, 16, 17, 18, 29). Die Isoagglutinine sind Pentamere, bestehen also jeweils aus 5 IgG-gähnlichen Molekülen. (1).

### **1.2.2. Das Rhesus-System**

Das Rhesusblutgruppensystem wurde 1939 von Levine und Stetson, bzw. 1940 von Landsteiner und Wiener an Rhesusaffen entdeckt. Es handelt sich um eine Gruppe von Antigenen in der Erythrozytenmembran, die von zwei Genloci codiert werden, CE und D. (10, 11). Hier ist das häufigste Antigen das D-Antigen ist. Daneben gibt es noch das E-Antigen und das C-Antigen. Transfusionsmedizinisch am bedeutsamsten ist jedoch das Antigen D, welches insbesondere bei Rh-negativen Frauen bei einer Schwangerschaft mit Rh-positiven Kindern eine Rolle spielt und auch heute noch schwere Fälle eines Morbus hämolyticus neonatorum (MHN) auslösen kann. (37). Außerdem existieren noch viele weitere Blutgruppenmerkmale, worunter einige als transfusionsmedizinisch wichtig einzustufen sind. Hier sind u. a. das Duffy-, das Lutheran- und das Kell-System zu nennen.

### **1.2.3. Das Kell-System**

Dieses umfasst eine Reihe von Antigenen, die als Kell-Untertypen mit Nummern klassifiziert werden. Derzeit sind 23 oder mehr verschiedene Untertypen bekannt. (28). Sie werden an anderen Genloci codiert, als die erstgenannten, nämlich auf Chromosom 7q33-35. (28, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 42). Es handelt sich bei dem Prototyp XK um ein 50,9 kDa-Glycoproteins mit Ektopeptidasen-Charakter, welches für die Spaltung einer inaktiven Vorstufe von Endothelin verantwortlich ist und 10 Transmembran-Domänen aufweist. (28).

Die molekulare Struktur von Kell-Antigenen besteht im Wesentlichen aus 2 globulären Domänen, die ihrerseits vorwiegend aus Alpha-Helices bestehen. (28).

Die Entdeckung der Kell-Antigene geht auf das Jahr 1946 zurück. Sir Robin R. Coombs fand im Serum einer Mrs. Kell (daher der Name) einen bis dahin unbekanntem Antikörper und vermutete einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Auftreten dieses Antikörpers und den rezidivierenden Aborten dieser Patientin. 3 Jahre später fanden Levine et al. wiederum im Serum einer Patientin, welche ein Kind mit leichtem Morbus hämolyticus neonatorum geboren hatte, den für das Allel der Eigenschaft Kell postulierten Antikörper. Entsprechend dem Namen der Mutter nannte man den Antikörper anti-Cellano und das Antigen Cellano-Antigen. Später setzte sich für das Kell-Antigen jedoch der Buchstabe K, für das Cellano-Antigen der Buchstabe k durch. Später gelang die Typisierung verschiedener Kell-Antigene, in neuerer Zeit auch per PCR. (35, 36). Zu den bekanntesten zählen u.a. das K0-, das K1- und das K2-Antigen. Letzteres stellt eine aktive Metalloprotease dar, im Gegensatz zu K1, welches inaktiv ist. (12).

Die Immunogenität von K ist relativ hoch. (4, 47, 33). kk-Patienten entwickeln mit 10%iger Wahrscheinlichkeit ein anti-K, wenn sie ein Erythrozytenkonzentrat mit der Eigenschaft K erhalten. Damit ist K nach dem Antigen D das zweit-immunogenste Antigen überhaupt. Die Immunogenität von k ist wesentlich geringer als von K (ca. 1,5%). In Mitteleuropa sind 92% der Bevölkerung homozygot Kell-negativ (kk), ca. 7,2% sind mischerbig (Kk) und nur 0,2% homozygot Kell-positiv (KK). (47).

### 1.2.3.1. Der Mc-Leod-Typ

Der Mc-Leod-Typ ist durch stark abgeschwächte Kell-Antigene gekennzeichnet. Man findet meist folgenden Phänotypus im Kell-System:

Tab.1: Phänotypen des Mc-Leod-Typs. (47)

K negativ	k abgeschwächt
Kp <sup>a</sup> negativ	Kp <sup>b</sup> abgeschwächt
Js <sup>a</sup> negativ	Js <sup>b</sup> abgeschwächt

Dies liegt daran, dass bei Patienten mit McLeod-Typ die Präcursor-Substanz Kx, die die Vorläufersubstanz aller 23 Kell-Antigene darstellt, aufgrund eines genetischen Defektes nicht oder in veränderter Struktur gebildet wird. (38). Da diese Vorläufersubstanz jedoch offensichtlich für die Stabilität der Erythrozytenmembran eine wichtige Rolle spielt, weisen Patienten mit McLeod-Typ meist eine milde chronische hämolytische Anämie auf. Doch auch asymptomatische Mc-Leod-Typen kommen vor. (17, 18, 20).

„Das Krankheitsbild des McLeod-Typs ist häufig mit dem Krankheitsbild der chronischen septischen Granulomatose (CGD) kombiniert. Die chronische septische Granulomatose ist durch das genetisch bedingte Fehlen eines Superoxid-produzierenden Cytochroms gekennzeichnet, so dass die betroffenen Patienten aufgrund einer reduzierten antibakteriellen Aktivität der neutrophilen Granulozyten schwere, lebensbedrohliche Infektionen erleiden.“(47).

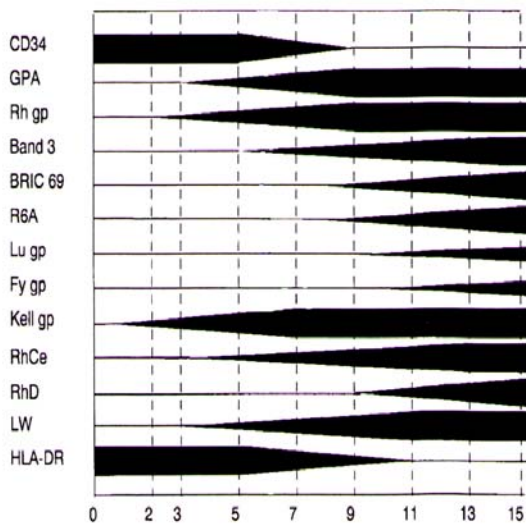
Wenn eine Sensibilisierung des Immunsystems gegen Antigene des Kell-Systems eingetreten ist, können Anti-Kell-Antikörper einen schweren hämolytischen Transfusionszwischenfall auslösen. Häufiger beobachtet man den Effekt einer Sensibilisierung gegen Kell-Antigene bei neugeborenen seropositiver Mütter in Form eines Morbus hämolyticus neonatorum. (50). Dieses Krankheitsbild ist auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen Blutgruppenantigene des Kindes im Serum der für diese Antigene negativen Mütter zurückzuführen. Diese Problematik ist auch am Beispiel Rhesus-positiver Neugeborener, deren Mütter Rhesus-negativ sind, hinreichend bekannt. Das verursachende Agens sind hier Antikörper gegen das Rh D- Antigen. Die Symptomatik ist durch die massive Hämolyse gekennzeichnet und äußert sich in erhöhten Serumbilirubinspiegeln, Anämie und erniedrigter Sauerstoffsättigung im arteriellen Blut. Fälle eines Anti-Kell-verursachten MHN lassen sich durch Bluttransfusion therapieren. (52). Aber auch rekombinantes EPO wurde bereits erfolgreich eingesetzt. (14). Dies lässt darauf schließen, dass Anti-Kell-Antikörper, neben ihrer Fähigkeit zur Auslösung einer Hämolyse, auch in der Lage sind, die Hämatopoese zu inhibieren. Dieser Hemmeffekt wurde auch 2004 von Wagner et al. anhand des Anti-K1-Antikörpers bestätigt. (50). Die Arbeit untersuchte den Fall einer fatalen Anämie eines Neugeborenen in Folge Suppression der Hämatopoese. In einigen Fällen findet ein Autoimmunprozess statt, der zur Bildung von Autoantikörpern gegen eigene Blutgruppenmerkmale führt (16, 14, 15), wobei die

Hauptblutgruppen hier i. d. R. ausgespart bleiben. Oft sind solche Autoantikörper gegen Merkmale des Kell-Systems gerichtet. (13, 8, 9). Schließlich sei noch erwähnt, dass Kell-Antigene auch auf Progenitoren der myeloischen Reihe exprimiert werden (49), so dass Antikörper gegen Kell-Antigene möglicherweise nicht nur die Erythropoese beeinflussen.

#### **1.2.4. Expression von Blutgruppenantigenen während der Erythropoese**

Nicht nur die reifen Erythrozyten, sondern auch deren Vorläuferzellen in Form von Burst forming Units (BFU-E) und Colony forming Units (CFU-E) exprimieren spezifische Blutgruppenmerkmale und andere Antigene. Während der Differenzierung verändert sich die Antigenstruktur auf der Oberfläche dieser Zellen (7). So exprimieren reife Erythrozyten beispielsweise das Glycophorin A (GpA). Merkmale der Kell-Gruppe dagegen werden schon nach einer Kulturdauer von einer Woche von CD34<sup>+</sup> Stammzellen in vitro auf Methylzellosemium im semisolid Assay exprimiert. Rhesus-Antigene wiederum werden später exprimiert. (44). Diese Arbeitsgruppen und andere erstellten zudem eine Zeittafel, die eine genaue Beschreibung des Reifungs- und Differenzierungsprozesses während der Erythropoese auf Membranantigenstrukturebene liefert. (24). Abb. 1 zeigt die von Southcott et al. erstellte Zeittafel. Diese zeitliche Abfolge wäre eine Erklärung dafür, dass einige antierythrozytäre Antikörper (wie z. B. Anti-Kell-Antikörper) die Hämatopoese hemmen können, und andere (wie etwa Anti-D) hierzu nicht im Stande sind.

## Antigen



Tage nach Kulturanlage

Abb. 1: Zeitlicher Ablauf der Expression verschiedener Blutgruppenantigene auf erythroiden Progenitoren während der Hämatopoese. Während CD 34 und HLA-DR ab Tag 5 zu verschwinden beginnt, nimmt die Expression von z. B. GPA allmählich zu und kommt zu seiner größten Ausprägung ab Tag 9. Zu diesem Zeitpunkt beginnt die Expression von RhD. Merkmale der Kell-Familie sind etwa ab Tag 2 nachweisbar. (44).

### 1.2.5. Transfusionsmedizinische Relevanz von K11

Ein Beispiel aus der oben erwähnten Vielfalt an Kell-Antigenen ist das K11-Antigen. Es ist ein weit verbreitetes Antigen mit einer Prävalenz von 99,9% in der kaukasischen Population. (23). Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass das Vorkommen von Anti-K11 im Serum eines Menschen eine Rarität sein müsste. Die transfusionsmedizinische Relevanz dieses Antikörpers konnte bisher nicht sicher belegt werden. In der soeben zitierten Arbeit von Kelley et al. ist jedenfalls eindeutig keine klinische Relevanz in Erscheinung getreten. Im Gegensatz zu der Aussage dieser Arbeit ist im Institut für experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Bonn ein MHN auf Grund einer K11-Inkompatibilität klinisch relevant in Erscheinung getreten. Klinisch fiel das neugeborene durch einen deutlichen Ikterus auf. In der Laboruntersuchung zeigte sich eine entsprechende Erhöhung des nicht konjugierten Bilirubins und eine massive Anämie, so dass eine Erythrozytentransfusion erfolgen musste. Im Serum der Mutter fanden sich Antikörper gegen das auf den Erythrozyten des Kindes exprimierte K11-Antigen. Es konnte mittels Coombs-

Test zweifelsfrei festgestellt werden, dass die Hämolyse auf die Bindung dieser Antikörper an das K11-Antigen beruht, welches auf der Oberfläche der kindlichen Erythrozyten exprimiert wurde. Die Erythrozyten der Mutter exprimierten K11 nicht. In der Literatur fanden sich keine weiteren Arbeiten zur transfusionsmedizinischen Relevanz von K11 bzw. Anti-K11. Ebenso wenig ist bekannt, ob Anti-K11 in der Lage ist, die Hämatopoese zu beeinflussen, obgleich auch erythropoetische Progenitoren, angesichts des ubiquitären Vorkommens des K11-Antigens dieses tragen müssten. (49, 44). Für Anti-K1-Antikörper konnte bereits eindeutig nachgewiesen werden, dass sie neben ihrer Fähigkeit zur Induktion einer Hämolyse von Erythrozyten, die das entsprechende Antigen tragen, auch die Hämatopoese hemmen können. (50). Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass bei autoimmunhämolytischer Anämie (AIHA) die bei chronischen Anämien sonst übliche reaktive Hyperplasie der erythroblastischen Fraktion im blutbildenden Knochenmark fehlt. Für Anti-K11-Antikörper fehlt bisher eine systematische Untersuchung, und die Literatur stimmt nicht eindeutig mit der klinischen Beobachtung überein.

## **2. Fragestellung**

Die Fragestellung dieser Arbeit ist, ob Anti-K11-Alloantikörper auch in der Lage sind, die Erythropoese zu beeinflussen, und, wenn ja, ob sie diese hemmen oder stimulieren. Letzteres scheint wenig wahrscheinlich, da die Antikörper regelhaft zur Zerstörung der angegriffenen Zellen führen. Es muss aber auf Grund der Komplexität der Hämatopoese zunächst auch diese Möglichkeit in Betracht gezogen werden.



### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Gewinnung von hämatopoetischen Stammzellen**

Die Gewinnung der Knochenmarksstammzellen erfolgte durch Entnahme von peripherenvenösem Blut aus Patienten oder Spendern, die zuvor mit GM-CSF behandelt wurden, um die Ausschwemmung von Stammzellen aus dem blutbildenden Knochenmark ins periphere Blut zu stimulieren. Die gewonnenen Proben wurden in 2ml-Röhrchen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff konserviert. Bei Bedarf wurde dann aus dem Pool die jeweils benötigte Probenzahl entnommen und in Methylzellulosemedium kultiviert. Hierbei wurde das native Probenmaterial direkt kultiviert, ohne die hämatopoetischen Stammzellen selektiv zu isolieren, da davon ausgegangen wurde, dass nur die Stammzellen in der Lage sind, die CFU's und BFU-E's zu bilden, an Hand derer das Wachstum quantifiziert werden wird. Auch die Minimierung der Kontaminationsgefahr war hierbei eine Erwägung.

#### **3.2. Quantifizierung der Stammzellen**

Um das zu erwartende Wachstum abschätzen zu können und um die benötigte Menge an Probenmaterial zu ermitteln, wurde eine Zellzählung der Probe durchgeführt. Hierzu wurde zunächst eine 1:10-Verdünnung der Probe angefertigt, indem zu 50 µl der nativen Probe in einem 2ml-Eppendorf-Tube 450 µl 0,9%-ige NaCl-Lösung hinzugegeben wurde. Diese Verdünnung wurde sodann vorsichtig, durch Schwenken des Eppendorf-Gefäßes gemischt. Die Zellkonzentration der so bearbeiteten Zellsuspension wurde dann mittels eines handelsüblichen Blutbildzählgerätes bestimmt. Aus dieser Zellkonzentration wurde dann die Zellkonzentration in der Originalprobe durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor 10 errechnet. Danach wurde mit der Immunfluoreszenz-Durchflusszytometrie der Anteil CD34<sup>+</sup> Zellen bestimmt (s.u.). Dies erlaubte zusammen mit der Vitalität des Probenmaterials Rückschlüsse auf die Qualität der Probe und das proliferative Potential.

#### **3.3. Bestimmung des Anteils CD34<sup>+</sup> Zellen aus den Proben**

Von jedem Patienten oder Spender wurde pro Blutentnahme mindestens ein Mal eine Bestimmung des CD34<sup>+</sup> Anteils der Leukozyten durchgeführt. Hierzu wurde die

Immunfluoreszenz-Durchflusszytometrie verwendet. Das Vorhandensein entsprechender Standard-Kits mit eigens entwickelter Software erleichterte die Durchführung. Es wurde zu jeder Probe eine Negativkontrolle angesetzt. Im Probengefäß wurden die Antigene CD45 und CD34 mit unterschiedlich fluoreszierenden Antikörpern markiert, in der Negativkontrolle nur die CD45-Antigene. Die Software errechnete dann den Anteil CD34<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD45<sup>+</sup> Zellpopulation. Die Berechnung war auch manuell an Hand der Zahlen der CD45<sup>+</sup> und 34<sup>+</sup> Zellen möglich. Hierfür konnten die Ergebnisse der Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer (nur Stammzellen) und der Leukozytenzählung im Blutbildzählgerät (alle Leukozyten) verwendet werden.

### **3.4. Vitalitätsbestimmung der Stammzellen**

Hierfür wurden die Zellen zunächst mit einem Überschuss an 0,1%-iger Methylenblau-Lösung gefärbt. Es wurde eine 1:100-Verdünnung hergestellt, indem in einem 2ml-Eppendorf-Gefäß zu 10 µl der Originalprobensuspension 990 µl Methylenblau hinzugegeben wurden. Nach gutem aber vorsichtigem Durchmischen wurden dann 10 µl aus der mit Methylenblau verdünnten Suspension entnommen und in die eine entsprechend vorbereitete Neubauer-Zählkammer gegeben. Hierbei wurde das Deckplättchen der Zählkammer zuvor auf deren Objektträger gelegt, und die Methylenblau gefärbte Suspension mit der Spitze der zur Entnahme verwendeten 10 µl-Pipette langsam eingespritzt.

Die Zellen wurden dann unter dem inversen Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung betrachtet. Gezählt wurden nur die Zellen, die etwas größer als Lymphozyten waren und ihnen morphologisch glichen. Dies sind nämlich die CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen. Diejenigen Zellen, die auch nur kleinste sichtbare Mengen an Methylenblau aufgenommen hatten, wurden als avital angesehen. Nur die Zellen, die kein Methylenblau inkorporiert hatten, wurden als vital betrachtet. Der Quotient aus der Anzahl vitaler Stammzellen und Gesamtanzahl der Stammzellen ergab dann die Vitalität.

### **3.5. Zellkultur nach dem semisolid Assay**

Zunächst wurde eine 1:100-Verdünnung der Probe hergestellt, und zwar mit 0,9%-iger NaCl-Lösung. Hierbei wurden in einem 2ml-Eppendorf-Gefäß zu 10 µl der nativen Probe 990 µl des Verdünnungspuffers gegeben. Es wurde nach der Standardmethode gearbeitet, wobei ca.

50.000 Zellen (bezieht sich immer auf die Gesamt-Zellzahl der Probe und nicht selektiv auf CD34<sup>+</sup> Stammzellen) mit einem ml des semisoliden Methylzellulosemediums gemischt wurden. Zur Errechnung der nötigen Menge der Probe wurde die zuvor bestimmte Zellkonzentration herangezogen (s. o.).

Zunächst wurden die Zellkulturen auf 35mm-Petrischalen, später auf 24-Well-Platten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>- Gehalt angelegt. Zunächst wurden pro Platte 5 der 6 verfügbaren Reihen mit Zellkulturen belegt (s. Abb. 4). Jede Reihe bestand aus 4 Wells. Die 6. Reihe wurde zur Befeuchtung des Zellkulturmilieus mit Aqua oder 0,9%-iger NaCl-Lsg. Befüllt. Später hat sich ein 3-Reihen-System (s. Abb. 7) als ergiebiger erwiesen, weshalb dieses zu allen nachfolgenden Versuchen angewendet wurde. Es wurde bei der Belegung der Reihen der 24-Well-Platte jeweils eine Reihe übersprungen, welche dann mit Aqua oder NaCl-Lsg. befüllt wurde. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass eine höhere Feuchtigkeit im Zellkulturmilieu die Proliferation und damit die Ausbeute an Zellkolonien erhöht. Zuvor war die Beobachtung gemacht worden, dass im 3-Reihen-System fast doppelt so viele BFU-E's am Tag 14 nach Kulturanlage resultieren wie mit dem 5-Reihen-System. Die Kulturen wurden jeweils an Tag 1 oder 2 nach Kulturanlage auf makroskopisch erkennbare Kontamination untersucht, wobei als Hinweis auf eine mögliche Kontamination die Trübung der Kultur oder die Bildung von Kolonien innerhalb von 48 Stunden (Bakterien) genommen wurde. Um diese Gefahr zu minimieren, wurde in einer Laminar-Air-Flow-Werkbank gearbeitet. Die Kulturen wurden an Tag 6 der Kultivierung ggf. mit der jeweils zu testenden Substanz in verschiedenen Dosen bearbeitet. Es wurden auch parallel verschiedene Substanzen den Kulturen beigefügt, um sie direkt miteinander zu vergleichen.

### **3.6. Testung der Sensitivität des Zellkulturmodells**

Um die Eignung des Zellkulturmodells zum Nachweis eines Hemmeffektes auf die Proliferation von Stammzellen nachzuweisen erfolgte die Kultivation einer Zellprobe auf einer 24-Well-Platte unter Ansatz von 25.000 Zellen/Well auf 500 µl Methylzellulosemedium. Bei Kontaminationsfreiheit wurden die Kulturen am Tag 6 nach Kulturanlage mit einer Absteigenden Dosis Methotrexat behandelt, wobei das 5-Reihen-System verwendet wurde und die wasserferne Reihe mit der höchsten, wohingegen die wassernahe Reihe mit der niedrigsten Methotrexatdosis bearbeitet wurde.

### **3.7. Testung des Effektes normaler Antikörper auf das Zellkulturmodell**

Zur Testung eines evtl. Effektes von normalem humanem Immunglobulin auf die Zellkultur erfolgte die Anlage einer Kulturplatte mit 5 Reihen, von denen 4 Reihen am Tag 6 nach Kulturanlage mit unterschiedlichen Verdünnungen eines Standard-Immunglobulinpräparates behandelt wurden. Hierzu wurde Beriglobin (160 mg humanes Immunglobulin/ml (95% IgG, davon 61% IgG1, 28% IgG2, 5% IgG3, 6% IgG4, max. 1,7 mg IgA, mind. 100 IE Antikörper gegen Hepatitis A) verwendet. Dieses Präparat kommt u.a. bei verschiedenen hämatologischen Erkrankungen, z. B. AIHA, zur Anwendung und sollte keine Antikörper enthalten, die gegen Erythrozytäre Antigene gerichtet sind. Hiervon wurde hier ausgegangen, ohne die Spezifität der in dem Präparat enthaltenen Antikörper dezidiert zu testen.

### **3.8. Testung des Effektes von humanem Normalserum und –Plasma auf die Zellkultur**

Als weiteren Baustein zur Testung der Spezifität des Zellkulturmodells wurde der Einfluss von humanem Normalserum der Blutgruppe AB Rh negativ auf die Zellkultur untersucht. Hierzu wurde Serum eines Patienten verwendet, der die Blutgruppe AB Rh negativ trägt und eine Zellkultur nach dem 5-Reihen-Modell angelegt. Mit dieser und dem Serum wurde analog des o. g. Versuchs mit dem Beriglobin verfahren.

### **3.9. Testung des Einflusses des Alloantikörpers Anti-K11 auf die Erythropoese**

Nach Austestung diverser Normalimmunglobulinhaltiger Substanzen und ihres Einflusses auf die in vitro Erythropoese wurde nun auch der Einfluss des Alloantikörpers Anti-K11 auf die Proliferation hämatopoetischer Stammzellen getestet. Hierzu wurde eine 24-Well-Platte nach dem 3-Reihen-Modell am Tag 6 nach Kulturanlage mit unterschiedlichen Verdünnungen von Plasma einer Patientin mit Seropositivität für diesen Antikörper behandelt. Die Patientin hatte ein Kind geboren, welches an einem MHN erkrankte. In der klinischen Diagnostik ergab sich dann eine K11-Inkompatibilität als Ursache. Am Tag 14 nach Kulturanlage erfolgte die Auswertung des Zellwachstums (s. u.). Zum Vergleich wurden mit Normalplasma und Methotrexat behandelte, sowie native Kulturen mit den Anti-K11-Plasma-behandelten hinsichtlich der resultierenden BFU-E-Zahlen/Well verglichen.

### **3.10. Aufreinigung des IgG's mit der Protein-G-Säule**

Bisher wurden Antikörperhaltige Substanzen nur in Form von Gemischen mit mehreren z. T. komplexen Bestandteilen (Proteine, Gerinnungsfaktoren, Säuren oder Basen...etc.). Diese unspezifischen Bestandteile könnten potentiell als Störfaktoren fungieren, die einen evtl. Effekt der Antikörper vortäuschen oder kaschieren könnten. Daher erfolgte die Aufreinigung des IgG's aus dem Normalplasma und dem Anti-K11-Plasma. Das Normalplasma wurde aus einem Pool von Spender-Plasma gewonnen. Das Anti-K11-Plasma wurde von einer Patientin gewonnen, die ein neugeborenes mit MHN geboren hatte. Beide Plasmen wurden jeweils mit Hilfe einer Säule mit Protein-G aufgereinigt. Die Methode basiert auf der immunologischen Bindung von IgG an seinem Fc-Fragment. Die für das Fc-Fragment spezifischen Antikörper sind hierbei wandadhärent und binden das im Plasma enthaltene IgG unabhängig von seiner Spezifität. Die übrigen Bestandteile verbleiben im Eluat, welches erneut aufgereinigt oder verworfen wird. Der Prozess kann beliebig oft wiederholt werden. Das Plasma-IgG wird dann von den wandadhärenten Anti-Fc-Fragment-Antikörpern abgelöst und eluiert. So entsteht ein Gemisch aus dem zuvor im Plasma enthaltenen IgG.

### **3.11. Auswertung der Kulturen**

Die Auswertung der Zellkulturen erfolgte an Tag 14-15 nach Kulturanlage mittels inverser Lichtmikroskopie bei 40-facher Vergrößerung. Hierbei wurden die BFU-Es, CFU-GMs und CFU-Gs getrennt erfasst und gezählt, wobei das Hauptaugenmerk den BFU-Es galt, da diese im Rahmen der Fragestellung relevanter waren. Außerdem wurde in einigen Fällen auch eine Bestimmung der absoluten Zellzahlen pro Well der 24-Well-Platten durchgeführt. Der komplette Inhalt der Wells einer Reihe (I. d. R. 4 Wells) wurde hierbei mit Hilfe einer 2 ml-Pipette in 50ml IMDM- oder RPMI1640-Medium aufgelöst. Dies erfolgte schrittweise, indem ca. 3-4ml des Flüssigmediums in jedes Well gegeben, das Gemisch abpipettiert und in ein kalibriertes 50ml-Grainer-Gefäß gegeben wurde. Dieser Prozess wurde für jede Reihe so oft wiederholt, bis die 50ml-Markierung erreicht wurde. Die Grainer-Gefäße wurden fest verschlossen und in einer Eppendorf-Zentrifuge 10 min. bei 3500 Upm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und das Sediment mit den Zellen mit 1ml IMDM oder RPMI1640 im Grainer-Gefäß resuspendiert. Von dieser Suspension wurden dann 200 µl zur Bestimmung der Zellkonzentration mittels eines Blutbildzählgeräts entnommen. Aus der

Zellkonzentration wurde dann die absolute Zellzahl pro Well einer Reihe errechnet. Diese wurde als Maß für die hämatopoetische Aktivität der ursprünglich in der Kultur angesetzten Stammzellen genommen. Nachteil dieser Methode gegenüber der BFU-E-Zahlenbestimmung ist, dass die Bestimmung der absoluten Zellzahl nicht für die Erythropoese spezifisch ist. Außerdem ist bei dieser Methode die Bestimmung des Mittelwertes, einer Standardabweichung und eines p-Wertes zur Signifikanzprüfung nicht möglich, da alle Wells, die auf gleiche Art bearbeitet worden sind, zusammen in einem Grainer-Gefäß gemischt werden. Die so gewonnenen Ergebnisse sollen nur eine zusätzliche Validierung der BFU-E-Zahlen-Bestimmung bewirken. Die Kulturanlage erfolgte zunächst nativ. Später wurden bestimmte Wells, meist Reihen, mit Methotrexat, Standardimmunglobulin, Normalserum, Normalplasma, heparinisiertem Plasma, Anti-K11-Plasma und aufgereinigtem IgG aus Normal- und Anti-K11-Plasma bearbeitet. Dies erfolgte jeweils an Tag 6 nach Kulturanlage und diente der Testung des Einflusses dieser Substanzen auf die Erythropoese.

### **3.12. Etablierung des HALO-Tests**

Schließlich wurden auch Zellkulturen nach dem HALO-Protokoll angelegt. Dies erfolgte im Rahmen der Testung und Etablierung des gleichnamigen Tests. Die nach der gleichen Methode, wie oben beschrieben gewonnenen Stammzellproben wurden in Methylzellulosemedium gelöst, und zwar unter Verwendung eigens dafür hergestellter Kits, die das Medium mit additiv zugefügten Wachstumsfaktoren je nach zu untersuchender Zellpopulationen beinhalteten. Dieser Test ist eine Bestimmung der Proliferationsrate der gesuchten Population (hier der BFU-Es), wobei die Technik auf der Lyse der Zellen und Lumineszenzmessung in einem konventionellen Luminometer nach Markierung des von diesen Zellen produzierten ATP beruht. Die ATP-Konzentration stellt hierbei ein Maß für die proliferative Aktivität dar und ist somit keine Zellzahlbestimmung. Von der Stammzellsuspension wurden 5 Verdünnungen angefertigt (1:2, 1:5, 1:10, 1:20 und 1:100). Von jeder Verdünnung wurden 100 µl auf 100 µl Methylzellulosemedium in je 1 Well einer sterilen 96-Well-Platte gegeben. Jede Verdünnung wurde 2 Mal angesetzt, so dass insgesamt 10 Wells besetzt wurden. Die Kulturplatte wurde im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. An Tag 7 nach Kulturanlage wurde jedes Well mit 12,5 µl des Lysereagens bearbeitet und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde jedes Well mit 25 µl des Messreagens versetzt und nach 2 Minuten wurde die Lumineszenz im Luminometer

gemessen. Die Werte der jeweils doppelt angelegten Messpunkte wurden gemittelt. So entstand eine Eichkurve der Lumineszenz in Abhängigkeit von der initial angesetzten Zellzahl.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Etablierung eines Zellkulturmodells

Um den Einfluss des Antikörpers auf die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu untersuchen, wurde das zur hämatopoetischen Stammzellkultur im Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin routinemäßig eingesetzte Testverfahren auf eine 24-well Plattentechnik übertragen. In Vorversuchen wurde zunächst die Präzision und Reproduzierbarkeit dieser Zellkulturtechnik überprüft.

#### 4.1.1 Präzision und Reproduzierbarkeit der hämatopoetischen Stammzellkultur

Zunächst wurden 3 Kulturen in je einer 35mm-Petrischale angelegt. An Tag 14 nach Kulturanlage waren in Kultur A (anfangs  $75 \times 10^3$  Zellen) 146 BFU-E's, in Kultur B (anfangs  $100 \times 10^3$  Zellen) 266 BFU-E's und in Kultur C (anfangs  $120 \times 10^3$  Zellen) 336 BFU-E's nachweisbar (s. Tab. 2). Bei diesen Werten handelt es sich um Einzelmessungen, da jeweils nur eine Petrischale kultiviert wurde. Die Angabe von Mittelwerten mit Standardabweichung ist deshalb hier nicht möglich.

Tab. 2: Die Abhängigkeit der BFU-E-Zahl pro 35-mm-Petrischale von der initialen Stammzellzahl (n=1).

Initiale Zellzahl im Kulturansatz ( $\times 10^3$ )	BFU-E-Zahl
75	146
100	266
120	336

Die Zählung erfolgte mittels inverser Lichtmikroskopie. Die Vitalität der Stammzellen aus dem Aliquot betrug ca. 50%, ermittelt mittels Methylenblaufärbung und Zählung in einer Zählkammer. Dann wurden auf einer 24-Well-Platte 8 Wells mit verschiedenen initialen Zellzahlen belegt und das Wachstum an Tag 14 nach Kulturanlage mittels inverser Lichtmikroskopie kontrolliert. Folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Anzahl gebildeter BFU-E's in den verschiedenen Wells in Abhängigkeit von der initial angesetzten Zellzahl (s. Tab. 3). Hierbei wird absichtlich nicht die Zahl der angesetzten Stammzellen verwendet, welche nie direkt gezählt wurden, sondern die Zahl der im Kulturansatz



enthaltenen Leukozyten. Der Anteil CD34<sup>+</sup> Stammzellen betrug für die verwendeten Proben zwischen 1 und 3%.

Tab. 3: BFU-E-Zahl pro Well einer 24-Well-Platte in Abhängigkeit von der initial angesetzten Zellzahl. (n=1)

Initiale Zellzahl (Tsd.)	BFU-E-Zahl
10	88
20	82
30	121
40	127
50	141
60	159
70	188
80	224

Die Zellkultur in größerem Maßstab wurde mit initial 25.000 Zellen in 500 µl Medium nach in Abb. 3 dargestelltem Schema angesetzt, wobei die maximale Auslastung einer 24-Well-Platte mit 5 Reihen zu je 4 Wells festgesetzt wurde. Die restlichen 4 Wells blieben der Befeuchtung der Kultur vorbehalten. Eine Platte lieferte also maximal 20 Messpunkte. Um Kontaminationen auszuschließen, wurde jede Kultur an Tag 1 oder Tag 2 nach Kulturanlage makroskopisch auf Bakterien- oder Pilzbefall kontrolliert. Die Kulturen zeigten schon innerhalb der ersten Woche nach Kulturanlage makroskopisch sichtbares Zellwachstum. An Tag 14 nach Kulturanlage erfolgte die Auswertung des Wachstums der Kulturen mittels inverser Lichtmikroskopie. Es war festzustellen, dass die Mehrheit der Kolonien erythrozytär war, so dass die Stimulation mit Erythropoetin zunächst unterlassen wurde.

#### **4.1.2. Überprüfung der Sensitivität des Zellkulturmodells zum Nachweis einer Proliferationshemmung**

Um die Eignung des Zellkulturmodells zum Nachweis einer Zellproliferationshemmung nachzuweisen, wurden Versuche mit dem Zytoreduktivum Methotrexat durchgeführt.

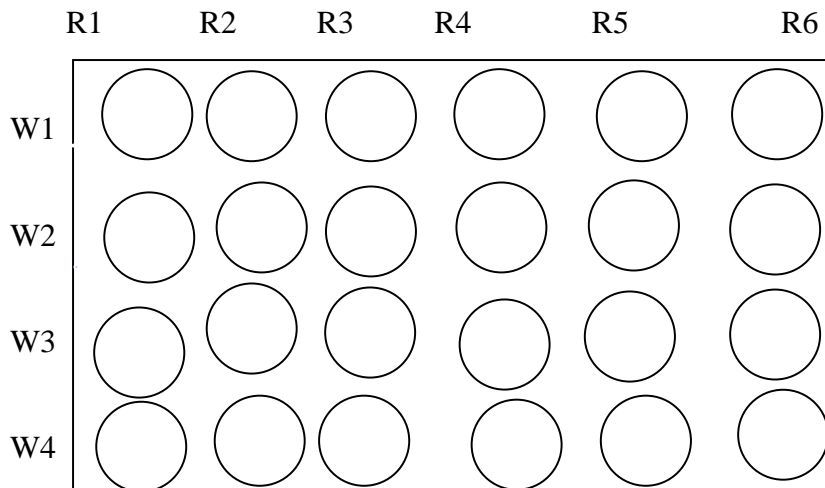


Abb. 3: Die Reihen R1 bis R5 mit Zellkulturen besetzt, R6 mit 0,9% NaCl-Lsg.

An Tag 6 nach Kulturanlage wurden diese Kulturen mit unterschiedlichen Dosen von Methotrexat bearbeitet. R1 wurde mit 5  $\mu\text{g}$ , R2 mit 0,1  $\mu\text{g}$ , R3 mit 0,01  $\mu\text{g}$  und R4 mit 0,5  $\mu\text{g}$  Methotrexat versetzt, wobei R4 als einzige nicht gemischt wurde. R5 wurde als Negativkontrolle nativ belassen. R6 wurde mit ca. 2 ml 0,9%-iger NaCl-Lösung pro Well versetzt, um zu gewährleisten, dass in den Kulturen eine ausreichende Luftfeuchtigkeit herrschte (s. Abb. 3). Es zeigte sich bei der Auswertung mittels inverser Lichtmikroskopie an Tag 15 ein deutlich dosisabhängiger Hemmeffekt auf das Wachstum, und zwar sowohl anhand der BFU-E-Zahlen, als auch der absoluten Zellzahlen pro Reihe (s. Tab. 4).

Tab. 4: Mittlere BFU-E-Zahl pro Well in einer Kulturplatte mit 5 Reihen in Abhängigkeit von der Methotrexatdosis,  $n=4$ ,  $p<0.001$

R	Mittlere BFU-E-Zahl pro Well	SA
1 5 $\mu\text{g}$	164,5	22,7
2 0,1 $\mu\text{g}$	175,25	26,9
3 0,01 $\mu\text{g}$	208,25	11,4
5 nativ	270	19,6

Damit war bewiesen, dass sich ein Hemmeffekt auf das Kulturwachstum mit dieser Methode zeigen lässt.

### **4.1.3. Ausschluss eines proliferationshemmenden Effektes von Normal-IgG auf die Erythropoese**

Um auszuschließen, dass Antikörper als solche einen hemmenden Einfluss auf die Erythropoese haben, wurden Versuche mit Standard-Ig (in Form des Präparats Beriglobin, Beschreibung s. unter „Material und Methoden“) und Normalserum der Blutgruppe AB Rh negativ durchgeführt und die resultierenden Wachstumsparameter mit denen nativer (unbearbeiteter) Zellkulturen verglichen. 2 Kulturplatten nach dem Schema in Abb. 4 wurden angesetzt. An Tag 6 nach Kulturanlage wurden die ersten 4 Reihen jeder Platte mit einer Verdünnung von Normalserum bzw. Standard-Ig (Beriglobin), ebenfalls nach dem in Abb. 4 dargestellten Schema, bearbeitet. R1 der Platte A wurde mit einer 1:10-Verdünnung der Standard-Ig-Lsg. (entspricht 1,5 mg/Well), R2 mit einer 1:5-Verdünnung (3 mg/Well), R3 mit einer 1:2-Verdünnung (7,5 mg/Well) und R4 mit der unverdünnten Ig-Lösung (15 mg/Well) bearbeitet. R5 wurde nativ belassen (0 mg/Well). Analog dazu erfolgte die Bearbeitung von Platte B mit Normalserum der Blutgruppe AB Rh negativ. Auch hier wurde eine bakterielle oder mykogene Kontamination der Kulturen an Tag 1 oder 2 makroskopisch ausgeschlossen. An Tag 14 nach Kulturanlage zeigte sich bei der inversionsmikroskopischen Auswertung der Kulturen keine dosisabhängige Korrelation zwischen Substanzdosis und Zellwachstum, weder in Form der BFU-E-Zahlen, noch in Form der absoluten Zellzahlen pro Well. Die unbehandelte Reihe R5 zeigte im Mittel eine BFU-E-Zahl von  $195 \pm 24,1$ , R1 (mit der 1:10-Verdünnung behandelt) zeigte im Mittel  $139 \pm 20,5$  BFU-E's, R2 (1:5-Verdünnung)  $173 \pm 44,9$  BFU-E's, R3 (1:2-Verdünnung)  $132 \pm 23,5$  und R4 (mit dem nativen Standardimmunglobulinpräparat behandelt) zeigte durchschnittlich  $84 \pm 34,4$  BFU-E's (s. Abb. 5, Tab. 5).

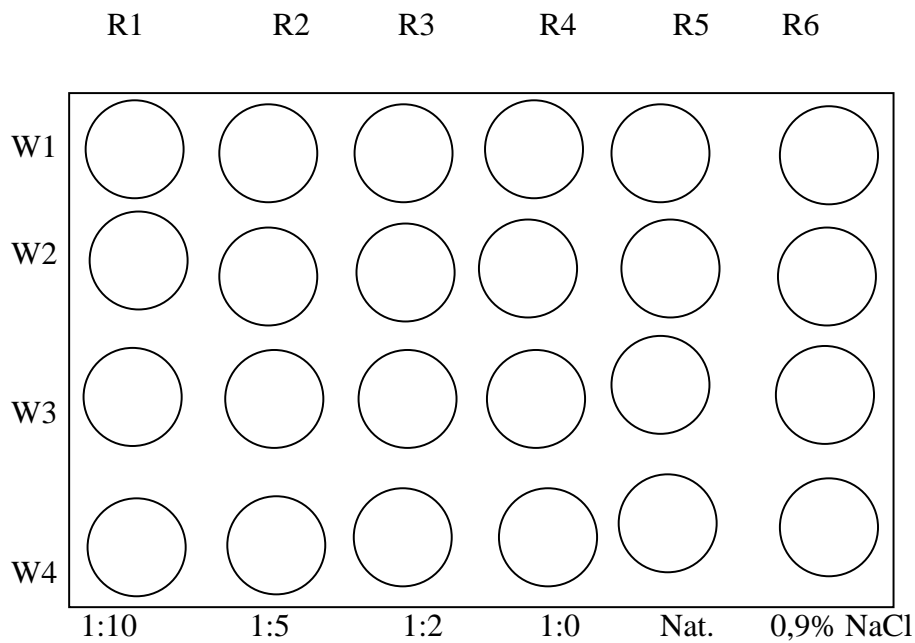


Abb. 4: Schema der mit Standardimmunglobulin bzw. Serum bearbeiteten Kulturplatte. Die Quotienten am unteren Rand bezeichnen den Verdünnungsgrad der hinzugefügten Substanz.

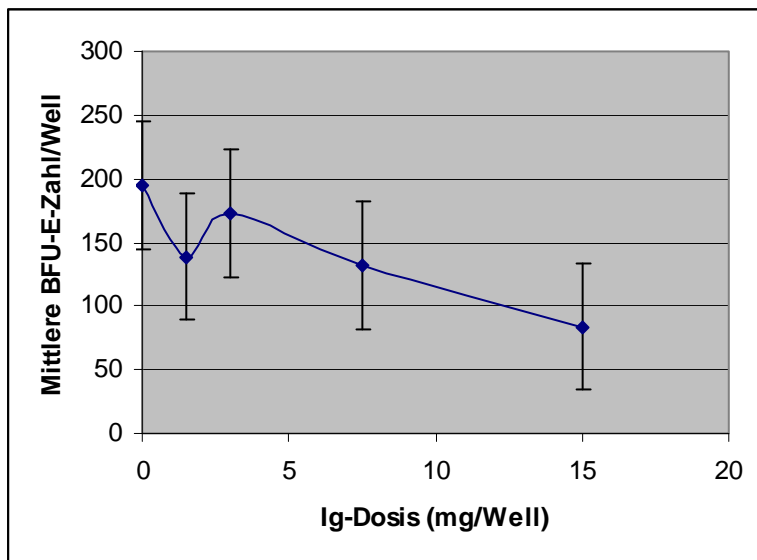


Abb. 5: Keine eindeutige Korrelation zwischen Dosis des Standardimmunglobulins und mittlerer BFU-E-Zahl. (Abszisse: Ig-Dosis in mg/Well, Ordinate: Mittlere BFU-E-Zahl pro Well). Auffällig ist nur, dass die native Kultur das stärkste Wachstum zeigt und die Kultur mit der unverdünnten Standard-Ig-Lsg. das schwächste. Zudem ist der Unterschied zwischen nativer und behandelter Kultur nicht immer signifikant,  $n=4$ ,  $p>0.05$  für die 1:5-Verdünnung und  $p<0.001$  für alle anderen Verdünnungen.

Tab. 5: BFU-E-Zahlen einer Kulturplatte mit 5 Reihen in Abhängigkeit von der Verdünnung des zugefügten Normalserums n=4.

<i>Verd.</i>	<i>W</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>Mittel</i>	<i>SA</i>	<i>p</i>
1:10		231	261	175	149	204	63,4	>0.05
1:5		131	208	169	141	162	35,7	<0.01
1:2		122	126	147	198	148	34,9	<0.001
Unverdünnt		227	162	118	201	177	47,6	>0.05
Kein Serumzusatz		229	191	224	165	202	30	-

#### 4.1.4. Matrixeffekt des Zellkulturmodells

Während der ersten Versuche zur Etablierung des Zellkulturmodells war festzustellen, dass R5 immer das größte Zellwachstum zeigte, unabhängig von der Substanz, die den Kulturen hinzugefügt wurde. Als Erklärung hierfür könnte die Tatsache sein, dass diese Reihe immer auch die wassernächste ist, da R6 immer mit Wasser oder 0,9%-iger NaCl-Lsg. gefüllt wurde. Es wurden 2 Kulturplatten angesetzt. Die eine nach der gewohnten Methode (s. Abb. 6), die andere nach einem neuen Schema (s. Abb. 7).

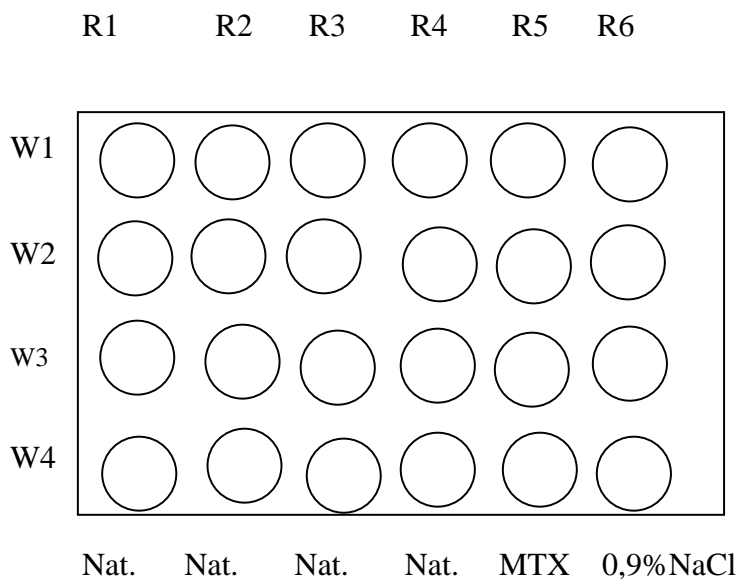


Abb. 6: Schema der Platte A mit 5 Reihen. Nur die 5. Reihe wurde mit Methotrexat bearbeitet. Die übrigen blieben nativ

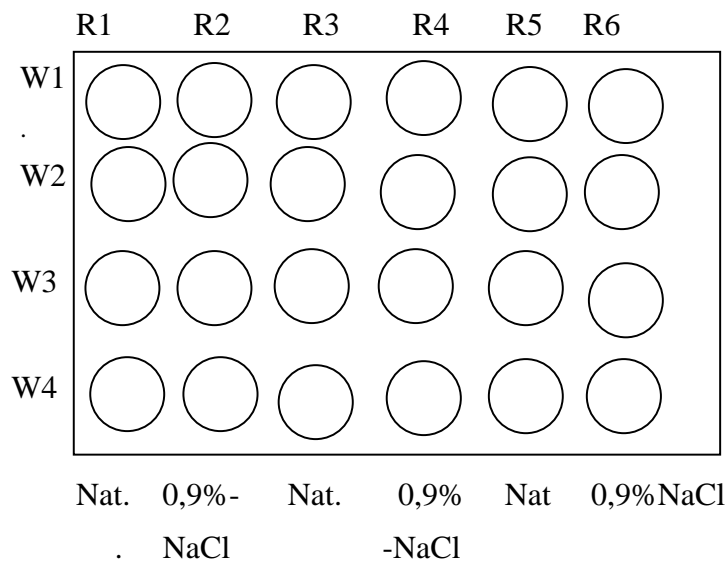


Abb. 7: Schema der Kultivierung von Stammzellen in einer 24-Well-Platte im 3-Reihen-System. Alle Reihen ohne Zusätze.

R1 bis R4 der Platte A zeigten mittlere BFU-E-Zahlen von  $185 \pm 29.3$ ,  $192 \pm 34$ ,  $196 \pm 72.9$  und  $247 \pm 75.1$  (s. Abb. 8, 9). R5 zeigte auf Grund der Methotrexatanwendung eine geringere Wachstumstendenz. R1-R3 der Platte B zeigten BFU-E-Zahlen von im Mittel 306, 307 und 352. Die 3-Reihen-Methode bot somit eine höhere Ausbeute an BFU-E's bei noch kleinerem Matrixeffekt. Daher wurde mit der 3-Reihen-Methode fortgefahren.

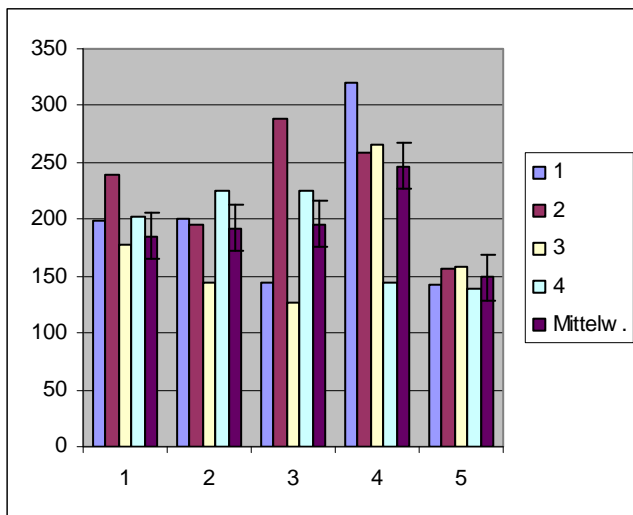


Abb. 8: Der positive Matrixeffekt auf Grund der Wassernähe ist angedeutet sichtbar, jedoch zumindest für die ersten 3 Reihen nicht signifikant ( $p > 0.05$ ). Innerhalb einer Reihe gibt es keinen signifikanten Unterschied des Zellwachstums ( $p > 0.05$ ). Hier besteht also kein Matrixeffekt,  $n=4$ .

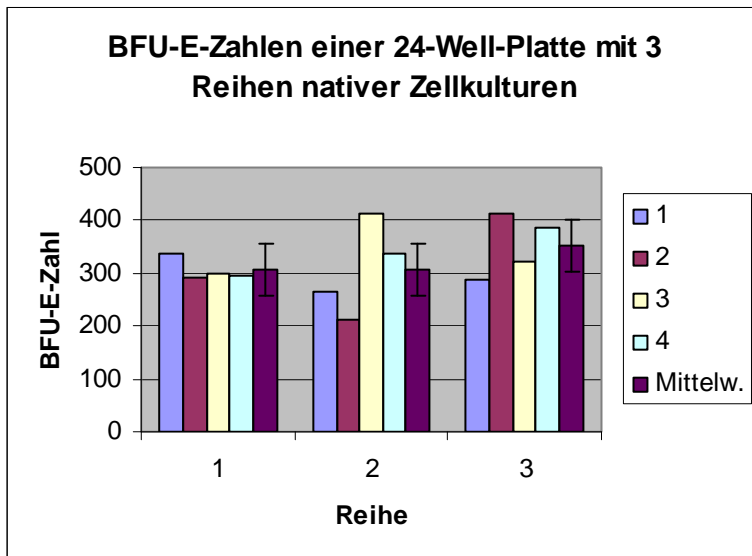


Abb. 9: BFU-E-Zahlen einer nach der 3-Reihen-Methode kultivierten 24-Well-Platte. Die Farben 1-4 jeder Reihe sind die Nummern der entsprechenden Wells innerhalb der Reihe. Der oben beschriebene Matrixeffekt ist hier nicht mehr nachweisbar,  $n=4$ ,  $p>0.05$ .

#### 4.1.5. Ausarbeitung der Bestimmung der absoluten Zellzahl pro Well

Um die Bestimmung der absoluten Zellzahl hinsichtlich der Eignung als Parameter für die Proliferation hämatopoetischer Stammzellen *in vitro* genauer zu überprüfen, wurde ein erneuter Versuch mit Standard-IgG mit der 3-Reihen-Methode durchgeführt, da diese den Matrixeffekt hinsichtlich der Lage der Reihe besser auszuschließen vermag. Es wurden 2 Platten mit je 3 Reihen a 4 Wells angelegt. Dies erfolgte mit einem Intervall von 3 Tagen zwischen der Anlage der ersten und der zweiten Platte. Die erste Platte wurde an Tag 6 nach ihrer Anlage mit einer Verdünnungsreihe von Standardimmunglobulin bearbeitet (R1, R2 und R3). Vorher wurden zwei andere Kulturplatten angelegt, die nativ belassen wurden. Alle Platten wurden jeweils an Tag 25 nach Kulturanlage ausgewertet, indem die absoluten Zellzahlen der Reihen nach oben beschriebener Methode bestimmt wurde. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Zellzahlen der Kulturen, die mit Standardimmunglobulin bearbeitet wurden und der Nativkulturen. Bemerkenswerterweise zeigte R1 immer eine geringere Zellzahl als die beiden anderen Reihen, wobei die dritte Reihe die größte Varianz zeigte. Die Zellzahlen für R1 bewegten sich sowohl für die Nativkulturen,

als auch für die mit Standardimmunglobulin bearbeiteten Kulturen zwischen  $2,6 \times 10^6$  und  $3,0 \times 10^6$  Zellen pro Reihe. Dann wurde eine Kulturplatte mit 3 Reihen angelegt. An Tag 6 nach Kulturanlage wurden je 2 Wells mit  $25 \mu\text{g}$  Methotrexat,  $1,5 \text{ mg}$  Standardimmunglobulin und  $0,3 \text{ mg}$  Standardimmunglobulin bearbeitet. Alle anderen Wells wurden nativ belassen. An Tag 25 nach Kulturanlage wurde eine Bestimmung der absoluten Zellzahlen durchgeführt. Die Neuerung bestand darin, dass dieses Mal nicht vier, sondern nur zwei Wells pro Grainer-Gefäß aufgelöst wurden, außer den nativen, die alle fünf in einem Grainer-Gefäß mit  $50 \text{ ml}$   $0,9\%$ -ige NaCl-Lösung diluiert wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die Bearbeitung der Kulturen mit Standardimmunglobulin keinen wesentlichen Effekt, insbesondere keinen hemmenden Effekt auf die Erythropoese ausübt, im Gegensatz zu Methotrexat. (S. Tabelle 6).

Tab. 6: Absolute Zellzahlen pro Well in Abhängigkeit von der hinzugefügten Substanz

Substanzzusatz	Zellen/Well	Anzahl Wells
Methotrexat	$0,5 \times 10^6$	2
Standard-Ig $1,5 \text{ mg}$	$1,45 \times 10^6$	2
Standard-Ig $0,3 \text{ mg}$	$1,4 \times 10^6$	2
-----	$1,02 \times 10^6$	5

Die gleiche Tendenz zeigte sich auch bei der Auszählung der BFU-Es als Marker für die Beeinflussung der Erythropoese.

#### 4.2. Versuche zur Beantwortung der Fragestellung

Nach Etablierung des Zellkulturmodells und Feststellung seiner Eignung als Messinstrument für die proliferative Aktivität hämatopoetischer Stammzellen wurde das Modell mit Anti-K11-Antikörper-haltigen Substanzen angewendet. Anti-K11 war nur in Form von Plasma einer Patientin mit bekannter Seropositivität für diesen Antikörper vorhanden. Dies würde die Aussagefähigkeit von Versuchen mit der Negativkontrolle in Form eines Standard-IgG-Präparat ohne sonstige Plasmabestandteile erheblich senken. Es wurde daher Standardnormalplasma aus einem Pool gesunder Individuen, welches nach der Gewinnung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert wurde, verwendet.



#### 4.2.1. Vergleich zwischen Normal-, Heparin- und Anti-K11-Plasma

Um den Effekt des Anti-K11-Plasmas mit dem von Heparin- oder Normalplasma zu vergleichen, wurden diese 3 Substanzen parallel auf Zellkulturen angewendet. Es wurden drei Kulturplatten mit je drei Reihen zu je vier Wells angelegt. Das Stammzellmaterial hierzu wurde einem Aliquot entnommen. Als zweite, akzessorische Negativkontrolle wurde heparinisierendes Plasma verwendet, welches mit einer PTT von ca. 50 s eine mittelgradige Heparinisierung aufwies. Als Positivkontrolle diente Methotrexat. Am Tag 8 nach Kulturanlage wurden die Kulturplatten nach folgendem Schema bearbeitet:

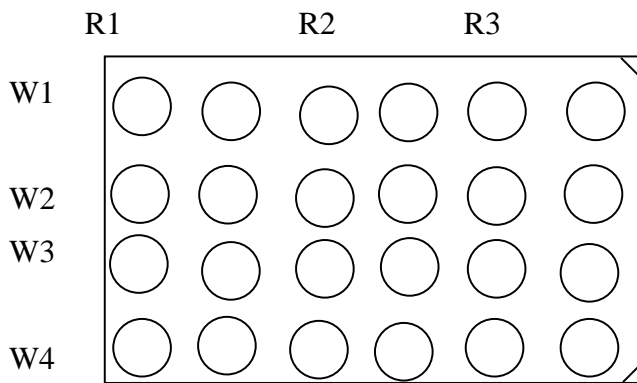


Abb.10: Schema der Kultivierung im 3-Reihen System. Zwischen den Reihen R1-R3 sind die Reihen mit Aqua gefüllt und werden nicht nummeriert.

##### Platte A:

R1W3+4: Je 0,1 ml Normalplasma 1:2 verdünnt

R1W1+2: Je 0,1 ml Normalplasma 1:5 verdünnt

R2W1+2: Je 0,1 ml Normalplasma 1:10 verdünnt

R2W3+4: Je 0,1 ml heparinisierendes Plasma 1:2 verdünnt

R3W3+4: Je 0,1 ml heparinisierendes Plasma 1:5 verdünnt

R3W1+2: Je 0,1 ml heparinisierendes Plasma 1:10 verdünnt

##### Platte B:

R1W3+4: Je 0,1 ml Anti-K11-Plasma 1:2 verdünnt

R1W1+2: Je 0,1 ml Anti-K11-Plasma 1:5 verdünnt

R2W1+2: Je 0,1 ml Anti-K11-Plasma 1:10 verdünnt

R2W3+4: Je 0,1 ml Methotrexatlösung 0,25 mg/ml(=25 µg)

R3 der Platte B und die komplette Platte C wurden nativ belassen. Die Auszählung der BFU-E's an Tag 17 nach Kulturanlage zeigte, dass weder das Normalplasma, noch das heparinisierte Plasma einen signifikanten Effekt auf die Hämatopoese, insbesondere auf die Erythropoese zu haben scheint. Die BFU-E-Zahlen der Kulturen, die mit Normalplasma bearbeitet wurden, lagen um  $197 \pm 65.1$  für die 1:2-Verdünnung,  $262 \pm 102$  für die 1:5-Verdünnung und  $240 \pm 82.8$  für die 1:10-Verdünnung. Die BFU-E-Zahlen der mit dem heparinisierten Plasma bearbeiteten Kulturen bewegten sich um  $301 \pm 70.8$  für die 1:2-Verdünnung,  $283 \pm 69.3$  für die 1:5-Verdünnung und  $242 \pm 160$  für die 1:10-Verdünnung. Damit konnte gezeigt werden, dass heparinisiertes Plasma, wie erwartet, ein etwas besseres Wachstum hämatopoetischer Stammzellen ermöglicht, als Normalplasma. Die Zahlen zeigen gleichzeitig, dass das Wachstum der Kulturen nicht von der Dosis bzw. Konzentration des Heparin-Plasmas oder des Normalplasmas abhängig ist. Im Vergleich mit den korrespondierenden Werten der nativen Kulturplatte zeigen nur die mit der 1:10-Verdünnung des Normalplasmas bearbeiteten Kulturen ein signifikant niedrigeres Wachstum ( $p < 0.001$ ). Alle übrigen Verdünnungen zeigten nicht signifikante Abweichungen ( $p > 0.05$ ). Die mit der 1:10- und der 1:5-Verdünnung des Heparinplasmas behandelten Kulturen zeigten ebenfalls ein signifikant niedrigeres Zellwachstum im Vergleich mit den korrespondierenden Werten der Nativkultur (s. Tab. 7,  $p < 0.001$ ), im Gegensatz zu den mit der 1:2-Verdünnung bearbeiteten Kultur ( $p > 0.05$ ). Die mit Anti-K11-Plasma versetzten Kulturen zeigten für alle Verdünnungen ein deutlich signifikant niedrigeres Wachstum, welches zudem auch dosisabhängig war ( $p < 0.001$ ). So konnten in den Kulturen mit der 1:2-Verdünnung im Mittel  $129 \pm 82$ , in denen mit der 1:5-Verdünnung  $200 \pm 60$  und in denen mit der 1:10-Verdünnung  $210 \pm 5$  BFU-Es gezählt werden. Die mittlere BFU-E-Zahl in den mit Methotrexat bearbeiteten Kulturen lag bei 148, was ebenfalls einer signifikanten Wachstumsminde rung entspricht ( $p < 0.001$ ). Die nativen Kulturen übertrafen im Wachstum durchweg alle bearbeiteten (s. Tab. 7-10), wobei R1 der nativen Kulturplatte im Wachstum signifikant niedriger lag als R2 und R3 ( $p > 0.001$ ). Zwischen R1 und R2 ergab sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der mittleren BFU-E-Zahlen ( $p > 0.05$ ). Die Bestimmung der absoluten Zellzahlen an Tag 25 nach Kulturanlage relativierte den klaren Hemmeffekt des K11-Plasmas (s. Tab. 11). Allerdings ist die BFU-E-Zählung als genauer einzustufen als die Zählung aller Zellen der Kulturen mit einem Blutbildzählgerät, v. a. im Hinblick auf die Vielzahl möglicher Störgrößen, u. a. auch die vermuteten Gerinnungseffekte des Plasmas,

aber auch sehr unterschiedliche Zellvolumina und Hämoglobinisierungsgrade der erythropoetischen Zelllinien.

Tab. 7: BFU-E-Zahlen einer Kulturplatte mit 3 Reihen zusammen mit der zugefügten Substanz und deren Verdünnung. NP=Normalplasma, HP=Heparinisiertes Plasma, n=2, p<0.001 für die 1:5- und die 1:10-Verdünnung, p>0.05 für die 1:2-Verdünnung.

<b>R</b>	<b>W</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>Mittel W1-2</b>	<b>Mittel W3-4</b>
1		194 NP 1:5	330 NP 1:5	243 NP 1:2	151 Np 1:2	262 +-102	197 +-65,1
2		299 NP 1:1 0	182 NP 1:1 0	355 HP 1:2	247 HP 1:2	240 +-82,8	301 +-70,8
3		376 HP 1:1 0	158 HP 1:1 0	332 HP 1:5	234 HP 1:5	242 +-160	283 +-69,3

Tab. 8: BFU-E-Zahlen einer Kulturplatte mit 3 Reihen zusammen mit der hinzugefügten Substanz. nativ=Kein Zusatz, n=2 für alle bearbeiteten Kulturen, n=4 für die nativen, p<0.001

<b>R</b>	<b>W</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>Mittel W1-2.</b>	<b>Mittel W3-4.</b>
1		157 Anti-K11 1:5	242 Anti-K11 1:5	71 Anti-K11 1:2	187 Anti-K11 1:2	200 +-60	129 +-82
2		206 Anti-K11 1:10	213 Anti-K11 1:10	150 Methotr exat	146 Metho trexat	210 +-5	148 +-2,8
3		266 nativ	387 nativ	323 nativ	296 nativ	318 +-86,4	318 +-22,6

Tab. 9: BFU-E-Zahlen der komplett nativen Kulturplatte, n=4, p&gt;0.,05.

<i>R</i>	<i>W</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>Mittel</i>	<i>SA</i>
1		277	244	191	203	228,75	39,3
2		343	328	301	316	322	17,9
3		310	381	351	361	351	29,8

Tab. 10: Aufstellung der oben beschriebenen Daten nach hinzugefügter Substanz und mittlerer BFU-E-zahl, p&lt;0.001 für die Anti-K11-Plasma- und Methotrexatbehandelten Kulturen im Vergleich mit den nativen.

<i>Hinzugefügte Substanz</i>	<i>Anzahl Wells (n)</i>	<i>Mittlere BFU-E-Zahl pro Well</i>	<i>p</i>
Normalplasma 1:2	2	197+-65,1	>0.05
Normalplasma 1:5	2	262+-102	>0.05
Normalplasma 1:10	2	240+-82,8	<0.001
Heparin-Plasma 1:2	2	301+-70,8	>0.05
Heparinplasma 1:5	2	283+-69,3	<0.001
Heparin-Plasma 1:10	2	242+-160	<0.001
Anti-K11-Plasma 1:2	2	<b>129+-82</b>	<b>&lt;0.001</b>
Anti-K11-Plasma 1:5	2	<b>200+-60</b>	<b>&lt;0.001</b>
Anti-K11-Plasma 1:10	2	<b>210+-5</b>	<b>&lt;0.001</b>
Methotrexat 25ug	2	148+-2,8	<0.001
Keine	16	304,875(=ca.305)+-57,8	>0.05

Tab. 11: Die absoluten Zellzahlen der Kulturplatte mit Normalplasma, heparinisierem Plasma und Anti-K11-Plasma, n=1.

<i>Hinzugefügte Substanz</i>	<i>Anzahl Wells</i>	<i>Absolute Zellzahl pro Well</i>
Normalplasma 1:2	2	$0,85 \times 10^6$
Normalplasma 1:5	2	$0,35 \times 10^6$
Normalplasma 1:10	2	$1,15 \times 10^6$
Heparin-Plasma 1:2	2	Messung nicht verwertbar
Heparin-Plasma 1:5	2	$1,15 \times 10^6$
Heparin-Plasma 1:10	2	$1,05 \times 10^6$
Anti-K11-Plasma 1:2	2	$0,45 \times 10^6$
Anti-K11-Plasma 1:5	2	$0,8 \times 10^6$
Anti-K11-Plasma 1:10	2	$1,65 \times 10^6$
Methotrexat	2	$0,65 \times 10^6$
Keine	16	$1,0810^6$

#### 4.2.2. Einsatz aufgereinigter IgG-Lösungen zur Spezifikation des effektiven Agens

Um die Störfaktoren durch die verschiedenen Bestandteile des Plasmas zu beseitigen, wurde das IgG von Normalplasma und Anti-K11-Plasma mittels Protein-G-Säule aufgereinigt. Das aufgereinigte IgG wies nach 3-4 Läufen die höchsten IgG-Titer auf. Die erhaltenen IgG-Lösungen wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  in kleinen Proben von je ca. 2 ml gelagert. Dann wurden drei neue Kulturplatten nach dem bekannten 3-Reihen-Schema angelegt. Dies erfolgte jedoch an zwei aufeinander folgenden Tagen, um das Risiko einer eventuellen Kontamination zu verringern. Hierbei wurde in Kauf genommen, dass die Platten folglich nicht alle mit Stammzellen aus einem Aliquot angelegt werden konnten. Platte A wurde an Tag 6 nach Kulturanlage mit dem aufgereinigten IgG aus normalem Poolplasma bearbeitet, und zwar nach folgendem Schema:

R1: 1:2-Verdünnung, 0,12 ml/Well

R2: 1:5-Verdünnung, 0,12 ml/Well

R3: 1:10-Verdünnung, 0,12 ml/Well

Analog dazu wurde Platte B mit aufgereinigtem IgG aus dem Anti-K11-Plasma bearbeitet. Platte C wurde nativ belassen.

Bei der Auswertung an Tag 16 mittels inverser Lichtmikroskopie zeigt sich auch dieses Mal ein deutlicher Hemmeffekt des Anti-K11-haltigen IgG auf die Erythropoese. Während die mit aufgereinigtem IgG aus normalem Poolplasma bearbeitete Platte in R1 im Mittel 154,75  $\pm$  16,4, für R2 132  $\pm$  21,7 und für R3 156,25  $\pm$  20,5 BFU-Es pro Well aufwies, waren in Platte B, die mit aufgereinigtem IgG aus Anti-K11-Plasma versetzt war, im Mittel nur 110,75  $\pm$  39 BFU-Es für R1, 131,25  $\pm$  13,1 für R2 und 124  $\pm$  13,4 BFU-Es für R3 zu zählen. Die nativ belassene Kulturplatte C, die im Übrigen in R3 nur 3 statt 4 Wells enthielt, unterschied sich in ihren mittleren BFU-E-Zahlen kaum von der Normal-IgG-Platte (S. Tab. 12-14, Abb. 20-24).

Tab.12: BFU-E-Zahlen der Platte A mit aufgereinigtem Normal-IgG. R1 wurde mit der 1:2-Verdünnung, R2 mit der 1:5-Verdünnung und R3 mit der 1:10-Verdünnung bearbeitet, n=4, p>0.05

<b>R</b>	<b>W</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>Mittel</b>	<b>SA</b>
1		148	179	149	143	154,75	16,4
2		122	116	164	126	132	21,7
3		131	181	159	154	156,25	20,5

Tab. 13: BFU-E-Zahlen der Kulturplatte B mit aufgereinigtem Anti-K11-haltigem IgG bearbeitet. Gleiches Verdünnungsschema wie in Tab 16, n=4

<b>R</b>	<b>W</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>Mittel</b>	<b>SA</b>	<b>p</b>
1		140	130	63	110	110,75	39	<0.001
2		147	136	125	117	131,25	13,1	>0.05
3		106	132	122	136	124	13,4	<0.001

Tab. 14: BFU-E-Zahlen der nativ belassenen Platte C nach Reihe und Well sortiert, Gesamtmittelwert 159.5 BFU-Es/Well n=11, p=

<b>R</b>	<b>W</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>Mittel</b>	<b>SA</b>	<b>p</b>
1		164	155	102	191	153	37,9	>0.05
2		102	150	178	145	143,75	31,4	>0.05

<i>R</i>	<i>W</i>	<i>I</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>Mittel</i>	<i>SA</i>	<i>p</i>
3		194	189	184	-----	189	5	>0.01

Ebenfalls jeweils an Tag 16 nach Kulturanlage wurden nach Reihe sortiert die absoluten Zellzahlen der Kulturen bestimmt. Es zeigte sich, dass die Platte B (Anti-K11) auch hier deutlich niedrigere Werte aufwies als die beiden anderen. Diese Zahlen korrelierten hier sehr gut mit der Dosis des zugefügten Anti-K11-haltigen IgG's und lagen dabei alle signifikant unterhalb den entsprechenden Werten der Nativ- und der mit Normal-IgG bearbeiteten Kulturen ( $p < 0.001$ ). Diese Feststellung spricht für einen klaren Hemmeffekt des Anti-K11 auf die Erythropoese. (s. Tab. 15).

Tab. 15: Absolute Zellzahlen der Kulturplatten nach hinzugefügter Substanz und Verdünnung dieser sortiert, n=1.

<i>Hinzugefügte Substanz</i>	<i>Verdünnung</i>	<i>Anzahl Wells</i>	<i>Zellzahl pro Well</i>
Normal-IgG	1:2	4	$6,9 \times 10^6$
Normal-IgG	1:5	4	$8,6 \times 10^6$
Normal-IgG	1:10	4	$10,1 \times 10^6$
IgG mit Anti-K11	1:2	4	<b><math>0,52 \times 10^6</math></b>
IgG mit Anti-K11	1:5	4	<b><math>1,6 \times 10^6</math></b>
IgG mit Anti-K11	1:10	4	<b><math>2,125 \times 10^6</math></b>
----- ----	----- ----	4	$0,825 \times 10^6$
----- ----	----- ----	4	$1,825 \times 10^6$
----- ----	----- ----	3	$2,2 \times 10^6$

### **4.3. Etablierung des HALO-Tests**

Die bisherigen Ergebnisse der Versuche mit Anti-K11 sind nicht völlig konkordant. Nur der erste Versuch mit Anti-K11-Plasma im Vergleich mit Normal- und Heparinplasma und einer Nativkultur ergab einen signifikanten Hemmeffekt, allerdings war die Dosisabhängigkeit nur im Bereich der hohen Anti-K11-Plasmakonzentration signifikant. Andererseits zeigen die als ungenauer eingestufteten absoluten Zellzahlen der mit aufgereinigtem Anti-K11 bearbeiteten Kulturplatte eine sehr gute Dosis-Wirkungsbeziehung (S. Tab. 15). Recherchen ergaben einen Hinweis auf einen vielversprechenden Test, der mittels Immunfluoreszenz in der Lage sein soll, aus der Masse der Zellkolonien spezifisch eine bestimmte Population, z. B. die erythropoetischen Progenitoren, indirekt zu quantifizieren. Dieser Test wird HALO-Test genannt und schien geeignet, das Problem der möglichen Ungenauigkeit bei der konventionellen Inversionsmikroskopie zu lösen.

#### **4.3.1. Prinzip des HALO-Tests**

Der HALO-Test basiert auf der Technik der Immunlumineszenz. Proliferierende Zellen produzieren und speichern größere Mengen von ATP, dem zelleigenen Energieträger. Mittels Membranlysierender Enzyme werden die Zellen in der Kultur künstlich lysiert und somit das ATP freigesetzt. Dieses kann dann mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen ATP, welche mit einem Lumineszent markiert sind, gebunden werden. Die Messung der Lumineszenz-Intensität in einem Luminometer ist somit ein Maßstab für die ATP-Konzentration in den Zellen. Auf diese Weise lässt sich die Proliferationsrate indirekt semiquantitativ abschätzen. Um von der Lumineszenz auf die ATP-Konzentration zu schließen, bedarf es einer Eichkurve, anhand derer die Konzentration von ATP abgelesen werden kann.

#### **4.3.2. Erstellung der ATP-Eichkurve**

Das HALO-Kit verwendet eine 96-Well-Platten-Technik. Es werden 2 Platten mit dem standardisierten Kit geliefert. Eine sterile für die Kultivation von hämatopoetischen Stammzellen und eine unsterile zur Erstellung der ATP-Eichkurve. Zunächst wurde die



unsterile Platte verwendet, um eine Eichkurve mit standardisierten ATP-Konzentrationen zu erhalten.

Es wurden 4 Standard-ATP-Konzentrationen unter Verwendung der im HALO-Kit enthaltenen Standard-ATP-Lösungen ausgewählt, nämlich 0 $\mu$ M, 0,01 $\mu$ M, 0,1 $\mu$ M und 1  $\mu$ M und die Lumineszenzmessung nach Zugabe des Markierungsreagenz (MR) durchgeführt. Es ergab sich ein linearer Zusammenhang zwischen ATP-Konzentration und mittlerer Lumineszenzintensität. (s. Tab. 16)

Tab. 16: Mittlere Lumineszenz in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration, n=4

ATP-Konzentration( $\mu$ M)	Mittlere Lumineszenz	SA
0	0,001	0,0008
0,01	0,002	0,001
0,1	0,015	0,006
1	0,102	0,001

#### 4.3.3. Korrelation der ATP-Lumineszenzmessung mit der Zellzahl

Um die Korrelation der gemessenen Lumineszenz mit der Zellkonzentration zu verifizieren, wurde eine Lumineszenzmessung nach Verdünnung der Zellsuspension der Originalprobe vorgenommen. Es wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt, so dass die initialen Zellkonzentrationen pro ml folgende Werte ergaben:

Well 1:  $0,028 \times 10^6$ /ml

Well 2:  $0,07 \times 10^6$ /ml

Well 3:  $0,14 \times 10^6$ /ml

Well 4:  $0,28 \times 10^6$ /ml

Well 5:  $1,4 \times 10^6$ /ml

Bei der Messung der Lumineszenz an Tag 7 nach Kulturanlage und Inkubation in einer 96-Well-Platte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>, wie im HALO-Protokoll beschrieben, zeigte sich die beste Korrelation zwischen Lumineszenz und initial angesetzter Zellzahl bei einer Integrationszeit von 80ms. Bei der Integrationszeit handelt es sich um die Zeit, in der für ein Well die Lumineszenz gemessen wird. Die Korrelation zwischen initial angesetzter Zellzahl pro ml und der mittleren Lumineszenz ist in Abb. 11 wiedergegeben. Die Kulturanlage erfolgte nach Aufbereitung der Proben durch Zentrifugation und Isolation der Leukozyten aus dem Apheresat. Zur Lumineszenzmessung müssen die Zellkulturen zuvor lysiert werden, um das

intrazelluläre ATP freizusetzen, welches dann mittels des Messungsreagenz, einem lumineszent-markiertem Antikörper gegen ATP, gebunden werden kann. Durch die Aufbereitung des Apheresats vor der Kultivierung erhöhte sich die Vitalität der Stammzellen von ca. 60 auf 70-90%, da bei der Aufbereitung avitale Stammzellen ausgesondert werden.

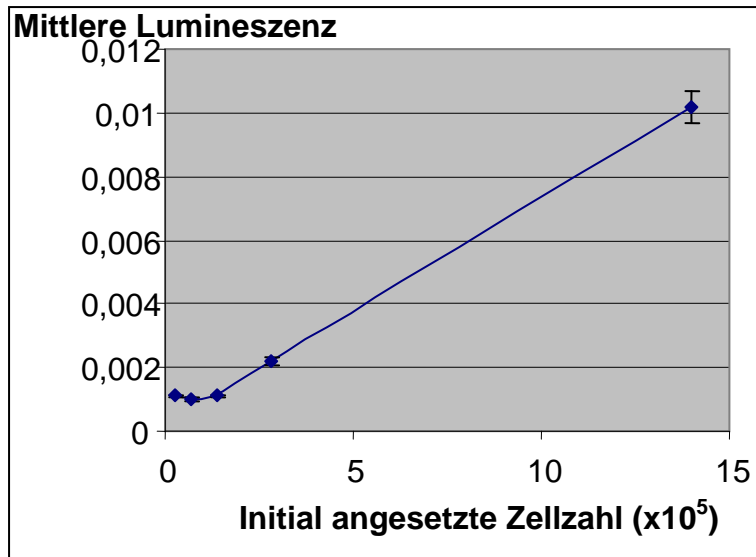


Abb. 29: Praktisch lineare Korrelation zwischen initialer Zellkonzentration in der Kulturansatzzellsuspension und der mittleren Lumineszenz an Tag 7 nach Kulturanlage, n=4.

## **5. Diskussion**

Die Fragestellung dieser Arbeit ist, ob der Alloantikörper Anti-K11 in der Lage ist, die Hämatopoese, insbesondere die Erythropoese zu beeinflussen. Hintergrund der Fragestellung ist der im Institut für experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin aufgetretene Fall eines MHN auf Grund einer K11-Inkompatibilität zwischen Mutter und Kind, wobei die Erythrozyten des Neugeborenen, im Gegensatz zu denen der Mutter, das Antigen K11 exprimierten. Im Serum der Mutter konnte der Antikörper Anti-K11 in Form von IgG nachgewiesen werden. Bei der Recherche der Weltliteratur findet sich nur eine Arbeit, die sich mit der transfusionsmedizinischen Relevanz des Anti-K11-Antikörpers befasst. Diese zeigt keinen signifikanten hämolytischen Effekt dieses Antikörpers auf die entsprechenden Erythrozyten, woraus die Autoren schließen, dass K11-Tragende Erythrozyten gefahrlos an Anti-K11-seropositive Patienten transfundiert werden könnten. (20). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass Anti-K1-Antikörper in der Lage sind, die Hämatopoese zu hemmen. Da das K1-Antigen wie das K11-Antigen zur Kell-Familie gehört, erwächst hieraus die Hypothese, dass Anti-K11 möglicherweise einen ähnlichen Einfluss auf die Hämatopoese haben könnte. Der klinische Fall eines MHN zeigt, dass dieser Antikörper zumindest reife Erythrozyten des neugeborenen schädigen kann.

### **5.1. Beantwortung der Fragestellung**

Zur Beantwortung der Fragestellung muss zunächst ein Modell erstellt werden, an Hand dessen sich ein etwaiger Effekt des Anti-K11-Antikörpers zuverlässig und sensitiv nachweisen lässt. Dies gelingt durch die Anwendung des Semisolid Assays unter Einschluss einiger Modifikationen. Bei dem Semisolid Assay handelt es sich um ein Zellkulturmodell auf der Basis des Methylzellulosemediums. In diesem Medium lassen sich hämatopoetische Stammzellen kultivieren und ihr Wachstum nach 14 Tagen quantifizieren. Diese durch Fauser und Messner 1978 bekannt gewordene Zellkulturmethode für hämatopoetische Stammzellen stellt heute einen elementaren Bestandteil klinisch-hämatologischer Diagnostik dar. Er dient der Qualitätserfassung von Apheresaten von Patienten, denen eine Chemotherapie mit anschließender autologer Knochenmarktransplantation bevorsteht. Er ist prinzipiell ein zuverlässiger, reproduzierbarer Test, der in der klinischen Routine im Institut für experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin in 35 mm-Petrischalen durchgeführt

wird. Die erste Modifikation besteht in der Übertragung der Methode auf eine 24-Well-Plattentechnik, um bei möglichst geringem Materialverbrauch möglichst viele Messpunkte zu erhalten (s.o.). Die Sensitivität des Modells wird durch den eindeutigen Nachweis eines signifikanten ( $n=4$ ,  $p<0.001$ ) Hemmeffektes des Zytoreduktivums Methotrexat bewiesen. Des Weiteren zeigt das Modell einen unterschiedlich starken Hemmeffekt in Abhängigkeit von der verwendeten Methotrexatdosis. Ein signifikanter Einfluss von Normal-Ig in Form des Präparats Beriglobin (Zusammensetzung s. o.) kann nicht durchgehend nachgewiesen werden ( $p<0.001$  für alle Verdünnungen außer der 1:5-Verdünnung, für die  $p>0.05$ ). Normalserum der Blutgruppe AB rhesus-negativ scheint keinen signifikanten Einfluss auf die Erythropoese zu haben ( $p>0.05$  für die 1:10-Verdünnung und das unverdünnte Serum. Die 1:2-Verdünnung ergibt  $p<0.001$ , für die 1:5-Verdünnung  $p<0.01$ ). Aus den P-Werten ergibt sich zwar z.T. ein hochsignifikanter Effekt auf die Erythropoese. Dieser lässt sich jedoch nicht mit der Konzentration der hinzugefügten Substanz korrelieren. Hinzu kommt, dass die 24-Well-Platten-Technik offenbar einen signifikanten Matrixeffekt aufweist, so dass der Erwartungswert, der dem Mittelwert der nativen Reihe entspricht, in diesem Versuch zu hoch angesetzt ist und so ein signifikanter Einfluss von Normalserum oder Beriglobin vorgetäuscht werden kann. Dieser Matrixeffekt ist wahrscheinlich auch im 3-Reihen-System zumindest zwischen R1 und R3 signifikant ( $p<0.001$ ). Im Weiteren wird zur Vermeidung des Matrixeffektes immer mit den korrespondierenden Reihen zwischen bearbeiteten und nativen Kulturen verglichen werden.

### **5.1.1. Einfluss von Anti-K11 auf die Erythropoese**

Der Anti-K11-Antikörper lag in Form von Plasma einer Patientin vor, die ein Kind geboren hatte, welches an einem MHN erkrankte. Die Stammzellkulturen wurden mit unterschiedlichen Verdünnungen des Plasmas behandelt und der Effekt auf die Proliferation an Hand der resultierenden BFU-E-Zahlen an Tag 14 nach Kulturanlage beobachtet. Zum Vergleich wurde eine äquivalente Anzahl von Wells mit Methotrexat (Positivkontrolle) und Normalplasma (Negativkontrolle) bearbeitet. Als zweite Negativkontrolle wurden einige Zellkulturen nativ belassen. Die mit Anti-K11-Plasma bearbeiteten Kulturen zeigten im Vergleich mit den entsprechenden nativen Negativkontrollen signifikant niedrigere BFU-E-Zahlen ( $n=2$ ,  $p<0.001$ ). In der mit der 1:2-Verdünnung des Anti-K11-Plasmas behandelten Kultur waren die BFU-E-Zahlen etwa auf dem Niveau der mit 25 µg/Well Methotrexat

behandelten Kulturen. Der Effekt der höheren Verdünnungen war geringer ausgeprägt, jedoch ebenfalls signifikant ( $p < 0.001$ ), was den Erwartungen entspricht. Die BFU-E-Zahl pro Well lag hier im Mittel um etwa 1/3 niedriger als in der Nativkultur. Dies gilt auch im Vergleich mit den mit Heparinplasma aufbereiteten Kulturen ( $p < 0.001$ ). Interessanterweise zeigen die mit Heparinplasma behandelten Kulturen mit steigender Konzentration ein größeres Wachstum, was sich in einer höheren BFU-E-Zahl pro Well äußert. Diese Differenz ist zwischen der 1:2- und 1:10-Verdünnung signifikant ( $p < 0.001$ ), nicht jedoch zwischen der 1:5- und 1:2-Verdünnung ( $p > 0.05$ ). Im Vergleich zwischen der 1:5- und 1:10-Verdünnung ist die Signifikanz grenzwertig ( $p > 0.01$ ). Als Erklärung kommt der Gerinnungshemmende Effekt des Heparins in Frage.

### **5.1.2. Einsatz des aufgereinigten IgGs**

Da Plasma ein inhomogenes Gemisch aus verschiedenen z. T. komplexen Bestandteilen ist, können bei der Anwendung von in Plasma gelösten Agenzien diverse Störfaktoren einfließen, die nicht unmittelbar beeinflussbar oder kalkulierbar sind. Daher wurde nach den Versuchen mit Plasma, die eine signifikante Hemmung der Hämatopoese durch Anti-K11-Plasma zeigten, eine analoge Versuchsreihe mit aufgereinigtem IgG initiiert. Dazu wurde das vorhandene Anti-K11- und Normalplasma über eine Protein-G-Säule aufgereinigt, so dass das im Plasma enthaltene IgG isoliert werden konnte. Das Eluat mit dem IgG wurde dann analog zum Plasma angewendet, um den Effekt des Anti-K11-haltigen aufgereinigten IgGs zu testen. Es wurden Kulturplatten mit jeweils 3 Reihen angelegt, von denen eine mit aufgereinigtem IgG aus Normalplasma und eine zweite mit aufgereinigtem IgG aus Anti-K11-Plasma behandelt wurde. Die dritte Kulturplatte blieb zur Negativkontrolle nativ. Die Bearbeitung erfolgte wieder mit 3 Verdünnungen (1:2, 1:5 und 1:10), wobei jeweils 4 Wells mit einer Verdünnung bearbeitet wurden ( $n=4$ ). Nach 14 Tagen zeigte die mit aufgereinigtem IgG aus Normalplasma bearbeitete Kulturplatte eine mit der nativen Kultur vergleichbare BFU-E-Zahl pro Well. Die BFU-E-Zahlen pro Well in der mit IgG aus Anti-K11-Plasma bearbeiteten Kulturplatte war signifikant niedriger ( $p < 0.001$ ). Insbesondere die mit der 1:2-Verdünnung behandelten Kulturen zeigten eine deutliche Wachstumsreduktion im Vergleich zu den mit den anderen Verdünnungen des aufgereinigten IgGs aus Anti-K11-Plasma behandelten. Auffällig war hier, dass die mit der 1:10-Verdünnung des aufgereinigten Anti-K11-IgGs behandelten Kulturen ein etwas niedrigeres Wachstum zeigten als die mit der 1:5-

Verdünnung bearbeiteten. Dieser Effekt scheint nicht signifikant zu sein ( $p > 0.05$ ). In der Bestimmung der absoluten Zellzahl pro Well zeigte sich jedoch ein signifikanter Konzentrationsabhängiger Effekt des aufgereinigten IgGs aus Anti-K11-Plasma auf die Erythropoese ( $p < 0.001$ ). Die mittlere Zellzahl pro Well war in den mit der 1:2-Verdünnung bearbeiteten Kulturen um  $2/3$  niedriger als in den mit der 1:5-Verdünnung behandelten, in denen die absolute Zellzahl pro Well wiederum um  $1/3$  niedriger war als in den mit der 1:10-Verdünnung behandelten Kulturen. Die BFU-E-Zahlen pro Well waren in den mit der 1:2- und der 1:10-Verdünnung des aufgereinigtem IgG aus Anti-K11-Plasma behandelten Kulturen signifikant niedriger als die in den Kulturen mit den entsprechenden Verdünnungen des aufgereinigtem IgGs aus Normalplasma und den nativen Kulturen ( $p < 0.001$ ). Für die 1:5-Verdünnung des aufgereinigten IgGs aus Anti-K11-Plasma konnte hingegen kein signifikanter Einfluss auf die BFU-E-Zahlen pro Well im Vergleich mit den nativen und Normal-IgG- behandelten Kulturen nachgewiesen werden ( $p > 0.05$ ). Möglicherweise liegt dem ein Aufbereitungsfehler bei der Anlage dieser Zellkultur zu Grunde. In der Bestimmung der absoluten Zellzahlen pro Well zeigte sich ein eindeutig signifikanter Hemmeffekt des Anti-K11 auf die Erythropoese ( $p < 0.001$ ). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Zellzählung mit einem Blutbildzählgerät erfolgte (s. o.) und ungenauer ist, als die Zählung der BFU-Es. Des Weiteren ist mit dieser Methode die Bestimmung der Standardabweichung nicht möglich. Dennoch spricht das Ergebnis für einen signifikanten Hemmeffekt des Anti-K11 auf die Erythropoese.

## **5.2. Der HALO-Test**

Diese noch relativ neue Methode wurde in den USA für Forschungszwecke entwickelt. Der Hersteller verspricht eine genauere, schnellere und effizientere Quantifizierung des proliferativen Potentials hämatopoetischer Stammzellen. Der entscheidende Vorteil ist, dass die Auswertung des Zellwachstums schon an Tag 7 erfolgen kann und dass durch die Anwendung von 96-Well-Platten hohe Durchsatzraten möglich sind. Außerdem misst der Test die Proliferative Potenz der Zellen, um die es letztlich bei der Zellkultur von hämatopoetischen Stammzellen geht, und kommt zudem mit noch weniger Material aus, als die 24-Well-Platten-Technik. Nachteil ist neben den höheren Kosten die Unerprobtheit für die klinische Diagnostik, wofür der Test auch bisher nicht zugelassen ist. Abgesehen davon zeigt der Test jedoch eine sehr gute Korrelation der gemessenen Lumineszenz mit der ATP-

Konzentration und der Zellzahl, die initial in der Kultur angesetzt wurde, was die Validität deutlich erhöht.

### **5.3. Fehlerquellen**

Für eventuelle Fehlergebnisse kommen einige Fehlerquellen als Ursache in Frage.

#### **5.3.1. Die Aufbereitung der Stammzellen**

Bei den experimentellen Arbeiten wurden keine reinen Stammzellsuspensionen verwendet, sondern Gemische aus überwiegend reifen und wenigen unreifen Blutzellen. Es wurde davon ausgegangen, dass nur die tatsächlichen Stammzellen, die mit einem Anteil zwischen 1,2 und 4 % in den Apheresaten vertreten waren, in der Methylzellulosekultur zu den CFUs und BFU-Es heranreifen können, so dass die anderen in den Kulturen enthaltenen Zellen keinen Einfluss auf das Ergebnis haben würden. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass bereits reifere Vorläuferzellen unter bestimmten Umständen von einer Differenzierungslinie in eine andere übergehen können. Des Weiteren ernähren sich auch ausgereifte Blutzellen von dem Kulturmedium und könnten so das Zellwachstum stören. Hierdurch könnte die z.T große Varianz der BFU-E-Zahlen erklärbar sein. Diese könnte zu falsch signifikanten Unterschieden des Zellwachstums in verschiedenen Kulturen führen. Auch die Lagerung der Stammzellapheresate könnte eine Störgröße sein, indem die Vitalität der Stammzellen und damit ihr Anteil in den Aliquots sich ändern können. Die Vergleichbarkeit des Zellwachstums aus zwei verschiedenen Aliquots eines Patienten ist somit nicht unbedingt gegeben.

#### **5.3.2. Die Verwendung von Antikörpermischungen**

Für die Experimente wurde zu keiner Zeit eine reine Anti-K11-Antikörper-Lösung verwendet, sondern immer Gemische aus verschiedensten IgG-Arten. Sowohl im Anti-K11- als auch im Normalplasma sind Antikörper unterschiedlicher Art und Spezifität enthalten. Die Spezifität der Antikörper wurde nicht bestimmt. Die meisten gehörten der IgG-Klasse an. Somit ist nicht auszuschließen, dass auch das Normalplasma z.T. Anti-K11 enthält. Ähnliches gilt für das Standard-IgG-Präparat Beriglobin, welches ebenfalls verwendet wurde. Hier könnte eine Ursache für die z. T. signifikanten Hemmeffekte des Normalplasmas auf die Erythropoese

liegen. Außerdem kommen hierfür auch andere bekannte (z.B. Anti-K1) oder unbekannte Antikörper in Frage. Eine weitere Mögliche Störgröße ist die Aufreinigung der Plasmata mit der Protein-G-Säule. So wurden mehrere Läufe der Aufreinigung durchgeführt, die jeweils unterschiedliche Konzentrationen von IgG ergaben. Damit entspricht die Konzentration von IgG in einer 1:5-Verdünnung möglicherweise nicht der in einer anderen 1:5-Verdünnung. Auch der Anteil von Anti-K11 in den aufgereinigten IgG-Gemischen könnte inkonstant sein. Dies liefert eine mögliche Erklärung für die teils signifikanten teils nicht signifikanten Effekte des Anti-K11-Plasmas und des aufgereinigten IgGs aus Anti-K11-Plasma.

#### **5.4. Schlussfolgerungen**

Die Fragestellung dieser Arbeit kann auf Grund der vorliegenden Ergebnisse mit großer Wahrscheinlichkeit positiv beantwortet werden. Die Resultate legen nahe, dass Anti-K11 ein wirksamer Inhibitor der Erythropoese ist.

Mit Sicherheit ausgeschlossen konnte ein Einfluss von Normal-IgG, Normalplasma und Normalserum auf die Erythropoese, was sich an Hand der Unabhängigkeit der BFU-E-Zahlen von der Dosis der jeweiligen Substanz zeigen ließ. Auch waren die BFU-E-Zahlen in den mit diesen Substanzen bearbeiteten Kulturen meist nicht signifikant niedriger, als in der unbehandelten Kulturen, wobei ein positiver Matrixeffekt der 24-Well-Platte die Beurteilung erschwert. Für das Zytoreduktivum Methotrexat waren die Hemmeffekte auf die Erythropoese hingegen immer signifikant ( $p < 0.001$ ), wobei auffiel, dass die durch Anti-K11-Plasma oder aufgereinigtes Anti-K11-IgG erreichten BFU-E-Zahlen pro Well meist mit denen des Methotrexats vergleichbar waren, was wiederum auf einen Hemmeffekt des Anti-K11 auf die Erythropoese schließen lässt. Ein stimulierender Effekt des Anti-K11 auf die Erythropoese konnte zu keiner Zeit gefunden werden. Die BFU-E-Zahlen und die absoluten Zellzahlen pro Well bei Auswertung der Kulturen lagen für Anti-K11-behandelte Kulturen nie über denen der anderen Kulturen (abgesehen von den Wells mit Methotrexat).

Anti-K11 hat demnach mit großer Wahrscheinlichkeit einen Inhibitionseffekt auf die Erythropoese. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mit letzter Sicherheit bewiesen werden, da der Effekt im Vergleich zwischen den höheren Verdünnungen des Anti-K11-Plasmas und des aufgereinigten Anti-K11-IgGs (1:5 und 1:10) nicht immer signifikant war. Auch der Vergleich der 1:5-Verdünnung des aufgereinigten Anti-K11-IgGs mit den



entsprechenden nativen Wells hinsichtlich der BFU-E-Zahlen pro Well zeigte keinen signifikanten Einfluss des aufgereinigten Anti-K11-IgGs auf die Erythropoese. Ob die Ursache dafür in einer durch die Aufreinigung des IgG aus den verschiedenen Plasmen verminderten Anti-K11-IgG-Konzentration liegt, bleibt unklar. Ein stimulierender Effekt des Anti-K11-IgG kann mit Sicherheit ausgeschlossen werden, da kein Versuch eine signifikante Erhöhung des Zellwachstums nach Behandlung der Stammzellkultur mit diesem Antikörper ergab. Entgegen der Schlussfolgerung von Kelley et al. 1998 (23) hat K11 offenbar doch transfusionsmedizinische Relevanz. K11-exprimierende Erythrozyten sollten demnach nicht in Patienten mit Seropositivität für Anti-K11 transfundiert werden.

## 6. Ausblick

Auch wenn die Fragestellung nicht eindeutig beantwortet werden konnte, so liefert diese Arbeit doch Anhaltspunkte für die weitere Erforschung der Hämatopoese und ihrer Wechselwirkung mit verschiedenen Antikörpern. Möglicherweise gibt es Unterschiede in der Ausprägung der Einflüsse verschiedener Antikörper auf die Hämatopoese. Die Etablierung der Immunlumineszenzbasierten Messung der Proliferationsrate könnte der Grundstein weiterer, vielleicht effektiverer Untersuchungen zu diesem Thema sein. Mit dem HALO-Test lassen sich deutlich mehr Proben in kürzerer Zeit analysieren. Dies erhöht i.d.R. die Reproduzierbarkeit der Analysen. Auch die praktisch lineare Korrelation zwischen Lumineszenz und initial angesetzter Zellzahl spricht für die Reliabilität und Validität, aber auch die Sensitivität des Tests. Die Spezifität für hämatopoetische Stammzellen fehlt. Dennoch ist der HALO-Test ein potentiell sehr guter Kandidat für den Einsatz in der klinischen Forschung und auch der Routine, für die allerdings bisher die Zulassung des Tests fehlt. Wahrscheinlich wird in naher Zukunft der semisolid Assay die klinische Standardmethode bleiben. Langfristig könnte sich der HALO-Test jedoch auch hier durchsetzen.

Schließlich ist der Anti-K11-Antikörper auch nur ein Representant der Anti-Kell-Antikörper, welche ebenfalls nur einen Teil antierythrozytärer Antikörper darstellen. Außerdem wird das Kell-Antigen auch auf der Oberfläche anderer hämatopoetischer Progenitoren gefunden. (49). Andere Autoren entdeckten Kell-Antigene auch auf den Membranen von Mikrogliazellen. Dies könnte in etwas fernerer Zukunft möglicherweise Immuntherapeutische Optionen, z. B. bei myeloischen Leukämien oder Hirntumoren, eröffnen.

## 8. Zusammenfassung

Die Arbeit befasst sich mit der Fragestellung, ob der Antierythrozytäre Alloantikörper K11 die Erythropoese beeinflussen kann. Zunächst musste ein reproduzierbares Zellkulturmodell für hämatopoetische Stammzellen erstellt werden, welches zudem möglichst viele Messpunkte gleichzeitig abdecken sollte. Hierzu wurde die im Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Bonn übliche Technik des semisolid Assays von der 35-mm-Petrischalen-Technik auf eine 24-Well-Plattentechnik übertragen. Dies funktionierte reibungslos und lieferte für die unbehandelte Zellkultur eine mittlere BFU-E-Zahl von 170-300.

Vergleichende Untersuchungen zeigten, dass die Behandlung der Zellkulturen mit Normal-IgG, Normalserum, Normalplasma und heparinisiertem Plasma keinen sicheren signifikanten Unterschied der BFU-E-Zahlen zu den Nativkulturen ergab.

Die Bearbeitung der Kulturen mit Anti-K11-haltigen Substanzen ergab hingegen meist signifikant niedrigere BFU-E-Zahlen pro Well als die Bearbeitung mit anderen Substanzen oder die Belassung der nativen Kultur. Das Zytoreduktivum Methotrexat wies immer einen signifikanten Inhibitionseffekt der Erythropoese auf, wobei die BFU-E-Zahlen unter Anti-K11-Anwendung oft mit denen unter Methotrexat vergleichbar waren. Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass Anti-K11 mit hoher Wahrscheinlichkeit einen signifikanten Hemmeffekt auf die Erythropoese hat. Die Tatsache, dass ein MHN auf Grund einer K11-Inkompatibilität zwischen Mutter und Neugeborenem auftrat, sollte dazu veranlassen, den K11-Status bei Transfusionsmedizinischen Therapiemaßnahmen zu berücksichtigen.

Schließlich erfolgte noch die Etablierung des HALO-Tests, der die gleichzeitige Analyse einer deutlich größeren Zahl von Proben ermöglicht. Dabei wurde zunächst eine Eichkurve erstellt, die den Zusammenhang zwischen ATP-Konzentration und Lumineszenzintensität aufzeigte. An Hand einer Standardreihe von ATP-Konzentrationen von 3 Messpunkten wurde die Lumineszenz bestimmt und gegen die ATP-Konzentration in einem Diagramm eingezeichnet. Es resultierte annähernd eine Gerade. Der gleiche Test wurde mit einer Standard-Verdünnungsreihe von Aphereseblut durchgeführt.

## 7. Literaturverzeichnis:

1. Attaelmannan M, Livinson SS. Understanding and identifying monoclonal gammopathies. *ClinChem* 2000; 46: 1230-1238
2. Baciú I. Die humorale und nervöse Regulation der Erythropoese. *J Molec Med* 1970; 48: 133-143
3. Barrande C, Traore Y, Szekeres G, Hirn J. Isolation and characterization of two new mab's against the CD34-molecule. *Hybridoma* 1993; 12: 203-213
4. Bauer C. Blut: Ein flüssiges Organsystem. In: Klinke R, Silbernagel S, Hrsg. *Lehrbuch der Physiologie*. Stuttgart: Thieme, 2000: 186-210
5. Bender JG, Unverzagt K, Walker DE, Lee W, Smith S, Williams S, Van Epps DE. Phenotypic analysis and characterization of CD34<sup>+</sup> cells from normal human bone marrow, cord blood, peripheral blood and mobilized peripheral blood from patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 70: 10-18
6. Bohmer RM, Johnson KL, Bianchi DW. Differential effects of interleukin-3 on fetal and adult erythroid cells in culture: Implications for the isolation of fetal cells from maternal blood. *Prenat Diagn* 2000; 20: 640-647
7. Bony V, Gane P, Bailly P, Cartron JP. Time-Course expression of polypeptides carrying blood group antigens during human erythroid differentiation. *Br J Hematol* 1999; 107: 263-274
8. Bullock TE, Wen B, Marley SB, Gordon MY. Potential of CD34 in the regulation of symmetrical and asymmetrical division by hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells* 2007; 25: 844-851
9. Casadevall N, Croisille L. Erythropoiesis disorders and other central autoimmune anemias. *Rev Prat* 2001; 51: 1547-1551
10. Chen L, Zhang H, Shi Y, Chin KL, Tang DC, Rodgers GP. Identification of key genes responsible for cytokine-induced erythroid and myeloid differentiation and switching of hematopoietic stem cells by RAGE. *Cell Res* 2006; 16: 923-939
11. Cherif-Zahar B, Le Van Kim C, Rouillac C, Raynal V, Cartron JP, Colin Y. Organization of the gene (RHCE) encoding the human blood group RhCcEe antigens and characterization of the promoter region. *Genomics* 1994; 19: 68-74

12. Claperon A, Rose C, Gane P, Collec E, Bertrand O, Ouimet T. The Kell protein of the common K2 phenotype is a catalytically active metalloprotease, whereas the rare Kell K1 antigen is inactive. Identification of novel substrates for the Kell protein. *J Biol Chem* 2005; 280: 21272-21283
13. Croisille L, Tchernia G, Casadevall N. Autoimmune disorders of erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 2001; 8: 68-73
14. Dhodapkar KM, Blei F. Treatment of hemolytic disease of the newborn caused by anti-Kell antibody with recombinant erythropoietin. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001; 23: 69-70
15. Hauke G, Fauser AA, Weber S, Maas D. Reticulocytopenia in severe Autoimmune hemolytic anemia(AIHA) of the warm antibody type. *Blood* 1983; 46: 321-327
16. Hehlmann R. Hämatologie. In: Zöllner N, Gresser U, Hehlmann R, Hrsg. *Innere Medizin*. Berlin, Heidelberg, London, New York, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest: Axel Springer, 1991: 274-292
17. Heimpel H, Schubothe H. Die Lokalisation des Erythrozytenabbaus bei Autoimmunhämolytischen Anämien. Untersuchungen mit Cr51. *Ann Hematol* 1964; 10: 306-318
18. Jelkmann W, Gulbins E, Lang KS. In: Schmidt RF, Lang F, Thews G, Hrsg. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Heidelberg-New York: Springer, 1994: 510-550
19. Jones J, Reid MG, Oven R, Harris T, Moscarelli S, Co S, Leger R, Beal C, Cardillo K. A novel common kell antigen, TOU, and its spatial relationship to other kell antigens. *Vox Sang* 1995; 69: 53-60
20. Jung HH, Hergersberg M, Vogt M, Pahnke J, Treyer V, Rothlisberger B, Kollias SS, Russo D, Frey BM. McLeod phenotype associated with a XK missense mutation without hematologic, neuromuscular, or cerebral involvement. *Transfusion* 2003; 43:928-938.
21. Junqueira LCU, Carneiro J, Gratzl M, Hrsg. *Histologie*. Berlin-Heidelberg: Springer, 2005: 207-220
22. Karlson P, Doenecke D, Koolman J, Hrsg. *Kurzes Lehrbuch der Biochemie und Pathobiochemie*. Stuttgart: Georg Thieme, 2005: 24-40.
23. Kelley CM, Karwal MW, Schlueter AJ, Olson JD. Outcome of Transfusion of K:11 Erythrocytes in a patient with Anti-K11 Antibody. *Vox Sang* 1998; 74: 205-208

24. Kie JH, Jung YJ, Woo SY, Ryu KH, Park HY, Chung WS, Seoh JY. Ultrastructural and phenotypic analysis of in vitro erythropoiesis from human cord blood CD34<sup>+</sup> cells. *Ann Hematol* 2003; 82: 278-283
25. Konstanecki K. Die embryonale Leber in ihren Beziehungen zur Blutbildung. *Anat* 1892; 1: 301-322
26. Kühn LC, Kraehenbuhl JP. Monoclonal Antibodies Recognizing the secreted and membrane domains of the IgA-Dimerreceptor. *Ann N Y Acad Sci* 1983; 409: 751-759
27. Kuroda H, Matsunaga T, Iyama S, Takimoto R, Shirao S, Kida M, Watanabe H, Konuma Y, Hirayama Y, Kohda K, Niitsu Y. De novo CD5<sup>+</sup> diffuse Large Bcell lymphoma associated with AIHA presenting as erythroid hypoplasia. *Rinshu Ketsueki* 2006; 47: 633-638
28. Lee S, Debnath AK, Wu X, Scofield T, George T, Kakaiya R, Yaqore MG 3<sup>rd</sup>, Sausais L, Yacob M, Lomas-Francis C, Reid ME. Molecular basis of two novel high prevalence antigens in the Kell blood group system, KALT and KTIM. *Transfusion* 2006; 46: 1323-1327
29. Lippert HD, Flegel WA, Hrsg. Kommentar zum Transfusionsgesetz (TFG) und den Hämotherapierichtlinien. Berlin: Springer, 2002.
30. Madea B, Dettmeyer R. Hämogenetik. In: Madea B, Dettmeyer R, Hrsg. Basiswissen Rechtsmedizin. Berlin-Heidelberg: Springer, 2007: 247-261
31. Mitjavila MT, Natazawa M, Briqnaschi P, Debili N, Breton- Gorius J, Vainchenker W. Effects of fine recombinant hematopoietic growth factors on enriched human erythroid progenitors in serum replaced cultures. *J Cell Physiol* 1989; 138: 617-623
32. Müller TH, Hallensleben M, Schunter F, Blasczyk R. Molekulargenetische Blutgruppendiagnostik: Grundlagen und klinische Anwendungen. *Dtsch Ärztebl* 2001; 98: A-317/B-253/C-241
33. Noizat-Pirenne F, Tournamille C, Bierling P, Roudot-Thoraval F, Le Pennec PY, Rouger P, Ansart-Pirenne H. Relative immunogenicity of Fya and K antigens in a Caucasian population, based on HLA class II restriction analysis. *Transfusion*. 2006; 46: 1328-1333.
34. Okada S, Mivoshi Y, Takizawa Y, Hagiwara S, Mori H, Niikura H, Terada H, Watanabe H, Mitsuya T, Saqawa F. Fulminant AIHA with multiple organ failure. *Rinshu Ketsueki* 1989; 30: 1892-1897

35. Poole J, Warke N, Hustinx H, Taleqhani BM, Martin P, Finning K, Crew VK, Green C, Bromilow I, Daniels G. A KEL gene encoding serine at position 193 of the Kell glycoprotein results in expression of KEL 1 antigen. *Transfusion* 2006; 46: 1879-1885
36. Prager M. Molecular genetic blood group typing by the use of PCR-SSP technique. *Transfusion* 2007; 47: 54-59
37. Quartier P, Floch C, Meier F, Fruchant MF, Brossard Y, Lejeune C. Massive fetomaternal hemorrhage and prevention of fetomaternal Rhesus incompatibility. The failure of our present system of prevention. *JGynaecol Obstet Reprod* 1993; 22: 517-519
38. Redman CM, Russo D, Lee S. Kell, Kx and the McLeod syndrome. *Baillieres Best Pract Res Clin Hematol* 1999; 12: 621-635
39. Reimann F, Strancali S. Kritische und methodische Bemerkungen zur Bestimmung der Größe der Erythrozyten. *Ann Hematol* 1960; 6: 151-172
40. Renoud KJ, Barracchini K, Byrne KM, Adams S, Pickett A, Caraccio L, Stroncek DF. KEL 6 and KEL 7 genotyping with sequence specific primers. *Transfusion* 2006; 46: 1510-1514
41. Satherwaite AB, Benson R, Tenan DG. Regulation of the gene for CD34, a human hematopoietic stem cell antigen in KG-1 cells. *Blood* 1990; 15: 2299-2304
42. Schiebler TH, Hrsg. *Anatomie*. Heidelberg- New York: Springer, 2005: 123-152
43. Sieff CA, Nathan DG, Clark SC. The anatomy and physiology of hematopoiesis. In: Orkin SH, Nathan DG, Eds. *Hematology of infancy and childhood*. Philadelphia: Saunders, 1998: 161-236
44. Southcott MJ, Tanner MJ, Anstee DJ. The expression of human blood group antigens during erythropoiesis in a cell culture system. *Blood* 1999; 15: 4425-4435
45. Stutte HJ, Ezumi K. Die Rolle der Milz bei hämolytischen Erkrankungen. *Ann Hematol* 1969; 19: 99-113
46. Sundermann A, Meister H, Mey U. Untersuchungen zur Bedeutung der Milz im immunologischen Geschehen. *Ann Hematol* 1969; 19: 544-558
47. Universität Würzburg. 2007: Blutgruppen. <http://www.klinik.uni-wuerzburg.de/deutsch/einrichtungen/kliniken/AbteilungfürTransfusionsmedizinundImmunhämatologieHämotherapie/Studenten/Hauptvorlesung/BlutgruppenErythrozytenIII/KSystem/content.html> (02.10.2007)

48. Vierbucher M, Larena A, Schroder S, Hanisch FG, Ortmann M, Larena A, Uhlenbruck G, Fischer R. Blood group antigen expression in medullary carcinoma of the thyroid. An immunohistochemical study of the occurrence of type 1 chain-derived antigens. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1992; 62: 79-88
49. Wagner T, Lanzer G, Geissler K. Kell expression on myeloid progenitor cells. *Leuk Lymphoma* 2002; 43: 479-485
50. Wagner T, Resch B, Reiterer F, Gassner C, Lanzer G. Pancytopenia due to suppressed hematopoiesis in a case of fatal hemolytic disease of the newborn associated with anti-K supported by molecular K1-typing. *JPediatr HematolOncol* 2004; 26: 13-15.
51. Waschke KF, Frietsch T, Hrsg. *Minisymposium Anästhesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie.*, New York-Stuttgart: Thieme, 2000: 767-770
52. Win N, Amess P, Need SM, Hewitt HPE. Use of cells preserved in extended storage media for exchange transfusion in anti-k hemolytic disease of the newborn. *Transfus Med* 2005; 15: 157-160



## 9. Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. B. Poetzsch für die Überlassung dieses interessanten Themas, die kontinuierliche Betreuung und die überaus hilfreichen Anregungen, die zur Fortführung der Arbeit und Fertigstellung der Dissertationsschrift entscheidend beigetragen haben. Außerdem danke ich ihm für die Übernahme der Erstkorrektur.

Dank gebührt auch den Mitarbeitern/-innen des Gerinnungslabors am Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin für die freundliche Mitarbeit und die stete Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei allen labor- und materialtechnischen Fragen. Namentlich möchte ich hier Frau Irina Guschakowski erwähnen, die mir, auch unter größtem Zeitdruck, immer kompetent und zuvorkommend zur Seite stand und mich in den Zellkultur- und Labortechniken im Zusammenhang mit meiner Arbeit beraten hat.

Des Weiteren danke ich Frau Kobus und ihren Mitarbeitern im Serologischen Labor des Instituts für die freundliche Einweisung in die Techniken des Antikörpernachweises und für die Aufreinigung der Antikörper aus dem Anti-K11- und Normalplasma.

Für die Überlassung und Lagerung dieses Materials danke ich Herrn Dr. J. Hoch und Herrn Peter Hambitzer.

Ich bedanke mich weiterhin bei Frau Dr. Lütjens, die inzwischen nicht mehr am Institut tätig ist, und Herrn Jens Müller, die wertvolle Stunden ihrer Zeit opferten, um mir die Technik der Durchflusszytometrie nahe zu bringen. Herrn Jens Müller danke ich auch für die Einweisung in die Technik der Luminometrie. Für die Überlassung der klinischen Angaben über die Patientin, deren Anti-K11-Plasma verwendet wurde, danke ich Frau Dr. Sabine Flommersfeld. Außerdem danke ich allen genannten und nicht genannten für das immer gute und freundliche Arbeitsklima, welches dem Spaß an der Arbeit sehr förderlich war.

Der größte Dank allerdings gebührt meinen Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglichten und somit den Grundstein auch dieser Arbeit legten. Ihnen habe ich diese Arbeit gewidmet.