

Aus dem Institut für Klinische und Experimentelle  
Transfusionsmedizin (IKET)  
der Universitätsklinik Tübingen  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. Northoff

Expression von Blutgruppenantigenen durch humane  
mesenchymale Stammzellen

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Michael Christian Schüle

aus

Freudenstadt

2013

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. H. Northoff

2. Berichterstatter:

Professor Dr. H. P. Wendel



---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
1.1	„Mesenchymale Stammzellen“	4
1.1.1	Allgemeines	4
1.1.2	Immunphänotypische Charakterisierung	5
1.1.3	Differenzierungspotential	8
1.1.4	Immunologische Eigenschaften	9
1.1.5	Klinische Anwendung	11
1.2	Blutgruppensysteme	13
1.2.1	Allgemeines	13
1.2.2	Die Blutgruppensysteme ABO und Hh	15
1.2.3	Die Blutgruppensysteme Rhesus und RhAG	18
1.2.4	Das Blutgruppensystem Kell	19
1.2.5	Das Blutgruppensystem Duffy	20
1.2.6	Das Blutgruppensystem Kidd	21
1.3	Transplantationsimmunologie	22
1.3.1	Grundlagen	22
1.3.2	Die Antikörper-vermittelte Transplantatabstoßung und die Rolle der Blutgruppen bei Transplantationen	23
1.4	Ziele dieser Arbeit	24
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>26</b>
2.1	Geräte	26
2.2	Verbrauchsmaterialien	27
2.3	Kontrollzellen, Chemikalien, Reagenzien	28
2.4	Kits	32
2.5	Stammlösungen	33
2.6	Antikörper	33
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>35</b>

---

3.1	Zellbiologische Methoden.....	35
3.1.1	Isolation und Zellkultur der MSC .....	35
3.1.2	Einfrieren und Auftauen der MSC.....	36
3.1.3	Zellzahlbestimmung .....	37
3.1.4	Isolation von Monozyten des peripheren Blutes (PBMNC).....	37
3.2	Blutgruppenbestimmung der MSC Spender (serologisch) .....	38
3.3	Genomische PCR der MSC .....	39
3.3.1	DNA-Extraktion.....	39
3.3.2	Genomische PCR.....	39
3.4	RT-PCR.....	41
3.4.1	RNA-Extraktion und reverse Transkription .....	41
3.4.2	Qualitative RT-PCR.....	42
3.5	Durchflusszytometrie.....	43
3.6	FACS-Analyse von Erythrozyten .....	45
3.7	FACS-Analyse von MSC .....	51
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>55</b>
4.1	Serologische Blutgruppenbestimmung der MSC Spender .....	55
4.2	Genomische PCR der MSC .....	56
4.3	RT-PCR der MSC.....	59
4.4	Etablierung der FACS-Analyse von Erythrozyten.....	62
4.5	FACS-Analyse von MSC .....	72
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>78</b>
5.1	Etablierung der FACS-Analyse von Erythrozyten.....	79
5.2	Blutgruppenstatus der MSC .....	80
5.2.1	Die Blutgruppensysteme Rhesus und RhAG .....	81
5.2.2	Das Blutgruppensystem Kell .....	82
5.2.3	Das Blutgruppensystem Duffy.....	82

---

5.2.4	Das Blutgruppensystem Kidd .....	83
5.2.5	Die Blutgruppensysteme ABO und Hh .....	84
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil .....</b>	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>88</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>104</b>
9.1	Abbildungsverzeichnis.....	104
9.2	Tabellenverzeichnis.....	105
9.3	Abkürzungen .....	106
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>110</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 „Mesenchymale Stammzellen“

### 1.1.1 Allgemeines

Stammzellen sind definiert über ihre Fähigkeit sich durch asymmetrische Zellteilungen sowohl selbst zu erneuern, als auch Tochterzellen hervorzubringen, die sich in Zellen multipler Gewebetypen differenzieren. Sie werden nach ihrem ontogenetischen Alter unterteilt in embryonale, fötale, neonatale und adulte Stammzellen. Embryonale Stammzellen haben die Fähigkeit sich in Zellen jedes Gewebetyps zu differenzieren (Pluripotenz), während das Differenzierungspotential adulter Stammzellen im Allgemeinen als auf Gewebe eines Keimblattes beschränkt angesehen wird (Multipotenz) <sup>1</sup>. Progenitorzellen haben nur ein limitiertes Potential zur Selbsterneuerung und sind auch in der Differenzierungskapazität stärker eingeschränkt als Stammzellen <sup>2</sup>. Das Knochenmark enthält neben hämatopoetischen Stammzellen (HSC) und endothelialen Progenitorzellen (EPC) auch Zellen, die die Fähigkeit besitzen, sich in reife Zellen multipler mesenchymaler Gewebe wie Fett, Knochen und Knorpel zu differenzieren. Letztere Zellen sind Gegenstand dieser Arbeit.

Friedenstein et al. <sup>3</sup> berichteten als erste über osteogene Vorläuferzellen, die aus Knochenmark über die Adhärenz an Plastik gewonnen wurden. Das Konzept einer mesenchymalen Stammzelle (MSC) wurde von Caplan et al. <sup>4</sup> eingeführt. Bislang fehlt jedoch der Nachweis, dass es sich bei MSC um Stammzellen im Sinne von Zellen handelt, die die Fähigkeit haben, sich in vivo unbegrenzt selbst zu regenerieren. Auch konnte im Gegensatz zu den hämatopoetischen Stammzellen noch nicht gezeigt werden, dass eine einzelne mesenchymale Stammzelle in der Lage ist, ein ganzes Gewebekompartiment zu regenerieren <sup>5</sup>. Deshalb führte die International Society for Cellular Therapy (ISCT) 2005 die Bezeichnung „multipotent mesenchymal stromal cell“ ein <sup>6</sup> und trug damit gleichzeitig der Tatsache Rechnung, dass es sich bei den als MSC

bezeichneten Zellen um eine stark heterogene Gruppe von Zellpopulationen mit unterschiedlichem Differenzierungspotential und Expression von Oberflächenmarkern handelt <sup>7</sup>. Dennoch stimmen die unter dem Begriff MSC zusammengefassten Subpopulationen in vielen Eigenschaften überein. Zur Definition von MSC schlug die ISCT folgende drei Mindestkriterien vor: 1. MSC müssen unter Standardkulturbedingungen an Plastik adhärent sein. 2. Sie müssen die Oberflächenmarker CD105, CD73 und CD90 exprimieren und sollen CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79a oder CD19 und HLA II nicht exprimieren. 3. Sie müssen sich desweiteren in vitro in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten differenzieren lassen <sup>8</sup>.

Außer in Knochenmark finden sich MSC im Bindegewebe vieler Organe und Körperflüssigkeiten. MSC und MSC-artige Zellen konnten aus Skelettmuskel <sup>9</sup>, Fettgewebe <sup>10</sup>, Synovia <sup>11</sup>, Blut <sup>12</sup>, Fruchtwasser <sup>13</sup> sowie aus fetalem Blut, Leber, Knochenmark und Lunge <sup>14-15</sup> isoliert werden. Die Frequenz von MSC beträgt circa 0,001% - 0,01% der mononukleären Zellen, die aus dem Knochenmark isoliert werden können. Sie lassen sich aber unter geeigneten Kulturbedingungen schnell in vitro expandieren und nehmen dabei spindelförmige Gestalt an <sup>16</sup>. MSC haben eine hohe genetische Stabilität, so zeigen sie in Kultur nach 70 Zellteilungen noch keine Telomerverkürzungen <sup>17</sup>.

### 1.1.2 Immunphänotypische Charakterisierung

Unter den genannten Oberflächenmarkern waren CD105 (Endoglin) <sup>18</sup> und CD73 (Ekto-5'Nukleotidase) <sup>19</sup> die ersten, die verwendet wurden um MSC zu charakterisieren. Diese Marker werden jedoch auch von hämatopoetischen Zellen und Endothelzellen exprimiert <sup>7</sup>. Inzwischen wird zur genaueren Identifikation eine Reihe weiterer auf MSC exprimierter Marker verwendet, darunter Adhäsionsmoleküle wie CD44, CD56, CD106, CD166, Wachstumsfaktoren und Zytokinrezeptoren wie CD71, CD140a und CD140b, die Membran-Metallo-Endopeptidase CD10, Integrine wie CD29, CD59 ein Regulator der Komplementkaskade, das Thy-1 Glykoprotein (CD90), CD130, die  $\beta$ -Kette des IL-6-Rezeptors, das Mucin MUC18 (CD146) sowie HLA I <sup>20-21</sup>.

Das Gangliosid GD2 nimmt als Marker, der unter den Knochenmarkzellen ausschließlich von MSC exprimiert wird, eine Sonderrolle ein <sup>22</sup>. Zusätzlich werden MSC zur Immunphänotypisierung auf Marker hin untersucht, die sie nicht exprimieren, wie Rezeptoren der hämatopoetischen Linie CD14, CD34, CD45, CD133, außerdem das Lewis X-Antigen (CD15, SSEA-1) <sup>23</sup>, Sialophorin (CD43), das CD93-Molekül, die Tyrosinkinase CD117, der ABC-Transporter CD243 und HLA II <sup>20-21</sup>, um die Marker zu nennen, die zur Testung der in dieser Arbeit verwendeten Zellen dienten. Einige neue Marker wurden beschrieben, die Subpopulationen von MSC charakterisieren: CD271, CD49a, W7C5 - ein Epitop auf CD109, W8B2, C15, CDCP1, CD340, CD349, SSEA-4 <sup>7, 24-26</sup>. Tabelle 1 gibt einen Überblick über den Immunphänotyp von MSC.

Rezeptoren der hämatopoetischen Linie			Wachstumsfaktoren und Zytokine		
CD1a	T6	Neg	CD114	Granulocyte-colony stimulating factor receptor	Neg
<b>CD14</b>	<b>Lipopolysaccharide receptor</b>	<b>Neg</b>	<b>CD117</b>	<b>Stem cell factor receptor</b>	<b>Neg</b>
<b>CD34</b>		<b>Neg</b>	CDw119	Interferon $\gamma$ R	Pos
<b>CD45</b>	<b>Leukocyte common antigen</b>	<b>Neg</b>	CD120 a & b	Tumor Necrosis factor-a 1&2R	Pos
<b>CD133</b>	<b>AC133</b>	<b>Neg</b>	CD121 a & b	Interleukin-1R a&b chain	Pos
			CD123	Interleukin-3R	Pos
Adhäsionsmoleküle			CD124	Interleukin-4R	Pos
<b>CD44</b>	<b>Hyaluronate receptor</b>	<b>Pos</b>	CD127	Interleukin-7R	Pos
CD50	Intercellular adhesion molecule 3	Pos	<b>CD130</b>	<b>IL-6 signal transducer</b>	<b>Pos</b>
CD54	Intercellular adhesion molecule 1	Pos	<b>CD140 a&amp;b</b>	<b>Platelet derived growth factor receptor</b>	<b>Pos</b>
<b>CD56</b>	<b>Neural cell adhesion molecule</b>	<b>Pos</b>	FGFR	Fibroblast growth factor receptor	Pos
CD58	Lymphocyte function-associated antigen 3	Pos	<b>CD271</b>	<b>Low affinity nerve growth factor receptor</b>	<b>Pos</b>
CD62E	E-selectin	Neg			
			Andere Marker		
CD62L	L-selectin	Pos	CD3	CD3 complex	Neg
			CD9	Tetraspannin	Pos
CD62P	P-selectin	Neg	<b>CD10</b>	Membrane Metallo-Endopeptidase	<b>Pos</b>
CD102	intercellular adhesion molecule 2	Pos	CD13	Aminopeptidase N	Pos
CD106	Vascular cell adhesion molecule-1	Pos	<b>CD15</b>	<b>LewisX, SSEA-1</b>	<b>Neg</b>
CD144	Calherin 5	Neg	CD19	B-lymphocyte Surface Antigen B4	Neg
<b>CD166</b>	<b>Activated leukocyte cell adhesion molecule</b>	<b>Pos</b>	<b>CD43</b>	<b>Sialophorin</b>	<b>Neg</b>
			<b>CD59</b>	<b>complement regulatory protein</b>	<b>Pos</b>

<b>Integrine</b>			<b>CD73</b>	<b>Ecto-5'-nucleotidase</b>	<b>Pos</b>
CD11a	Lymphocyte function-associated antigen-1 $\alpha$	Neg	CD80	B7-1	Neg
CD11b	Macrophage-1 antigen	Neg	CD83	HB15a	Neg
CD11c	Complement receptor type 4 $\alpha$ chain	Neg	CD86	B7-2	Neg
CD18	Lymphocyte function-associated antigen-1 $\beta$	Neg	<b>CD90</b>	<b>Thy-1 glycoprotein</b>	<b>Pos</b>
<b>CD29</b>	<b>Very late antigen <math>\beta</math></b>	<b>Pos</b>	<b>CD93</b>	<b>CD93 antigen</b>	<b>Neg</b>
CD49a -c	Very late antigen $\alpha$ 1-3	Pos	<b>CD105</b>	<b>Endoglin</b>	<b>Pos</b>
CD49d	Very late antigen $\alpha$ 4	Neg	<b>CD146</b>	<b>MUC18, Mel-CAM, S-endo</b>	<b>Pos</b>
CD49e-f	Very late antigen $\alpha$ 5-6	Pos	CD157	BP-3 or Bone Marrow Stromal cell antigen-1	Pos
CD51	Vitronectin R $\alpha$ chain	Neg	CD243	ABC Transporter	Neg
CD61	Vitronectin R $\beta$ chain	Pos		STRO-1	Pos
CD104	$\beta_4$ integrin	Pos		<b>HLA-R,P,Q (II)</b>	<b>Neg</b>
				SSEA-3,4	Pos
<b>Wachstumsfaktoren und Zytokine</b>				<b>Neural ganglioside GD2</b>	<b>Pos</b>
CD25	Interleukin-2R	Neg			
<b>CD71</b>	<b>Transferrin receptor</b>	<b>Pos</b>			

**Tabelle 1: Phänotyp humaner MSC modifiziert nach Deans et al. und Pountos et al.** <sup>20,21</sup>

Fett hervorgehoben sind die Marker die zur Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten MSC dienen.

### 1.1.3 Differenzierungspotential

Neben ihrer Potenz, sich in Zellen mesenchymaler Gewebe inklusive Muskel <sup>27</sup> - und Herzmuskelzellen <sup>28</sup> zu differenzieren, wird gegenwärtig auch eine Differenzierung von MSC über die Keimblattgrenzen hinweg (Transdifferenzierung) in Epithelzellen, Abkömmlinge des Neuroektoderms <sup>7</sup> und Endoderms <sup>29</sup> diskutiert. In Tiermodellen wurde gezeigt, dass MSC unter

bestimmten Bedingungen in verschiedene Gewebe einwandern und nach einer Zeit morphologische und phänotypische Charakteristika von Astrozyten und Neuronen <sup>30</sup>, retinalem Pigmentepithel <sup>31</sup>, Plattenepithel der Haut <sup>32</sup> oder tubulärem Nierenepithel <sup>33</sup> zeigen. Es bleibt jedoch umstritten und muss sich für den Einzelfall noch bestätigen, ob die beobachteten Charakteristika wirklich im Sinne einer Transdifferenzierung von echten Stammzellen oder einer MSC-Subpopulation zu deuten sind <sup>7</sup>.

#### 1.1.4 Immunologische Eigenschaften

In ihrer Funktion als Zellen, die das Stroma des Knochenmarks bilden, exprimieren MSC Adhäsionsmoleküle und Zytokine, die die Blutbildung regulieren <sup>34</sup>. Werden MSC mit HSC kotransplantiert, so findet ein verbessertes engraftment der HSC statt, was In't Anker et al. <sup>35</sup> als erste an NOD/SCID-Mäusen beobachteten. Ball et al. <sup>36</sup> fanden in einer Studie mit 14 haploidentisch HSC- und MSC-transplantierten Kindern eine beschleunigte Erholung der Lymphozyten und ein reduziertes Transplantatversagen gegenüber historischen HSCT-Kontrollen ohne MSC-Kotransplantation.

In einer Vielzahl von in vitro Studien zeigten MSC immunmodulatorische Eigenschaften. Die von MSC exprimierten Adhäsionsmoleküle CD102, CD106, und CD58 sind essentielle Moleküle für die Interaktion mit T-Lymphozyten <sup>20</sup>. Humane und murine MSC supprimieren in vitro die Proliferation von T-Lymphozyten, die von Alloantigenen oder Mitogenen aktiviert wurden <sup>37-38</sup> und hemmen über Cyclin D2-Inhibition die Zellteilung <sup>39</sup>. Die Proliferation von aktivierten B-Lymphozyten <sup>40</sup> sowie die Differenzierung und Reifung von Dendritischen Zellen <sup>41</sup> wird in der Anwesenheit von MSC über lösliche Faktoren inhibiert. MSC beeinflussen die Sekretion von Zytokinen durch Dendritische Zellen, Th1-, Th2-Lymphozyten und NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) in Ko-Kultur hin zu einem antiinflammatorischen Profil und sezernieren selbst PGE2, ein Zytokin, das möglicherweise in den MSC-vermittelten Wechsel von einer Th1- zu einer Th2-Immunantwort involviert ist <sup>42</sup>.

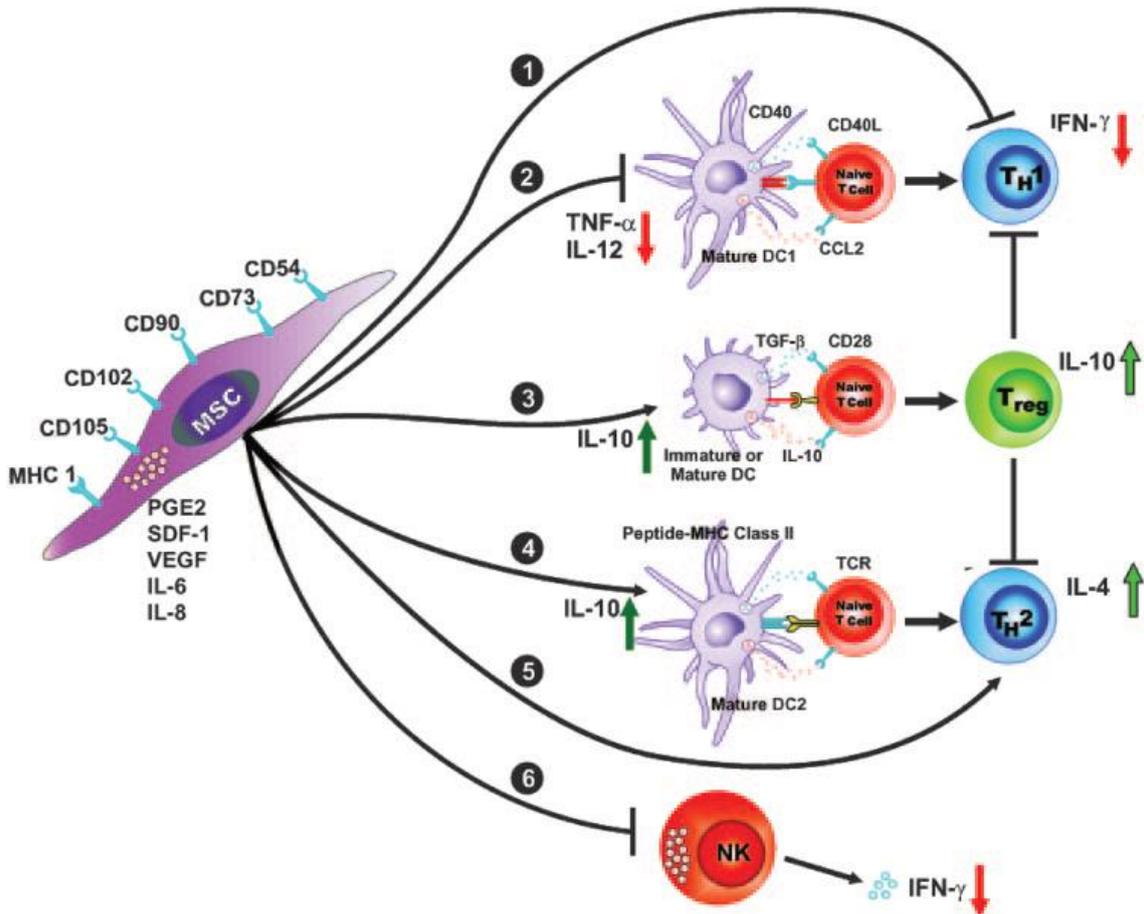


Abbildung 1: Wirkungen von MSC auf immunologische Zellen

(1) Inhibition der IFN- $\gamma$  Sekretion von Th1-Zellen bei gleichzeitig gesteigerter IL-4 Sekretion von (4) Th2-Zellen (Wechsel Th1  $\rightarrow$  Th2). (2) Inhibition der TNF- $\alpha$  und IL-12 Sekretion reifer Dendritischer Zellen. (3) Steigerung der IL-10 Sekretion beeinflusst Reifung und Funktion von Dendritischen Zellen mit folglich Vermehrung der T<sub>reg</sub>-Lymphozyten. (6) Inhibition der IFN- $\gamma$  Sekretion durch NK-Zellen. CCL (chemokine ligand), TCR (T-cell receptor), TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ), SDF-1 (stromal derived factor 1), VEGF (vascular endothelial growth factor) nach Aggarwal et al. <sup>42</sup>

Eine weitere Rolle wird der Indolamin 2,3-Dioxygenase zugeschrieben, die den Abbau von Tryptophan in Kynurenin katalysiert und in MSC im Milieu proinflammatorischer Zytokine induziert wird. Der resultierende verstärkte Abbau von Tryptophan wurde als Ursache einer Proliferationshemmung von T-Lymphozyten <sup>43</sup>, NK-Zellen <sup>44</sup> und aktivierten B-Zellen <sup>45</sup> beschrieben. Auch Stickstoffmonoxid (NO) soll, von T-Lymphozyten in MSC induziert, die Proliferation von T- und B-Lymphozyten hemmen <sup>46</sup>.

Die Expressionsdichte von HLA I (human leukocyte antigen) auf der Oberfläche von MSC ist gering, was sie gegenüber NK-Zell-vermittelter Lyse empfindlicher

macht <sup>47</sup>. HLA II wird von unstimulierten MSC nicht an der Zelloberfläche exprimiert, ist aber in Zell-Lysaten mittels Western Blot nachweisbar und wird nach 1-2 Tagen Inkubation mit IFN- $\gamma$  auch auf der Zelloberfläche von MSC gefunden. Nach Differenzierung von MSC in Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten in vitro wird HLA I weiterhin exprimiert, allerdings kann die Expression von HLA II nicht mehr induziert werden <sup>48</sup>. Kostimulatorische Moleküle wie CD86, CD40 oder CD40L konnten auf MSC nicht detektiert werden <sup>49</sup>. Diese Beobachtungen in vitro könnten suggerieren, dass MSC wenig immunogen sind. Die Zahl der in vivo-Untersuchungen an Tier und Mensch mit HLA-inkompatiblen MSC die das belegen, ist jedoch begrenzt. Eine Reihe klinischer Studien berichtet über eine gute Verträglichkeit von allogenen MSC. In einer Phase-II-Studie von Le Blanc et al. <sup>50</sup> konnte kein Zusammenhang gefunden werden zwischen der HLA-Kompatibilität und der Ansprechrate bei Patienten mit GvHD nach HSCT bei Behandlung mit MSC. Hinsichtlich der guten Verträglichkeit in den klinischen Studien ist jedoch zu beachten, dass alle bisherigen menschlichen Empfänger allogener MSC medikamentös immunsupprimiert waren. MSC können in immunkompetenten Mäusen immunogen sein und unter nicht myeloablativen Bedingungen eine Abstoßungsreaktion verursachen <sup>51-52</sup>.

### 1.1.5 Klinische Anwendung

MSC zeigten in Tiermodellen der Osteogenesis Imperfecta <sup>53</sup>, der Lungenschädigung <sup>54</sup>, der Glomerulonephritis <sup>55</sup>, des Diabetes <sup>56</sup>, des Herzinfarktes <sup>57</sup> und verschiedener neurologischer Störungen <sup>58</sup> therapeutische Wirkung. Übereinstimmend mit der Beobachtung, dass bei einer Vielzahl dieser Studien nur bei einer geringen Anzahl von MSC ein engraftment im geschädigten Gewebe stattgefunden hat, geht man heute davon aus, dass die therapeutischen Effekte von MSC weniger ihrer Differenzierungsfähigkeit sondern mehr ihrer Fähigkeit, lösliche Faktoren zu sezernieren zu verdanken sind. Diese Faktoren vermitteln immunsuppressive Effekte, fördern die

Regeneration geschädigter Zellen und wirken proliferativ und differenzierend auf endogene Progenitorzellen in den einzelnen Geweben selbst.<sup>7</sup>

Lazarus et al.<sup>59</sup> führten die erste klinische Studie am Menschen mit Infusionen autologer, ex vivo kultivierter MSC mit dem Ergebnis der Nebenwirkungsfreiheit durch. Horwitz et al.<sup>60</sup> fanden nach Knochenmarkstransplantationen bei Kindern mit Osteogenesis Imperfecta bis zu 2% Spenderosteoblasten und behandelten in einer Folgestudie 6 Kinder nach Knochenmarkstransplantation mit Infusionen von allogenen, ex vivo expandierten MSC. Bei 5 der 6 Kinder fand nach 4-6 Wochen ein engraftment einer kleinen Fraktion von Spender-MSC in verschiedenen Geweben statt. Es konnte eine Zunahme der Wachstumsgeschwindigkeit bei 3 von 6 und eine Zunahme der Knochendichte bei einem Patienten festgestellt werden. Weitere Beispiele der möglichen therapeutischen Anwendung von MSC bei angeborenen Stoffwechselkrankheiten sind die Metachromatische Leukodystrophie und die Mukopolysaccharidose Typ 1. MSC sezernieren Arylsulfatase A und B, sowie  $\alpha$ -1-Iduronidase deren herabgesetzte Enzymaktivitäten die Ursache der genannten Speicherkrankheiten ist<sup>61</sup>.

Die Anwendung von MSC in der regenerativen Medizin wird gegenwärtig intensiv untersucht. Der Einsatz von MSC zur Regeneration von Knorpel zeigt bislang nur mäßige Erfolge, lieferte aber wichtige Erkenntnisse hinsichtlich der Biologie der chondrogenen Differenzierung<sup>62</sup>. Große Aufmerksamkeit galt in den letzten Jahren der Anwendung von MSC in der Kardiologie. Strauer et al.<sup>63</sup> applizierten bei Patienten mit akutem Herzinfarkt zusätzlich zur Standardtherapie autologe Monozyten aus dem Knochenmark (BMMC, bone marrow mononuclear cells) mit den darin enthaltenen HSC, EPC und MSC mittels Ballonkatheter intrakoronar ins Infarktareal. In dieser Studie konnten gegenüber den Vergleichspatienten, die nur die Standardtherapie erhielten kleinere Infarktareale und eine bessere Wandbeweglichkeit festgestellt werden. Bei intrakoronarer Injektion von MSC 3 Wochen nach erfolgreicher Koronarangioplastie fanden Chen et al.<sup>64</sup> nach 3 Monaten eine verbesserte Herzfunktion in der Echokardiographie und im PET-CT. 2009 endete die erste Phase I-Studie zur Behandlung von Patienten nach akutem Herzinfarkt mit intravenös verabreichten MSC. Die Patienten der MSC-Gruppe zeigten eine

verbesserte EF (ejection fraction), weniger häufiges Auftreten von Kammertachykardien und ein verbessertes forciertes expiratorisches 1-Sekunden Volumen (FEV1) als Parameter der Lungenfunktion <sup>65</sup>. Die Mechanismen der therapeutischen Effekte von MSC auf das Infarktgewebe sind noch ungeklärt. Gegenüber der Möglichkeit, dass sich transplantierte MSC im Infarktgewebe zu Kardiomyozten differenzieren, sehen neuere Studien den Effekt parakriner Faktoren wie Sfrp2 (secreted frizzled protein 2) <sup>66</sup> und den Aufbau einer Stammzellnische, in der kardiale Stammzellen zur Regeneration des Myokards beitragen können, als relevanter an <sup>67</sup>.

MSC erwiesen sich mit ihren immunmodulatorischen Eigenschaften als wirksam in der Therapie der Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (GvHD, graft versus host disease). In der bereits angesprochenen Studie von Le Blanc et al. <sup>50</sup> zeigten 30 von 55 Patienten ein komplettes Ansprechen auf die Infusion von MSC, 9 ein teilweises.

Weitere Einsatzmöglichkeiten der immunmodulatorischen Eigenschaften von MSC bieten sich bei Morbus Crohn und Diabetes Mellitus Typ I. Zu beiden Krankheitsbildern werden gegenwärtig klinische Studien durchgeführt <sup>68</sup>.

## 1.2 Blutgruppensysteme

### 1.2.1 Allgemeines

Blutgruppenantigene sind definiert als erbliche Oberflächenmarker, die von Erythrozyten exprimiert und von humanen Alloantikörpern spezifisch erkannt werden <sup>69</sup>. Ein Blutgruppensystem schließt nach Issitt <sup>70</sup> jene Antigene ein, die auf Allele an Loci zurückzuführen sind, die so nahe beieinander liegen, dass ein crossing-over extrem selten ist. Die Ausbildung der unterschiedlichen Antigene eines Blutgruppensystems beruht auf Polymorphismen der Proteine bzw. der Glykosyltransferasen bei den Kohlenhydrat-Antigenen <sup>71</sup>.

Derzeit sind 308 Antigene in 30 Blutgruppensystemen beschrieben. Darunter sind 7 Systeme, deren Kohlenhydratantigene auf Glykoproteinen oder

Glykolipiden zu finden sind. Die 23 anderen bestehen aus Peptidantigenen, deren entsprechende Proteine als Einpfad- oder Mehrpfad-Transmembranproteine in die Erythrozytenmembran eingebettet oder mit ihr über Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker verbunden sind<sup>72-73</sup> (Tabelle 2).

No.	System name	System symbol	Gene name(s) <sup>a</sup>	Chromosomal location	CD numbers
001	ABO	ABO	<i>ABO</i>	9q34.2	
002	MNS	MNS	<i>GYPA, GYPB, GYPE</i>	4q31.21	CD235
003	P	P1		22q11.2-qter	
004	Rh	RH	<i>RHD, RHCE</i>	1p36.11	CD240
005	Lutheran	LU	<i>LU</i>	19q13.32	CD239
006	Kell	KEL	<i>KEL</i>	7q34	CD238
007	Lewis	LE	<i>FUT3</i>	19p13.3	
008	Duffy	FY	<i>FY</i>	1q23.2	CD234
009	Kidd	JK	<i>SLC14A1</i>	18q12.3	
010	Diego	DI	<i>SLC4A1</i>	17q21.31	CD233
011	Yt	YT	<i>ACHE</i>	7q22.1	
012	Xg	XG	<i>XG, MIC2</i>	Xp22.33, Yp11.3	CD99 <sup>b</sup>
013	Scianna	SC	<i>ERMAP</i>	1p34.2	
014	Dombrock	DO	<i>DO</i>	12p12.3	
015	Colton	CO	<i>AQP1</i>	7p14.3	
016	Landsteiner-Wiener	LW	<i>ICAM4</i>	19p13.2	CD242
017	Chido/Rodgers	CH/RG	<i>C4A, C4B</i>	6p21.3	
018	H	H	<i>FUT1</i>	19q13.33	CD173
019	Kx	XK	<i>XK</i>	Xp21.1	
020	Gerbich	GE	<i>GYPC</i>	2q14.3	CD236
021	Cromer	CROM	<i>DAF</i>	1q32.2	CD55
022	Knops	KN	<i>CR1</i>	1q32.2	CD35
023	Indian	IN	<i>CD44</i>	11p13	CD44
024	Ok	OK	<i>BSG</i>	19p13.3	CD147
025	Raph	RAPH	<i>CD151</i>	11p15.5	CD151
026	John Milton Hagen	JMH	<i>SEMA7A</i>	15q24.1	CD108
027	I	I	<i>GCNT2</i>	6p24.2	
028	Globoside	GLOB	<i>B3GALT3</i>	3q26.1	
029	Gill	GIL	<i>AQP3</i>	9p13.3	

<sup>a</sup>As recognized by the HUGO Gene Nomenclature Committee ([www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/](http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/)); <sup>b</sup>*MIC2* product.

**Tabelle 2: Die Blutgruppensysteme, ihre Gene, Genorte und assoziierte CD-Nummern**  
Nicht aufgeführt ist das System Nr. 030: RHAG nach Daniels et al.<sup>69,72</sup>.

Blutgruppenantigene haben unterschiedliche physiologische Funktionen als Membrantransporter, Strukturproteine, Rezeptoren für extrazelluläre Liganden, Adhäsionsmoleküle, Ektoenzyme, Komponenten des Komplementsystems und dessen Regulatoren sowie im Aufbau der Glykokalix<sup>74</sup>, auf die in den Kapiteln der einzelnen Blutgruppensysteme näher eingegangen wird.

Die klinische Bedeutung der Blutgruppen leitet sich überwiegend aus der Alloimmunisierung gegen die Antigene her. Unter Alloimmunisierung wird die

Bildung von Antikörpern gegen fremde Antigen determinanten verstanden. Antierythrozytäre Antikörper können akute und verzögerte Transfusionsreaktionen oder einen Morbus haemolyticus neonatorum auslösen. Die transfusionsmedizinische Relevanz eines Antigens leitet sich neben seiner Häufigkeit in der Bevölkerung wesentlich aus seiner Immunogenität und der Art der gebildeten Antikörper her. Am bedeutsamsten sind die Antigene A, B und H, gegen die obligat klinisch relevante Antikörper (Isoagglutinine) gebildet werden, gefolgt vom Antigen D des Rhesussystems<sup>71</sup>. Bei ca. 80% der Rh- Individuen führt eine Gabe von Rh+ Blut zu einer Bildung von Anti-D<sup>70</sup>. Die nächst immunogenen Antigene sind die Rhesusantigene C, c, E, e und das Antigen K. Desweiteren werden gegen eine Gruppe von Antigenen selten Antikörper gebildet, die jedoch häufig klinisch relevant sind. Hierzu gehören JK<sup>a</sup>, JK<sup>b</sup>, Fy<sup>a</sup> und Fy<sup>b</sup>. Die meisten anderen Blutgruppenantigene sind entweder nur schwach immunogen oder die entsprechenden Antikörper sind klinisch nicht relevant<sup>71</sup>. Die Bestimmung der Blutgruppen erfolgt in der klinischen Routine am häufigsten durch serologische Methoden, bei denen Antikörper spezifisch an Epitope binden. Die Genotypisierung mittels PCR mit sequenzspezifischen Primern (SSP-PCR) findet zunehmenden Einsatz bei der Blutgruppenbestimmung<sup>75</sup>. In der klinischen Routine fest etablierte Anwendungen der Genotypisierung sind die weak D-Bestimmung bei Schwangeren, die Bestimmung des Genotyps bei Feten aus dem Fruchtwasser bezüglich RHD, RHCE, KEL, seltener FY und SLC14A1 (Kidd Blutgruppe) sowie die Klärung unsicherer Resultate der serologischen Blutgruppenbestimmung wie sie bei der autoimmunhämolytischen Anämie, Vortransfusionen und Polyagglutinationsphänomenen auftreten<sup>71, 76</sup>.

### 1.2.2 Die Blutgruppensysteme ABO und Hh

Die Entdeckung der Blutgruppe ABO im Jahre 1900 durch Karl Landsteiner<sup>77</sup> legte nicht nur den Grundstein für sichere Transfusionen. Das ABO-Blutgruppensystem ist auch das erste menschliche Merkmal für das gezeigt wurde, dass es erblich ist<sup>78</sup>. Die Antigene A und B werden kodominant vererbt

und definieren die Phänotypen 0, A, B und AB. Es lassen sich Untergruppen der Phänotypen A und B einteilen, die sich anhand der Stärke der Antigenausprägung unterscheiden. Klinisch bedeutsam ist die Unterteilung in die Phänotypen A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub>. A<sub>1</sub>-Erythrozyten exprimieren mehr Antigen A als A<sub>2</sub>-Erythrozyten und zusätzlich Antigen A1. A<sub>1</sub>-Erythrozyten agglutinieren aufgrund einer schwachen Expression von Antigen H nicht mit Anti-H und sind so von A<sub>2</sub>-Erythrozyten, die Antigen H exprimieren, serologisch zu unterscheiden <sup>71</sup>.

Für die Synthese der Antigene A, A<sub>1</sub>, B und H sind verschiedene Glykosyltransferasen verantwortlich. Am FUT1-Locus auf Chromosom 19 finden sich die Allele H oder h. Gen H kodiert die Fukosyltransferase 1 (FUT1), die die Kondensation von L-Fukose mit einem als „Grundsubstanz“ bezeichneten Oligosaccharid katalysiert und auf diese Weise das Antigen H<sub>2</sub> auf Erythrozyten bildet <sup>79</sup>. Das eng mit Gen H gekoppelte Gen Se kodiert das Enzym FUT2, das die Expression der ABO- und Hh-Antigene auf epithelialen Geweben und im Speichel auf Basis der Oligosaccharide der Typen H<sub>1</sub> und H<sub>2</sub> reguliert <sup>80;81</sup>. Bhende et al. <sup>82</sup> entdeckten 1952 in Bombay erstmals humane Erythrozyten, die kein Antigen H exprimierten und nannten den gefundenen Phänotyp „Bombay“. Kelly et al. <sup>83</sup> sequenzierten 1994 das entsprechende Gen und fanden eine Basensubstitution in der kodierenden Region die zu einem Stopcodon führt als Ursache der Inaktivität des Allels h, das beim Bombay-Phänotyp homozygot vorliegt <sup>84</sup>.

Das ABO-Gen kodiert die  $\alpha$ 1,3-Glycosyltransferasen (Transferase A und B), die die Kondensation von N-Acetylgalaktosamin bzw. Galaktose mit Antigen H katalysiert und auf diese Weise die Antigene A und B bildet <sup>85</sup>. Als Ursache des A/B-Polymorphismus beschrieben Yamamoto et al. <sup>86</sup> 7 Nukleotid-Substitutionen zwischen den Allelen, die die Transferasen A und B kodieren. Sie zeigten desweiteren, dass die Mutation 258delG im ABO-Gen zum Phänotyp 0 führt. Aufgrund einer Leserasterverschiebung wird in der Folge ein Protein translatiert, welches Antigen H nicht modifizieren kann. In der Datenbank dbRBC <sup>87</sup> werden die bisher identifizierten Allele der Gene ABO und H gelistet. Hier finden sich die Sequenzen von 274 ABO und 101 H Allelen.

Bei immunkompetenten Individuen wird Anti-A bzw. Anti-B natürlicherweise innerhalb der ersten 6 Lebensmonate als Reaktion auf endständige Antigen A- und Antigen B-ähnliche Kohlenhydrate der Zellwände, mit der Nahrung aufgenommener Bakterien gebildet<sup>88</sup>. Diese Isoagglutinine sind als Komplementaktivatoren verantwortlich für die bei ABO-Fehltransfusionen auftretende hämolytische Transfusionsreaktion mit intravasaler Hämolyse<sup>70</sup>.

Ein durch ABO-Inkompatibilität zwischen Müttern der Blutgruppe 0 und Kindern der Blutgruppen A oder B verursachter Morbus Haemolyticus neonatorum (MHN) kommt häufig vor, ist aber selten therapiebedürftig und wird gegebenenfalls durch Phototherapie behandelt<sup>89</sup>.

Die Antigene des ABO Systems beteiligen sich am Aufbau der Glykokalix. Weitere physiologische Funktionen sind derzeit nicht gesichert<sup>90</sup>.

Nieren-, Leber-, Herz- und Lungentransplantationen werden vorzugsweise ABO-kompatibel durchgeführt. Angetrieben von der Knappheit an Spenderorganen wurden in den letzten Jahren zunehmend Protokolle entwickelt, Organe auch ABO-inkompatibel zu transplantieren. Ein Hauptproblem bei der ABO-inkompatiblen Organtransplantation sind die Isoagglutinine, welche an Endothelzellen der Blutgefäße des Spenderorgans gebunden das Komplementsystem aktivieren und eine hyperakute oder akute Antikörper-vermittelte Abstoßungsreaktion in Gang setzen<sup>91</sup>. Tobian et al.<sup>92</sup> zeigten, dass die Plasmapherese in Kombination mit Immunsuppressiva zu einem erfolgreichen und stabilen engraftment bei der ABO-inkompatiblen Nierentransplantation führt. ABO-inkompatible Lebertransplantationen sind derzeit Kindern und Erwachsenen in lebensbedrohlichen Notfallsituationen vorbehalten<sup>93-94</sup>. Herz- und Herz-Lungen-Transplantationen wurden bisher nur in Einzelfällen aufgrund fehlerhafter Blutgruppenbestimmungen und mit schlechten Ergebnissen ABO-inkompatibel transplantiert. Kinder tolerieren ABO-inkompatible Herztransplantationen besser als Erwachsene<sup>95</sup>.

Trotz der Expression von ABH-Antigenen auf hämatopoetischen Stammzellen gilt die ABO-inkompatible HSCT im Allgemeinen als sicher<sup>96-97</sup>. Es werden jedoch diverse immunologische Komplikationen beobachtet. Bei Major-Inkompatibilität kann es zu einem verzögerten engraftment der HSC kommen,

die Patienten haben ein gesteigertes Risiko einer Erythroblastopenie und ihre Neutrophilen regenerieren langsamer. ABO-inkompatible HSCT steigert das Risiko der Transplantat-assoziierten Mikroangiopathie. Bei Minor-Inkompatibilität kann es nach Transplantation zu Hämolyse kommen<sup>98</sup>.

### 1.2.3 Die Blutgruppensysteme Rhesus und RhAG

Im Rhesussystem sind 50 Antigene beschrieben<sup>69;72</sup>, welche auf dem RhD- und RhCcEe-Protein lokalisiert sind. Die beiden Proteine sind mit 12 Segmenten in der Erythrozytenmembran verankert und unterscheiden sich in 36 von 417 Aminosäuren<sup>99</sup>. Das RHCE-Gen kodiert die Antigene C, c, E und e, Antigen D wird vom RHD-Gen kodiert<sup>100</sup>. Der Unterschied zwischen den antithetischen Antigenen C und c bzw. E und e gründet sich auf Punktmutationen, vier im c- und eine im e-Allel. Rh-negative Individuen sind homozygot für eine Deletion des RHD-Gens<sup>101</sup>.

Die klinische Bedeutung der Rhesusantigene leitet sich wesentlich aus der Bildung von Alloantikörpern vom Typ IgG gegen Spender-Erythrozyten bei einer Transfusion oder gegen fetale Erythrozyten im Rahmen einer Geburt her. Anti-D, Anti-C, Anti-E und Anti-e können bei inkompatibler Transfusion verzögerte hämolytische Transfusionsreaktionen verursachen. Maternales Anti-D ist der häufigste Grund eines MHN<sup>99</sup>. Auch Anti-c kann einen schweren MHN verursachen<sup>102</sup>, bei der Bildung von Anti-C, Anti-E und Anti-e werden meist mildere Verläufe beobachtet<sup>103-105</sup>. Rhesus-Antikörper aktivieren nur selten das Komplementsystem, mit IgG markierte Erythrozyten werden von Makrophagen in der Milz abgebaut (extravaskuläre Hämolyse)<sup>106</sup>.

Die RhD- und RhCcEe-Proteine sind in der Erythrozytenmembran an das Rhesus-assoziierte Glykoprotein (RhAG) gebunden<sup>99</sup> und bilden den Rhesus-Kernkomplex<sup>107</sup>. RhAG wurde 2008 als Blutgruppensystem Nr. 030 klassifiziert.

Eine Funktion als Ammoniumtransporter wurde gezeigt für das Rhesus-Homolog RhCG und für RhAG bei Expression durch Hefen<sup>108</sup> und für die

Rhesus-Homologe RhBG und RhCG bei Transfektion in rekombinante humane embryonale Nierenzellen (HEK-293) <sup>109</sup>. Die exakte physiologische Funktion der erythrozytären RHD- und RHCE-Proteine ist unklar. Rh<sub>null</sub>-Erythrozyten weisen Strukturdeformitäten auf und zeigen eine erhöhte osmotische Fragilität. Dies legt eine Rolle der Rhesus-Proteine als Teil des Rhesus-Komplexes im Aufbau der Membranstruktur und des Zytoskeletts nahe <sup>110</sup>.

Hinsichtlich der Relevanz von Rhesus-Antigenen bei Leber- und Nierentransplantationen gibt es unterschiedliche Ergebnisse. Bryan et al. <sup>111</sup> beschrieben einen positiven Einfluss der Rhesus(D)-Kompatibilität auf das Transplantatüberleben bei Nierentransplantationen, Osman et al. <sup>112</sup> konnten das jedoch nicht bestätigen. Busquets et al. <sup>113</sup> fanden ein häufigeres Auftreten biliärer Komplikationen bei Rhesus(D)-inkompatibler Lebertransplantation.

Mögliche zugrunde liegende immunologische Mechanismen sind unklar. Einerseits kann bei Antigen D-negativen Empfängern Antigen D-positiver Spenderorgane eine Alloimmunisierung stattfinden, was jedoch auch eine Reaktion auf übertragene Erythrozyten des Spenders sein kann. Andererseits sind Fälle beschrieben, in denen nach Nieren- <sup>114</sup> und Lebertransplantation <sup>115</sup> gegen Rh+ Erythrozyten des Empfängers gerichtetes Anti-D vom Rh- Spender gefunden wurde. Cserti-Gazdewich et al. <sup>116</sup> beschrieben das Auftreten eines passenger lymphocyte syndroms (PLS) mit Anti-D und Anti-C Antikörpern nach Lungentransplantation, Ainsworth et al. <sup>117</sup> das Vorkommen von Anti-D im Rahmen des PLS nach Nierentransplantation. Beim PLS werden von Spender-Lymphozyten Antikörper gegen Empfänger-Erythrozyten gebildet.

#### 1.2.4 Das Blutgruppensystem Kell

Der Blutgruppe Kell werden 21 Antigene zugeschrieben, darunter Kell (K) und cellano (k) <sup>69</sup>. Die Mehrheit der Kell-Antigene befindet sich auf einem Membran-Glykoprotein, das mit dem Zytoskelett verbunden ist <sup>118</sup>.

Genetische Grundlage des K/k-Polymorphismus ist eine Punktmutation im Kell Allel, die zur Substitution einer Aminosäure im entsprechenden Glykoprotein führt <sup>119</sup>. Das Kell-Protein ist über eine Disulfidbindung an das

Transmembranprotein XK gebunden. Fehlende Expression des XK-Gens wie beim McLeod Phänotyp kann zu Akanthozytose, choreatischen Störungen, Myopathien und Kardiomyopathien führen <sup>120</sup>.

Alloimmunisierungen kommen bei Exposition mit K-positivem Blut in ungefähr 9% vor. Alloimmunisierungen im Rahmen einer Schwangerschaft könnten wie bei Antigen D bei einem zweiten Kind zu einem Morbus haemolyticus neonatorum führen <sup>121</sup>.

Lee et al. <sup>122</sup> zeigten, dass das Kell-Glykoprotein eine Zink-Endopeptidase ist, die auf Erythrozyten exprimiert Endothelin-3 generiert. Endothelin-3 hat vielfältige biologische Funktionen. Es spielt eine Rolle in der Entwicklung des enterischen Nervensystems und der Migration von Zellen der Neuralleiste.

Obwohl Kell-mRNA in geringen Mengen auch von Leber- und Nierengewebe exprimiert wird <sup>123</sup>, fand sich bisher kein Hinweis auf einen Nachteil einer Kell-Inkompatibilität bei Leber- und Nierentransplantationen. Anti-K kann nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation gebildet werden <sup>124</sup>, hat aber keinen Einfluss auf die Überlebenszeit des Empfängers <sup>125</sup>.

### 1.2.5 Das Blutgruppensystem Duffy

Sechs Antigene werden zum Duffy Blutgruppensystem gerechnet. Fy<sup>a</sup> und Fy<sup>b</sup> wird die größte Bedeutung zugeschrieben <sup>69</sup>. Die Antigene befinden sich auf einem Glykoprotein, das mit 7 Domänen die Zellmembran durchspannt <sup>126</sup>.

Eine Punktmutation am Duffy-Lokus ist verantwortlich für den Fy<sup>a</sup>/Fy<sup>b</sup>-Polymorphismus <sup>127</sup>. Tournamille et al. <sup>126</sup> zeigten, dass die Ursache des in Westafrika häufig vorkommenden Fy(a-b-)-Phänotyps eine Punktmutation in der GATA box des FY\*B Promotors ist. Das Resultat ist ein stilles FY\*B Allel in hämatopoetischen Zellen, während das intakte Gen in anderen Geweben wie auch bei Fy(a-b-)-Individuen transkribiert und translatiert wird <sup>128-129</sup>.

Durch Alloimmunisierung gebildetes Anti-Fy<sup>a</sup> <sup>130</sup> und Anti-Fy<sup>b</sup> <sup>131</sup> kann Transfusionsreaktionen, typischerweise vom verzögerten Typ, selten auch einen MHN verursachen <sup>105, 132</sup>

Das Duffy-Glykoprotein dient den Plasmodien vivax und knowlesi als Rezeptor für die Invasion in Erythrozyten<sup>133</sup>.

Nach seiner Funktion als Chemokinrezeptor wird es auch „duffy antigen receptor for chemokines“ (DARC) genannt. DARC bindet Chemokine, darunter IL-8 und MGSA aus der C-X-C-Gruppe (acute inflammation chemokine), und RANTES (regulated on activation, normal T-expressed and secreted) sowie MCP-1 aus der C-C-Gruppe (chronic inflammation chemokine), und vermittelt deren Transzytose<sup>134-135</sup>. Chemokine dienen als Entzündungsmediatoren der Chemoattraktion von Leukozyten in Entzündungsgebiete<sup>136</sup>.

### 1.2.6 Das Blutgruppensystem Kidd

Im Kidd-System sind die drei Antigene Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup> und Jk<sup>3</sup> beschrieben<sup>69</sup>. Sie stellen Peptidantigene auf einem Glykoprotein dar, das mit 10 Domänen die Zellmembran durchzieht<sup>137</sup>. Das Kidd-Glykoprotein wird vom SLC14A1 (solute carrier family 14, member 1) Gen (HUT11) kodiert, benannt nach seiner physiologischen Funktion als Harnstoff-Transporter<sup>138</sup>. Die molekulare Basis des Polymorphismus der kodominanten Allele für Jk<sup>a</sup> und Jk<sup>b</sup> ist eine Punktmutation. Ein Jk(a-b)-Phänotyp kann ein dominantes Inhibitor Gen In(Jk) oder eine Mutation im Allel selbst als Ursache haben<sup>139</sup>.

Das schwer detektierbare Anti-Jk<sup>a</sup> kann schwere Transfusionsreaktionen, meist vom verzögerten selten auch vom akuten Typ auslösen<sup>140</sup>. Anti-Jk<sup>a</sup>, Anti-Jk<sup>b</sup> und Anti-Jk<sup>3</sup> verursachten in Einzelfällen einen MHN<sup>141-143</sup>.

Jk(a-b)-Individuen haben Erythrozyten, die weniger durchlässig für Harnstoff sind und weisen eine verminderte Fähigkeit auf, Harn zu konzentrieren. Sie haben jedoch ansonsten keine klinischen Symptome, was auf die Existenz von Kompensationsmechanismen hinweist<sup>144</sup>.

Lerut et al.<sup>145</sup> fanden in Nierenbiopsaten von Jk-inkompatibel transplantierten Nieren eine stärkere interstitielle Entzündungsreaktion als Hinweis darauf, dass den Antigenen Jk<sup>a</sup> und Jk<sup>b</sup> eine Rolle als Minor-Histokompatibilitätsantigene zukommen könnte.

Anti-Jk<sup>b</sup> kann nach De La Rubia et al. <sup>124</sup> in Folge einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation gebildet werden. Bildung von gegen Empfänger-Erythrozyten gerichtetem Anti-Jk<sup>a</sup> und Anti-Jk<sup>b</sup> im Rahmen eines PLS ist in mehreren Fällen nach HSCT <sup>146-148</sup> und in einem Fall nach Lebertransplantation dokumentiert <sup>149</sup>.

### 1.3 Transplantationsimmunologie

#### 1.3.1 Grundlagen

Die Transplantation von Organen und Zellen gehört längst zur klinischen Routine, ist jedoch ohne eine medikamentöse Immunsuppression bislang undenkbar. Diese kann mit einer Toxizität verbunden sein und steigert das Risiko des Auftretens von opportunistischen Infektionen und Neoplasmen. Wird Gewebe allogene (d.h. zwischen unterschiedlichen Individuen derselben Spezies) übertragen, so ist in den meisten Fällen eine Immunantwort des Empfängers auf Alloantigene des Spenders auf dem Transplantat das Haupthindernis einer erfolgreichen Transplantation. Bei Transplantation kernhaltiger Zellen wird fast immer eine T-Zell vermittelte Immunantwort gegen Antigene des hochpolymorphen HLA (human leukocyte antigen)-Lokus ausgelöst. Obwohl ein matching von Spender und Empfänger bezüglich des HLA-Lokus die Erfolgsrate von Organtransplantationen signifikant erhöht, können selbst bei HLA-identischen Transplantationen Abstoßungsreaktionen auftreten. Diese werden von sogenannten Minor Histokompatibilitätsantigenen (mHag) getriggert, die wie die HLA-Moleküle auch aufgrund von Genpolymorphismen zwischen unterschiedlichen Individuen einer Spezies variieren <sup>150</sup>.

Bisher wurden 30 mHag identifiziert, 10 davon werden von Genen auf dem Y-Chromosom kodiert, die anderen 20 autosomal <sup>151</sup>. Es wird angenommen, dass eine Vielzahl weiterer, bislang nicht identifizierter mHag existiert <sup>150</sup>. Eine

mögliche Rolle der Antigene der Blutgruppen Duffy und Kidd als mHag wird diskutiert<sup>145</sup>.

### **1.3.2 Die Antikörper-vermittelte Transplantatabstoßung und die Rolle der Blutgruppen bei Transplantationen**

Große Beachtung wurde in den letzten Jahrzehnten den Mechanismen der T-Zell-vermittelten Abstoßungsreaktion geschenkt. Diese kann direkt über Spender-APZ (Antigen präsentierende Zellen) ablaufen, die in lokalen Lymphknoten Empfänger T-Zellen stimulieren, oder indirekt über die Präsentation von Transplantantantigenen durch Empfänger-APZ. Neuere Studien unterstreichen, dass ein nicht geringer Teil von Abstoßungsreaktionen Antikörper-vermittelt (humoral) abläuft. Abstoßungsreaktionen können hyperakut (innerhalb von Minuten bis Stunden), akut (binnen weniger Tage) oder chronisch (innerhalb von Monaten bis Jahren) ablaufen<sup>152</sup>. Die hyperakute Abstoßungsreaktion ist komplementabhängig und wird von vorbestehenden, durch Alloimmunisierung entstandenen Antikörpern, insbesondere des ABO Blutgruppensystems, verursacht<sup>150</sup>. Die akute sowie die chronische Abstoßung von Organen kann T-Zell- und/oder durch Antikörper vermittelt ablaufen. Die akute Antikörper-vermittelte Abstoßung (AAMR, acute antibody mediated rejection) ist durch 4 diagnostische Kriterien definiert: Klinisch evidenten Transplantatversagen, histologisch nachgewiesene Schädigung von Transplantatgewebe, immunhistochemischer Nachweis von Komplementablagerungen (C4d, C3) und serologischer Nachweis von Spender-spezifischen Antikörpern zum Zeitpunkt der Biopsie<sup>153-154</sup>. Die Assoziation des Auftretens von Alloantikörpern mit einem häufigeren Transplantatversagen im Zeitraum von 1-5 Jahren legt den Schluss nahe, dass in einigen Fällen auch chronische Abstoßungsreaktionen durch Antikörper vermittelt ablaufen<sup>155-157</sup>. Blutgruppenantigene stimulieren je nach Stärke der Immunogenität die Bildung von Alloantigenen. Neben Anti-A und Anti-B, die komplementvermittelte hyperakute und akute Abstoßungsreaktionen auslösen können, wurde nach Transplantation von Organen und hämatopoetischen Stammzellen vielfach über

das Auftreten von Antikörpern der Blutgruppen Rhesus<sup>114-117</sup>, Kell<sup>124</sup>, Duffy<sup>158-159</sup> und Kidd<sup>124, 146-149</sup> berichtet.

Grundsätzlich können nach Transplantationen detektierte Antikörper vom Spender oder vom Empfänger stammen. Sie können durch vorhergehende Alloimmunisierung des Empfängers oder des Spenders vorbestehen oder neu von Plasmazellen gebildet werden. Für die Herkunft Antikörper-produzierender Plasmazellen gibt es drei Möglichkeiten: Sie können vom Empfänger stammen und Antikörper gegen auf dem Transplantat oder auf kontaminierenden Erythrozyten exprimierte Antigene bilden. Stammen sie vom Spender, sind sie entweder mit dem Transplantat im Rahmen eines passender lymphocyte syndrome (PLS) übertragen worden oder haben sich, bei HSCT, aus transplantierten Stammzellen entwickelt<sup>124</sup>. Je nach Blutgruppe und transplantiertem Gewebe wurden Antikörper unterschiedlicher Spezifität detektiert und die unterschiedliche Herkunft diskutiert, worauf bereits in den Kapiteln über die einzelnen Blutgruppensysteme eingegangen wurde.

#### 1.4 Ziele dieser Arbeit

Die vorliegende experimentelle Arbeit befasst sich mit der Untersuchung der Expression von Blutgruppenantigenen auf humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark. Der Fokus lag hierbei auf den klinisch bedeutsamen Antigenen A, B, H, Rhesus-D, -C, -c, -E, -e, RhAG, K, k, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup> und DARC. Die Expression sollte systematisch auf Genom-, Transkriptom- und Proteinebene evaluiert werden.

Die Grundcharakterisierung der in dieser Arbeit untersuchten MSC (adipogene, osteogene und chondrogene Differenzierung in vitro, durchflusszytometrische Untersuchungen von Oberflächenmarkern) wurde im Rahmen der Routinecharakterisierung am IKET sowie im Rahmen von anderen Dissertationen durchgeführt.

Die als MSC charakterisierten Zellen sollten nun mittels SSP-PCR hinsichtlich der Blutgruppen genotypisiert, das Vorkommen von Blutgruppen-spezifischer mRNA mittels RT-PCR und die Expression der Blutgruppenantigene auf der

Zelloberfläche mittels FACS detektiert werden. Ziel dieser Arbeit ist es, durch die Kenntnis der Expression von Blutgruppen einen Beitrag zur näheren Charakterisierung und Identifikation von Subpopulationen der als MSC bezeichneten Zellen zu leisten. Aufgrund ihrer potentiellen Immunogenität ist die Frage nach der Expression von Blutgruppenantigenen auf MSC im Rahmen der Transplantation allogener Zellen eine grundlegende Fragestellung.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Produkt	Typ	Firma
Durchflusszytometer	FACScan	Becton Dickinson (BD), Heidelberg
Computer zur FACS-Auswertung	Power Mac G4	Apple Sales International, Hollyhill, Irland
FACS-Software	CellQuest Pro	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifuge	Z 513 K	Hermle, Wehingen
Zentrifuge	Rotina 46 R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge	Varifuge	Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipetten	reference 100/200/1000	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	research 10/100/200/1000	Eppendorf, Hamburg
Akku-betriebene Pipettierhilfe	pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Vortex-Schüttler	REAX1	Heidolph, Schwabach
Neubauer-Zählkammer		Albert Sass, Sigma, Steinheim
Wipptisch	WT 16	Biometra, Göttingen
Sterilisator	KSG 119	KSG, Olching
Magnetrührer mit Heizung	RCT Ikamag	IKA, Staufen
Pipette, 8-fach	Finnpipette	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Thermocycler: GeneAmp PCR	System 9700	Applied Biosystems, Foster City, USA
Elektrophoresekammer, Gelträger, Kämme		Universitätsklinikum Heidelberg
Illuminator		Bachofer Laboratoriumsgeräte
Polaroidkamera MP4	Model 44-16	Polaroid, Minnetonka, USA
Blockheizer	HX-1	PEQLAB, Erlangen
RNA/DNA Calculator	Genequant	Applied Biosystems, Foster City, USA
Spektralphotometer	ND-1000	Nanodrop, Wilmington, USA
Zentrifuge	Mikro 22 R	Hettich, Tuttlingen
Umkehrmikroskop	Axiovert 200	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop	Axioskop	Carl Zeiss, Jena
Platten-Rüttler: DPC Milenia Micromix 4	Modell Nr. 602002	ADC, Gwynedd, Großbritannien
Spannungsquelle	Powerpac 3000	Biorad, München
Zentrifuge	ID 24 S	DiaMed, Cressier, Schweiz

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Typ	Firma
PP-Reaktionsgefäß	Falcon 15 ml, 50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
PS-96-Well-Platte	U96 MicroWell, Clear	Nunc, Langenseibold
PS-FACS-Röhrchen	0,5 ml	Sarstedt, Numbrecht
FACS-Röhrchen	Falcon 5 ml	Becton Dickinson, Heidelberg

Eppendorfgesäß	Safe Lock, Standard 0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	0,5-10 µl 2-200 µl 50-100 µl	Eppendorf, Hamburg
Pasteur Pipetten	150 mm lang	Wu, Mainz
PCR Softstrip		Biozym Scientific, Oldendorf
Cap Strip		Biozym Scientific, Oldendorf
Pipettenspitzen Costar	Stripette 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning Inc., Corning, USA
Objektträger		R. Langenbrink, Teningen
Monovette	NH <sub>4</sub> -Heparin 0,9 ml	Sarstedt, Nümbrecht

### 2.3 Kontrollzellen, Chemikalien, Reagenzien

Produkt	Typ	Firma
Erythrozyten mit den Blutgruppenmerkmalen A <sub>1</sub> , B und 0	Biotestcell 4%ig in modifizierter Alseverslösung	Biotest, Dreieich
Erythrozyten mit den Blutgruppenmerkmalen A <sub>1</sub> , B und 0	10%ig in modifizierter Alseverslösung	IKET, Tübingen
Erythrozyten mit den Blutgruppenmerkmalen D, dd, CC, Cc, cc, EE, Ee, ee, Jk <sup>a+b-</sup> , Jk <sup>a-b+</sup> , Jk <sup>a+b+</sup> , Fy <sup>0</sup> , Fy <sup>a+b-</sup> , Fy <sup>a-b+</sup> , Fy <sup>a+b+</sup> , KK, Kk, kk	Panocell-10 3%ig	Immucor, Norcross, USA

Erythrozyten mit dem Blutgruppenmerkmal KK	Makropanel 16	Sanquin, Amsterdam, Niederlande
Alpha MEM mit Desoxyribonucleotiden, Nucleotiden und UltraGlutamin 1		Lonza, Walkersville, USA
Penicillin-Streptomycin	1%	Lonza, Walkersville, USA
Formaldehyd-Lösung	10%	Universitätsapotheker, Tübingen
PBS, Dulbecco's	+ Ca <sup>2+</sup> , + Mg <sup>2+</sup>	Invitrogen, Carlsbad, USA
PBS	ohne Ca <sup>2+</sup> , ohne Mg <sup>2+</sup>	Lonza, Walkersville, USA
BSA		Ortho Clinical Diagnostics, Neckargemünd
FACS-Trägerflüssigkeit	FACSFlow	Becton Dickinson, San Jose, Kanada
FACS-Puffer	500 ml PBS 5 g BSA 500 µl FCS 1 Körnchen NaAcid	siehe einzelne Inhaltsstoffe
Trypanblau	0,5%	Biochrom, Berlin
7-AAD		Becton Dickinson, Heidelberg
Serum	gepooltes Serum humaner Spender der Blutgruppen AB bzw. 0	IKET, Tübingen
FCS, südamerikanischer Ursprung		Lonza, Verviers, Belgien
TBE-Puffer		Universitätsapotheker Tübingen

Agarose		Invitrogen, Carlsbad, USA
Aqua dest.		Delta Select, München
Ampuwa	Wasser für injektionszwecke	Fresenius Kabi, Bad Homburg
DNA-Leiter	peqGOLD 50 bp	peqlab Biotechnologie, Erlangen
Ladepuffer, 6x		peqlab Biotechnologie, Erlangen
Ethidiumbromid-Lösung	2,5%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Blutgruppen-SSP Kits	AB0, CDE, KKD	Inno-Train, Kronberg
Taq DNA-Polymerase, 5 U/µl	Hot Master	Firma 5 Prime, Hamburg
Isopropanol	60%	Bio Whittaker, Verviers, Belgien
Isopropanol	99%	Sigma-Aldrich, Steinheim
DDT: Dithio-DL-threitol- Lösung		Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz
Thin walled PCR tubes DNase und RNase free		Roche, Mannheim
Zellen der humanen akuten myeloischen Leukämie Linie KG1-a	CCL-246™	ATCC, Manassas, USA
RNA, Human Kidney	MVP™ Total, (0,9 µg/µl)	Stratagene, La Jolla, Kanada
Primer zur Detektion der cDNA der Gene ABO, RHD, RHCE, KEL, KIDD, DARC		Universitätsklinikum Innsbruck, Österreich

Primer zur Detektion der RHAG cDNA		Metabion, Martinsried
EDTA-Blut		IKET, Tübingen
Zellen der Linie SkMel		ATCC, Manassas, USA
Ethanol	70%	Universitätsapotheke Tübingen
Trypsin/EDTA	Trypsin-Versene® 0,5 g/l Trypsin 0,2 g/l EDTA	Lonza, Walkersville, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	getrocknet	Merck, Darmstadt
DNA-Leiter	GenLadder™ 50s	Inno-Train, Kronberg

Erythrozyt	Herkunft	D	C	c	E	e	K	k	entnommen
A <sub>1</sub>	IKET	0	0	+	0	+	0	+	02.05.2007
B	IKET	0	0	+	0	+	0	+	04.05.2007
0	IKET	0	0	+	0	+	0	+	04.05.2007

Tabelle 3: Antigenmuster der Erythrozyten, IKET Tübingen

Erythrozyt Nr.	Firma	D	C	c	E	e	K	k	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>
1	Immucor	+	+	0	0	+	+	+	0	+	+	+
2	Immucor	+	0	+	+	0	0	+	0	+	0	+
3	Immucor	+	0	+	0	+	0	+	0	0	+	0
4	Immucor	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	+
5	Immucor	0	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+
6	Immucor	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0
7	Immucor	+	+	0	0	+	+	+	+	+	+	+
8	Immucor	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+
9	Immucor	+	0	+	+	0	0	+	0	0	+	0
10	Immucor	0	+	+	0	+	0	+	+	0	+	0
11	Sanquin	0	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+

Tabelle 4: Antigenmuster der Erythrozyten, Fa. Immucor und Fa. Sanquin

Erythrozyt Nr.	Firma	A <sub>1</sub>	B	H	D	C	c	E	e
12	Biotest	+		+	+	+	+	+	+
13	Biotest		+	+	0	0	+	0	+
14	Biotest			+	+	+	+	+	+

Tabelle 5: Antigenmuster der Erythrozyten, Fa. Biotest

## 2.4 Kits

Produkt	Typ	Firma
peqGOLD Blood DNA Mini Kit		PEQLAB, Erlangen
RNeasy® Mini Kit		Qiagen, Hilden
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit		Roche, Mannheim
ID-Karten	„DiaClon AB0/D+DAT“ „DiaClon Rh subgroups +K“	DiaMed, Cressier, Schweiz
ID-Antigen profile	I,II,III	DiaMed, Cressier, Schweiz
ID.Diluent 1	modifizierte Bromelin- Lösung	DiaMed, Cressier, Schweiz
ID-Diluent 2	modifiziertes LISS	DiaMed, Cressier, Schweiz

## 2.5 Stammlösungen

### Stammlösung RhAG-Primer

Es wurden je 0,02  $\mu\text{mol}$  lyophilisierter Oligo RhAG Forward- und RhAG Reverse-Primer in 500  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

## 2.6 Antikörper

Spezifität	Subtyp	Markierung	Firma
anti-A	IgG <sub>3</sub>	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
anti-B	IgG <sub>3</sub>	FITC	Institut de Biotechnologies Jaques Boy, Reims, Frankreich
anti-CD173 (H2)	IgG <sub>1</sub>	-	GeneTex, Irvine, USA
anti-D (RH1)	IgG <sub>1</sub>	FITC	Institut de Biotechnologies Jaques Boy, Reims, Frankreich
anti-C (RH2)	IgM	-	
anti-c (RH4)	IgM	-	
anti-E (RH3)	IgG	-	
anti-e (RH5)	IgM	-	
anti-Jka (JK1)	IgM	-	
anti-Jkb (JK2)	IgM	-	
anti-K (KEL1)	IgM	-	
anti-k (KEL2)	IgG	-	Serac, Bad Homburg
anti-DARC	IgG <sub>2a</sub>	-	R&D Systems, Minneapolis
Isotyp	IgG <sub>3</sub>	FITC	BD, Heidelberg

Isotyp	IgG <sub>1</sub>	-	BD, Heidelberg
Isotyp	IgG	FITC	Rockland, Gilbertsville, USA
Isotyp	IgM	-	AbDSerotec, Düsseldorf
Isotyp	IgG	-	AbDSerotec, Düsseldorf
Isotyp	IgG <sub>2a</sub>	PE	R&D Systems, Minneapolis
anti-human IgG (H+L)	F(ab') <sub>2</sub>	FITC	Institut de Biotechnologies Jaques Boy, Reims, Frankreich
Anti-mouse IgG <sub>1</sub>	IgG <sub>1</sub>	PE	BD, Heidelberg
Anti-mouse IgG <sub>1</sub>	IgG <sub>1</sub>	FITC	BD, Heidelberg

## 3 Methoden

### 3.1 Zellbiologische Methoden

#### 3.1.1 Isolation und Zellkultur der MSC

Unter sterilen Bedingungen wurde im Rahmen orthopädischer Operationen mittels einer Monovette Knochenmark in Portionen zu 5 ml je Patient entnommen. Alle Spender litten weder an einer metabolischen noch an einer neoplastischen Erkrankung und stimmten nach Aufklärung der Entnahme zu Forschungszwecken zu. Für dieses Prozedere lag ein positives Votum der Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Tübingen vor (Projektnummer 95/2005V).

Die weitere Isolation, Zellkultur, Differenzierung der MSC in adipogene, osteogene und chondrogene Zelllinien sowie eine immunphänotypische Charakterisierung mit den Markern CD10, CD14, CD15, CD29, CD31, CD34, CD43, CD44, CD45, CD56, CD59, CD71, CD73, CD90, CD93, CD105, CD106, CD117, CD130, CD133, CD140a, CD140b, CD146, CD166, CD243, CD271, GD2, HLA I und HLA II erfolgte im Rahmen der Laborroutine des IKET Tübingen und im Rahmen anderer Dissertationen.

Hierbei wurden aus dem Knochenmarkaspirat die mononukleären Zellen nach dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation nach Bøyum<sup>160</sup> isoliert. Im Rahmen der Zellkultur wurden nicht adhärente Zellen nach 24h verworfen und die definitionsgemäß an Plastik adhären MSC weiter kultiviert.

Die Zellen eines Spenders wurden als separate Population mit „h“ für „human“ und einer fortlaufenden Nummer bezeichnet. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zur Expression der Blutgruppenantigene wurden mit den MSC-Populationen von 6 Spendern: h59, h60, h63, h93, h95 und h98 durchgeführt.

Das verwendete Standardzellkulturmedium enthielt  $\alpha$ -MEM mit Desoxyribonukleotiden, Ribonukleotiden und Ultra Glutamin 1, 100 I.U. Penicillin, 100  $\mu$ g/ml Streptomycin und 10 % FCS. Für die Populationen h93,

h95 und h98 wurde statt 10% FCS 10% gepooltes humanes Serum der Blutgruppe AB verwendet.

Beim Erreichen von ca. 80 % Konfluenz (nach ca. 2-4 Wochen) wurden die Zellen durch Trypsin/EDTA abgelöst. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde ein Teil der Zellen als neue Passage in einer Dichte von 1000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät, ein Teil der Analyse zugeführt und ein weiterer Teil für spätere Analysen eingefroren.

### 3.1.2 Einfrieren und Auftauen der MSC

Zum Einfrieren wurden MSC mit einem Medium, bestehend aus 30%  $\alpha$ -MEM, 65% FCS und 5% DMSO in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  –  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml versetzt und in Portionen von 2 ml in Kryoröhrchen verteilt. Für ein schonendes Einfrieren wurden die Zellen zunächst 24 h bei -80°C tiefgefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

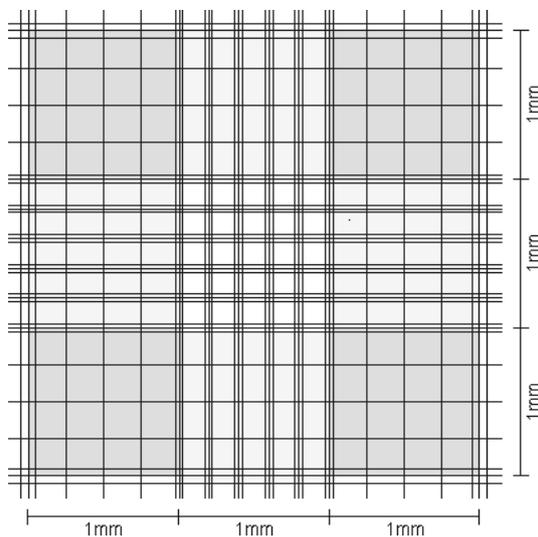
Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, in 40 ml Standardzellkulturmedium bestehend aus  $\alpha$ -MEM mit Desoxyribonukleotiden, Ribonukleotiden und Ultra Glutamin 1, 100 I.U. Penicillin, 100  $\mu$ g/ml Streptomycin und 10 % FCS aufgenommen, 5 min bei 300 x g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Resuspension der Zellpellets wurde das Reaktionsgefäß über ein Lochblech gezogen. Die aufgetauten Zellen wurden zum Teil als neue Passage in der gewünschten Dichte ausgesät, zum Teil für Analysen verwendet.

Die für die RNA-Isolation bestimmten MSC wurden zweimal mit 15 ml PBS gewaschen (Zentrifugation 5 min bei 300 x g) und der Überstand sorgfältig mit einer Pasteurpipette abgenommen. Die Zellen wurden in 350  $\mu$ l RLT-Puffer (RNeasy Mini Kit) + 1% DDT pro  $1 \times 10^5$  Zellen lysiert und bei -80°C in einem RNase freien Eppendorfgefäß gelagert. Ebenso wurde mit Zellen der Linie KG1-a der humanen akuten myeloischen Leukämie CCL-246™ und Zellen der Linie SkMel (humanes Melanom) verfahren.

### 3.1.3 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurden die MSC in 100 µl Medium aufgenommen, in ein Eppendorfgefäß gegeben, mit 100 µl Trypanblau gefärbt. 10 µl der Suspension wurden in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Abgestorbene Zellen mit Defekten der Zellmembran färben sich blau an. Die Anzahl intakter und abgestorbener Zellen wird nach folgender Formel ermittelt:

$$\text{Zellzahl / ml} = \text{Mittelwert der Zellzahlen in vier Großquadraten} \cdot 2 \cdot 10^4$$



**Abbildung 2: Neubauer-Zählkammer**

Gezählt werden die Zellen in den vier grau markierten Großquadraten. Aus: [www.wikipedia.de](http://www.wikipedia.de)

### 3.1.4 Isolation von Monozyten des peripheren Blutes (PBMNC)

PBMNC wurden ebenfalls nach dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation aus 10 ml peripherem Heparin-Blut isoliert. Die Zellen der PBMNC-Schicht wurden in 350 µl RLT-Puffer lysiert und frisch für die RNA-Extraktion verwendet.

### 3.2 Blutgruppenbestimmung der MSC Spender (serologisch)

Das durch Dichtegradientenzentrifugation erhaltene Erythrozytenkonzentrat wurde mit der ID-Karte „DiaClon AB0/D+DAT“ auf die ABO-Blutgruppe und das Antigen RhD, mit der ID-Karte „DiaClon Rh subgroups + K“ auf die Rhesusantigene C (RH2), c (RH4), E (RH3), e (RH5) sowie das Kellantigen K (KEL1) und mit den ID-Antigen-Profilen II und III auf die Merkmale k, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, Fy<sup>a</sup> und Fy<sup>b</sup> hin untersucht.

Bei Vorhandensein des jeweiligen Blutgruppenantigens auf den Spender-Erythrozyten fand mit Hilfe der in der Gelmatrix der ID-Karten befindlichen blutgruppenspezifischen Antikörpern und des Antihumanglobulinserums eine Hämagglutination statt. Nach Zentrifugation sind Agglutinate als Banden im Gel sichtbar.

25 µl Erythrozytenkonzentrat wurden zu 0,5 ml ID-Diluent 2 (modifiziertes LISS) bzw. für das ID-Antigen-Profil II zu 0,5 ml ID-Diluent 1 (modifizierte Bromelin-Lösung) pipettiert. 10 µl der Erythrozytensuspension wurden in die jeweiligen Mikroröhrchen der ID-Karten „DiaClon AB0/D+DAT“ und „DiaClon Rh subgroups + K“ pipettiert.

Für die Bestimmung von Fy<sup>a</sup> und Fy<sup>b</sup> mit dem ID-Antigen-Profil III wurden 10 µl Erythrozytenkonzentrat zu 1 ml ID-Diluent 2 gegeben und je 50 µl der Erythrozytensuspension in die Mikroröhrchen der Gelkarten pipettiert. Dazu wurden 50 µl ID-Testserum gegeben und 10 min bei RT inkubiert.

Alle Karten wurden 10 min in der ID-Zentrifuge bei 90 x g zentrifugiert und anschließend abgelesen.

### 3.3 Genomische PCR der MSC

#### 3.3.1 DNA-Extraktion

Die Extraktion der DNA aus aufgetauten MSC-Suspensionen erfolgte mit dem peqGOLD Blood DNA Mini Kit. Zur Lyse der Zellen wurden je  $5 \times 10^5$  MSC in 250  $\mu$ l PBS in ein steriles 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und 25  $\mu$ l OB™ Protease und 250  $\mu$ l BL-Puffer hinzugefügt. Nach sorgfältigem Mischen auf dem Vortex wurde der Ansatz 10 min bei 70°C im Blockheizer inkubiert. Das Lysat wurde mit 260  $\mu$ l absolutem Isopropanol gemischt, auf eine HiBind®-DNA-Säule, die sich in einem 2 ml Röhrchen befindet, pipettiert und 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. Die mit DNA beladene Säule wurde in ein 2 ml-Röhrchen gesteckt, mit einem Gemisch aus 240  $\mu$ l DNA-Waschpufferkonzentrat und 360  $\mu$ l absolutem Ethanol zweimal gewaschen und durch 2 minütiges Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit getrocknet. Zur Elution wurden 100  $\mu$ l des auf 70°C vorgewärmten Elutionspuffers auf die Säule pipettiert, für 2 min bei RT inkubiert und 1 min bei 5000 x g zentrifugiert. Der Vorgang wurde mit weiteren 100  $\mu$ l Elutionspuffer wiederholt. Die DNA-Konzentration wurde mit dem RNA/DNA-Calculator bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen.

#### 3.3.2 Genomische PCR

Die genomische PCR erfolgte mit dem Inno-Train Blutgruppen „Sequence Specific Priming“ (SSP)-Kit. SSP beschreibt eine Variante der PCR, bei der für die Spezifikation des bestimmbar Merkmals ausschließlich die Sequenz des Primers am 3' Ende verantwortlich ist.

Der „Mastermix“ (ein Gemisch aus 6  $\mu$ l Aqua dest., 3  $\mu$ l redPCR und 0,08  $\mu$ l Taq-Polymerase und 1  $\mu$ l DNA-Lösung der Konzentration 25-100 ng/ $\mu$ l pro well) wurde in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß angesetzt, auf dem Vortex gut durchmischt und je 10  $\mu$ l/well in 0,2 ml PCR-Softstrips mit den lyophilisierten

Primern pipettiert. Die Proben wurden im Thermocycler mit dem PCR-Programm für die Systeme ABO, Rhesus, KKD nach Inno-Train amplifiziert.

1 x initial	5 Zyklen	10 Zyklen	20 Zyklen	1x final	
94°C 2min	94°C 20s 70°C 60s	94°C 20s 65°C 60s 72°C 45s	94°C 20s 61°C 50s 72°C 45s	72°C 5 min	10°C unendlich

**Tabelle 6: PCR-Programm für die Blutgruppensysteme ABO, CDE, KKD nach Inno-Train**

Zur Herstellung des 2%igen Elektrophoresegels wurden 6 g Agarose mit 30 ml TBE-Puffer (900 mM/l TRIS 900 mM/l Borsäure, 25 mM/l EDTA-Natrium) in 300 ml ddH<sub>2</sub>O unter Rühren zum Kochen gebracht und auf 60°C abgekühlt. Dazu wurden 2 Tropfen 2,5%ige Ethidiumbromid-Lösung gegeben, das Gel in die Gelträger gegossen und die Kämme eingesetzt. Das Gel polymerisierte bei Raumtemperatur innerhalb von 30 min.

100 ml TBE-Puffer wurden mit 900 ml ddH<sub>2</sub>O verdünnt, die Elektrophoresekammer mit dem verdünnten Puffer befüllt und das Gel eingesetzt.

1 µl der DNA-Leiter in Tris-HCl und EDTA wurden mit 1 µl 6x Ladepuffer (10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03% Bromphenolblau, 0,03% Xylencyanol, 60% Glycerin und 60 mM EDTA) und 4 µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt.

Je 10 µl PCR-Produkt wurden mit der 8fach-Pipette in eine Geltasche pipettiert, 6 µl DNA-Leiter jeweils in die Geltasche unterhalb einer Reihe. Die Elektrophorese erfolgte für 20 min bei 203 V. Zur Interpretation wurde unter UV-Licht eine Polaroid-Fotografie angefertigt.

### 3.4 RT-PCR

#### 3.4.1 RNA-Extraktion und reverse Transkription

Für die Isolierung der RNA mit dem RNeasy Mini Kit wurde das RLT-Lysat (der MSC, PBMNC, KG-1a- oder SkMel-Zellen) 20 min bei Raumtemperatur aufgetaut, auf eine Qiagen Shreddersäule pipettiert und 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, wobei der Unterstand mit einem 2 ml Röhrchen aufgefangen wurde. Zum Unterstand wurden 350 µl 70 %iges Ethanol gegeben und mit der Pipette gut durchgemischt. 700 µl dieses Gemisches wurden auf eine RNeasy-Mini-Säule gegeben und 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. 700 µl des Waschpuffers RW1 wurden auf die Minisäule pipettiert und 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. 500 µl RPE-Puffer wurden auf die Säule pipettiert und 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Unterstandes, wurden erneut 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben und 2 min bei 8000 x g zentrifugiert. Die Minisäule wurde auf ein 1,5 ml Elutions-Eppendorfgesäß gesetzt, 30 µl RNase freies Wasser auf die Membran pipettiert und für 2 min stehen gelassen. Nach einminütiger Zentrifugation bei 8000 x g erfolgte die Konzentrationsbestimmung der RNA mit Hilfe des Spektralphotometers (Nanodrop ND-1000) bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm nach dem Gesetz von Lambert und Beer. Die Proben wurden bei -80°C eingefroren.

Für das Umschreiben der RNA in cDNA mit dem Transcriptor First Strand cDNA Sythesis Kit wurden alle Reagenzien bei RT aufgetaut und auf Eis gestellt. Nachdem alle Reagenzien vorsichtig zentrifugiert wurden, wurde in ein RNase-freies Reaktionsgefäß 1 µg RNA von MSC bzw. Niere und 1 µl Anchored-oligo-(dT)<sub>18</sub> Primer pipettiert und mit Wasser (PCR-grade) auf 13 µl aufgefüllt. Das Gemisch wurde bei 65°C für 10 min im Thermocycler inkubiert um die Sekundärstruktur der RNA aufzulösen und danach sofort auf Eis gestellt. Der Reihe nach wurden 4 µl Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 0,5 µl Protector RNase Inhibitor, 2 µl Deoxynucleotid Mix und 0,5 µl Transcriptor Reverse Transcriptase hinzu gegeben, mit der Pipette vorsichtig durchmischt

und kurz zentrifugiert. Die Proben wurden im Thermocycler bei 55°C für 60 min und anschließend bei 85°C für 5 min inkubiert und bei -80°C eingefroren.

### 3.4.2 Qualitative RT-PCR

Die PCR der erhaltenen cDNA wurde gleich der genomischen PCR nach dem Protokoll der Innotrain-Blutgruppen-SSP durchgeführt (s.o.). Untersucht wurden bei den Populationen h59, h60, h63 jeweils Passage (P) 1 und 2 bei h93, h95 und h98 jeweils P1-3. Pro Ansatz wurden 1 µl der cDNA-Lösung und 0,2 µl 300 nM Primer verwendet (Tabelle 7).

ddH <sub>2</sub> O	5,72 µl
RedPCR	3.0 µl
Taq DNA-Polymerase	0,08 µl
Primer zur Detektion der Blutgruppen-cDNA	0,2 µl

**Tabelle 7: Primeransatz der RT-PCR**

Während die Primer zur Detektion der cDNA der Gene ABO, FUT1, RHD, RHCE, KELL KIDD und DARC bereits in der gewünschten Konzentration vorlagen, wurde die RHAG-Primer Stammlösung (100 µM) mit ddH<sub>2</sub>O auf 0,3 µM verdünnt. Tabelle 8 zeigt die Sequenzen der verwendeten Primer und die Größe der PCR Produkte.

Gen	sequence forward	sequence reverse	mRNA (bp)
<b>ABO</b>	CGAGCATTTCAGGCTCCAGAACAC	TGAAGACATAGTAGTGGACACGGTGGC	140
<b>FUT1</b>	CGGACTGTGGATCTGCCACCTG	GGCATACTGTCCCATCTGATTACCAAAC	327
<b>RHD</b>	GAGGGAACGGAGGATAAAGATCACAC	GCTGTCACCACGCTGACTGCTAC	179
<b>RHCE</b>	CCAAGGGAACGGAGGATAATGATCACAG	GATGGCTGTCACCACACTGACTGCTAG	185
<b>RHAG</b>	CACCCTTGCTGGAGGAGTT	CAGGTAAGCCGTGGAGGTT	188
<b>KELL</b>	CACCGATGTCCCTGAGCCCTTC	GTGGTTGCTCTGTCAGTTCCCGC	225
<b>KIDD</b>	TGTTCACGGCCTATCTTGGAGTCG	ACCATTCTTTTCTTGGCTTGCAGGTAG	205
<b>DUFFY (DARC)</b>	GGCCTGAACCAAACGGTGCCA	GGACAGTGCTGCTAGCTAGGATACCCA	258

**Tabelle 8: Primersequenzen und PCR-Produkte**

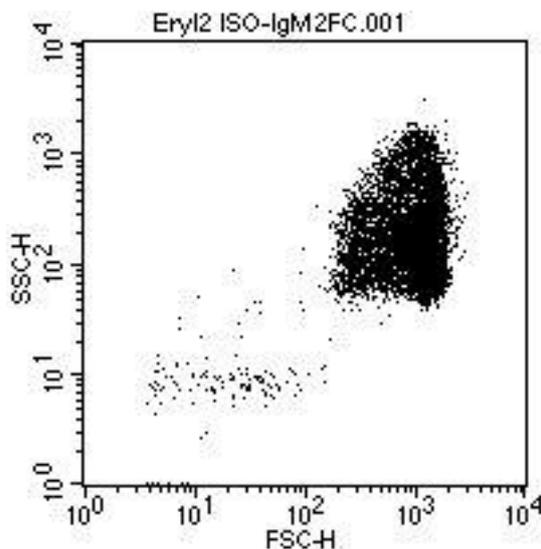
5 µl Fertig-DNA-Leiter (Innotrain) wurden jeweils in die Geltasche unterhalb einer Reihe pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte über 1 h bei 80 V.

Über die unterschiedlichen Größen der PCR-Produkte konnten diese dem jeweiligen Blutgruppengen zugeordnet werden. Der Nachweis der Spezifität der RT-PCR erfolgte über folgende Kontrollen: RNA humaner Niere als Positivkontrolle für ABO, Kell, Kidd und DARC und als Negativkontrolle für Rh-D. RNA von Monozyten des peripheren Blutes (PBMNCs) und RNA der Zelllinie KG1-a der humanen akuten myeloischen Leukämie CCL-246™ als Positivkontrolle für FUT1, ABO, Rh-AG, Rh-D, Rh-CE, Kell, Kidd und DARC. RNA der Zelllinie SkMel (humanes Myelom) als Negativkontrolle für DARC und Kidd.

### 3.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Analyse von Zellen in Suspension. Hierbei wird eine Zellsuspension in eine dünne Kapillare aspiriert, so dass die Zellen in einer Trägersubstanz unter Druck vereinzelt werden (hämodynamische Fokussierung) und am Analysepunkt einen Laserstrahl passieren. Das dabei emittierte Streulicht wird in unterschiedlichen Winkeln als Vorwärts- (FSC = forward light scatter: 1°-10°) und Seitwärtsstreulicht (SSC =

sideward light scatter: 90°) von optischen Sensoren detektiert, wobei das Vorwärtsstreulicht vom Volumen, das Seitwärtsstreulicht von der intrazellulären Granularität der analysierten Zelle abhängt. Trägt man FSC als Funktion von SSC in einem zweidimensionalen Diagramm auf, so lässt sich die Verteilung der Zellen bezüglich der genannten Parameter veranschaulichen.



**Abbildung 3: Durchflusszytometrische Analyse von Erythrozyten**

**Auftragung der Verteilung der Zellen nach Vorwärtsstreulicht (FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC)**

Bei der FACS-Analyse (FACS = fluorescence activated cell sorting) werden die zu analysierenden Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern beladen. Hierbei kann der Fluoreszenzfarbstoff direkt an einen spezifischen Antikörper gebunden sein, oder ein fluoreszenzmarkierter Antikörper bindet sekundär an einen unmarkierten, zellgebundenen Antikörper. Vom Laser angeregt, emittiert der Fluoreszenzfarbstoff Photonen, die mit einem optischen Sensor detektiert und in elektrische Spannungen umgewandelt werden. Diese analogen Signale werden von einem Analog-Digital-Converter (ADC) in digitale transformiert und zur Auswertung mittels einer Software an einen Computer übermittelt. Die Fluoreszenzintensität verhält sich hierbei direkt proportional zur Anzahl der mit farbstoffgekoppeltem Antikörper besetzten Bindungsstellen. Da die meisten Zellen eine gewisse Autofluoreszenz zeigen und da Immunglobuline auch unspezifisch an Zellen binden, muss immer eine Isotypkontrolle mit gemessen werden. Die Differenz der Fluoreszenzintensitäten zwischen Isotyp und der zu

untersuchenden Zelle entspricht der durch spezifisch gebundene, fluoreszenzmarkierte Antikörper verursachten Fluoreszenz. Auf diese Weise lässt sich die Expression der jeweiligen zu untersuchenden Antigenstruktur auf der Oberfläche einer Zelle erkennen und quantifizieren.

Häufig verwendete Farbstoffe sind Fluoresceinisothiocyanat (FITC) mit einem Emissionsmaximum von 520 nm und Phycoerythrin (PE) mit einem Emissionsmaximum von 580 nm. Die unterschiedlichen Farbstoffe werden je nach Emissionsmaximum von unterschiedlichen Detektoren getrennt registriert, FITC über den Fluoreszenz-1-Detektor (FL1), PE über den Fluoreszenz-2-Detektor (FL2).

Um eine Aussage über die Vitalität der Zellen machen zu können, kann eine Färbung mit 7-Aminoactinomycin (7-AAD) durchgeführt werden. Abgestorbene Zellen stellen sich in der FACS-Analyse als 7-AAD positiv dar<sup>161</sup>. 7-AAD hat ein Emissionsmaximum von 650 nm und wird mit dem Fluoreszenz-3-Detektor (FL3) gemessen.

### 3.6 FACS-Analyse von Erythrozyten

Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit der fluoreszenzmarkierten Antikörper wurde eine FACS-Analyse mit Erythrozyten durchgeführt. Das optimale Verhältnis zwischen Antigen- und Antikörpermenge wurde für die Antigene A, B, H mittels einer Titrationsreihe mit Anti-A, Anti-B und Anti-H in den Verdünnungen 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000 bestimmt. Für die Evaluierung des Nutzens einer Formalinfixation wurde die Titrationsreihe mit und ohne Formalininkubation durchgeführt.

Folgendes Protokoll konnte etabliert werden: Erythrozyten der Blutgruppen A<sub>1</sub>, B und 0 (Biotestcell) wurden als 10 %ige Suspension 12 h in 2 ml einer Lösung von 5% Formalin in PBS bei RT in einem 15 ml Falcon-Reaktionsgefäß unter stetigem Schwenken auf einem Wipptisch inkubiert, 3 min bei 900 x g zentrifugiert und anschließend zwei weitere Male mit PBS gewaschen.

Aus Erythrozyten mit den Merkmalen D, dd, CC, Cc, cc, EE, Ee, ee, JK<sup>a-b+</sup>, JK<sup>a+b-</sup>, JK<sup>a+b+</sup>, Fy<sup>0</sup>, Fy<sup>a+b-</sup>, Fy<sup>a-b+</sup>, Fy<sup>a+b+</sup>, kk, Kk (Immucor) und KK (Sanquin), sowie den in Formalin inkubierten Erythrozyten der Blutgruppen A<sub>1</sub>, B und 0 wurde eine 10%ige Suspension in PBS hergestellt.

Die Antikörper wurden entsprechend der in Tabelle 9 aufgeführten Konzentrationen mit PBS + 1% BSA verdünnt. Je 100 µl Antikörperlösung wurden mit 10 µl 10%iger Erythrozytensuspension in einer 96-well-Platte der Firma Nunc 30 min bei RT im Dunkeln gemäß Tabelle 10-12 inkubiert, und zweimal mit PBS gewaschen (Zentrifugation 5 min bei 400 x g).

Die mit primär unmarkierten Antikörpern versehenen Ansätze, wurden erneut mit Sekundärantikörper (Tabelle 9) 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert und zweimal mit 200 µl PBS gewaschen. Nach dem jeweiligen Abkippen des Überstandes wurde das verbleibende Zellpellet auf einem Rüttler wieder mit der Restflüssigkeit in Suspension gebracht. Es folgte das Überführen der Erythrozytensuspensionen mit 300 µl PBS in FACS-Röhrchen.

Primärantikörper	Isotyp	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
anti-A-FITC	IgG <sub>3</sub> -FITC	1/1000	-	
anti-B-FITC	IgG <sub>3</sub> -FITC	1/50	-	
anti-H	IgG <sub>1</sub>	1/100	IgG <sub>1</sub> -PE	1/100
anti-D-FITC	IgG-FITC	1/100	-	
anti-C	IgM	1/10	F(ab') <sub>2</sub> -FITC	1/50
anti-c	IgM	1/10		
anti-E	IgG	1/10		
anti-e	IgM	1/10		
anti-Jka	IgM	1/10		
anti-Jkb	IgM	1/10		
anti-K	IgM	unverdünnt		
anti-k	IgG	unverdünnt		
anti-DARC-PE	IgG <sub>2a</sub> -PE	unverdünnt		

Tabelle 9: Verdünnung der Antikörperlösungen für die FACS-Analyse der Erythrozyten

		Blutgruppenmerkmale der Erythrozyten								
		A	B	O	kk	Kk	KK	JK <sup>a+b+</sup>	JK <sup>a+b-</sup>	JK <sup>a-b+</sup>
Antikörper	anti-A-FITC	x	x	x						
	anti-B-FITC	x	x	x						
	anti-H	x	x	x						
	anti-K				x	x	x			
	anti-k				x	x	x			
	anti-Jka							x	x	x
	anti-Jkb							x	x	x

Tabelle 10: Pipettierschema für die Blutgruppensysteme ABO, Kell/cellano, Kidd

x = pipettiert, leer = nicht pipettiert

		Blutgruppenmerkmale der Erythrozyten							
		D	dd	cc	Cc	CC	ee	Ee	EE
Antikörper	anti-D-FITC	x	x						
	anti-C			x	x	x			
	anti-c			x	x	x			
	anti-E						x	x	x
	anti-e						x	x	x

Tabelle 11: Pipettierschema für das Rhesus Blutgruppensystem

x = pipettiert, leer = nicht pipettiert

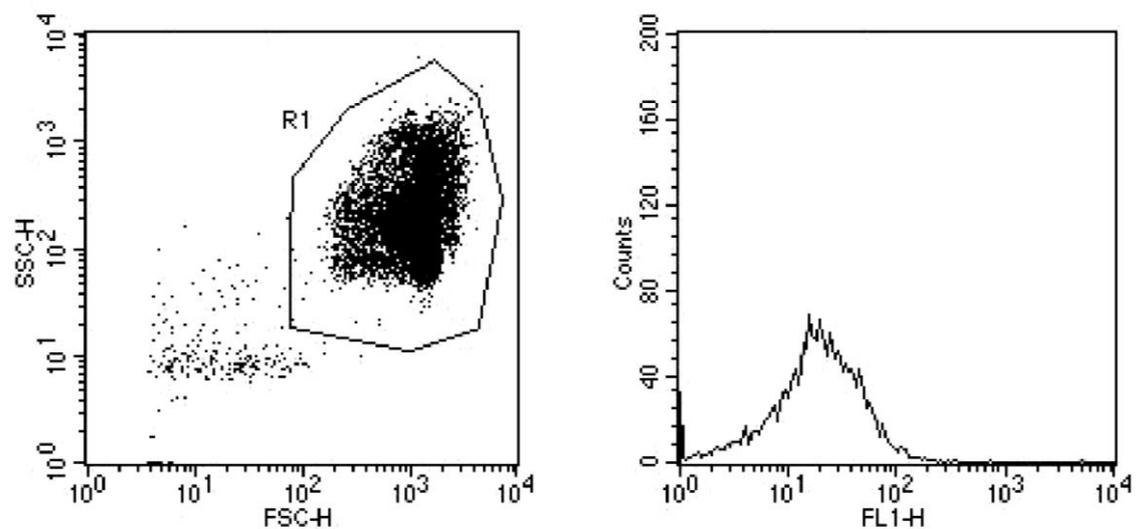
		Blutgruppenmerkmale der Erythrozyten			
		Fy <sup>a+b+</sup>	Fy <sup>a+b-</sup>	Fy <sup>a-b+</sup>	Fy <sup>a-b-</sup>
Antikörper	anti-DARC-PE	x	x	x	x

Tabelle 12: Pipettierschema für das Duffy Blutgruppensystem

x = pipettiert

Die Messung erfolgte mit dem Durchflusszytometer FACScan, das über einen Argon-Laser verfügt, die Auswertung mit der zugehörigen Software CellQuest Pro. Ausgehend von Routineeinstellungen wurden die genauen Messeinstellungen (Detektorspannungen für FSC, SSC, FL1, FL2, ihre Verstärkungen und der FSC-Schwellenwert) anhand der Isotypkontrollen durchgeführt.

In einem Punktwolkendiagramm (dot plot) mit den Parametern FSC und SSC wurde die Erythrozytenpopulation durch ihre charakteristische Lage identifiziert. Durch das Setzen eines sogenannten Gates (G1=R1) um die Erythrozytenwolke können die Zellen innerhalb des Gates separat in einem Histogramm hinsichtlich der Fluoreszenz betrachtet und Zelltrümmer mit kleineren FSC- und SSC-Werten ausgeblendet werden (Abb. 4). Der Endpunkt der Messung wurde mit 10000 Zellen innerhalb des Gates festgelegt.



**Abbildung 4: Punktwolkendiagramm mit den Parametern FSC und SSC**

Die Erythrozyten stellen sich als Punktwolke dar, die mit einem Gate G1 = R1 eingegrenzt (links), in einem Histogramm bezüglich FL1 betrachtet werden kann (rechts).

Die Intensitätswerte der Fluoreszenz (FL1 bzw. FL2; x-Achse) der Zellen innerhalb des Gates wurden nun in einem Histogramm gegen die Zellzahl (y-Achse) aufgetragen. Für die Quantifizierung der Positivität der untersuchten Zellen gegenüber ihrem Isotyp wurden so genannte Marker verwendet. Marker definieren Bereiche des Histogramms in denen eine bestimmte Anzahl von Zellen mit einer Fluoreszenz bis zu einer bestimmten Intensität liegt. Marker M2 wurde auf einen bestimmten Anteil der Zellen des Isotyps eingestellt. Die restlichen Zellen liegen in  $M1=100\% - M2$ . Im Beispiel (Abb. 5) ist  $M1 = 95\%$ ,  $M2 = 5\%$ . Unter Anwendung derselben Markereinstellungen auf die zu untersuchende Zellpopulation wurden nun Messungen mit  $M2 > 5\%$  als positiv gewertet.

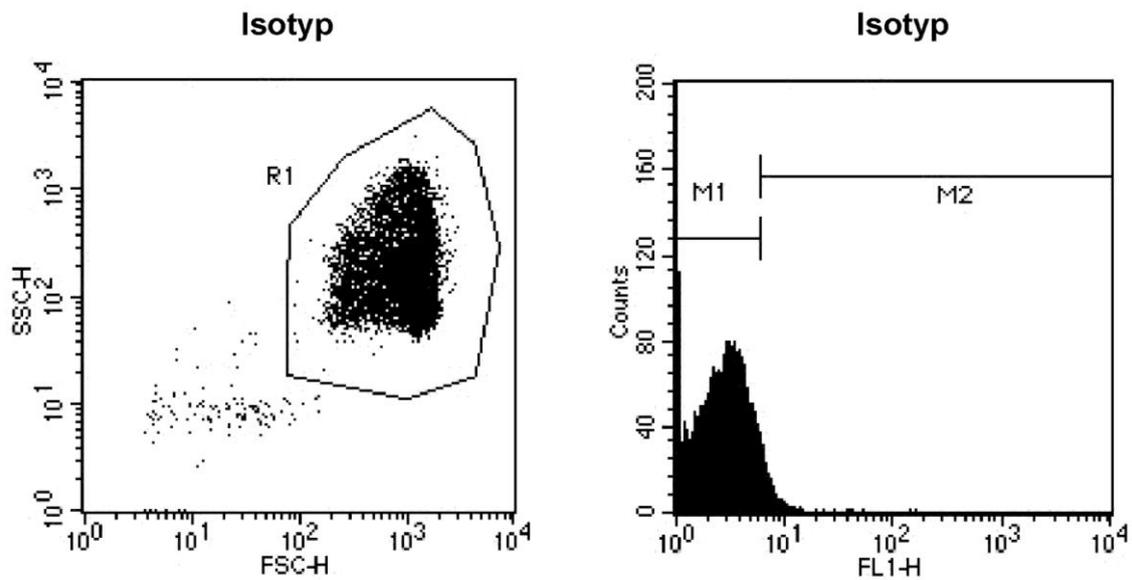


Abbildung 5: Auswahl des gates G1 = R1

G1 wird anhand des Punktwolkendiagramms der Isotypkontrolle gesetzt (links). Die Markereinstellungen wurden anhand der Verteilung der Isotypzellen in G1 = R1 hinsichtlich der Fluoreszenzintensität im Histogramm gewählt.

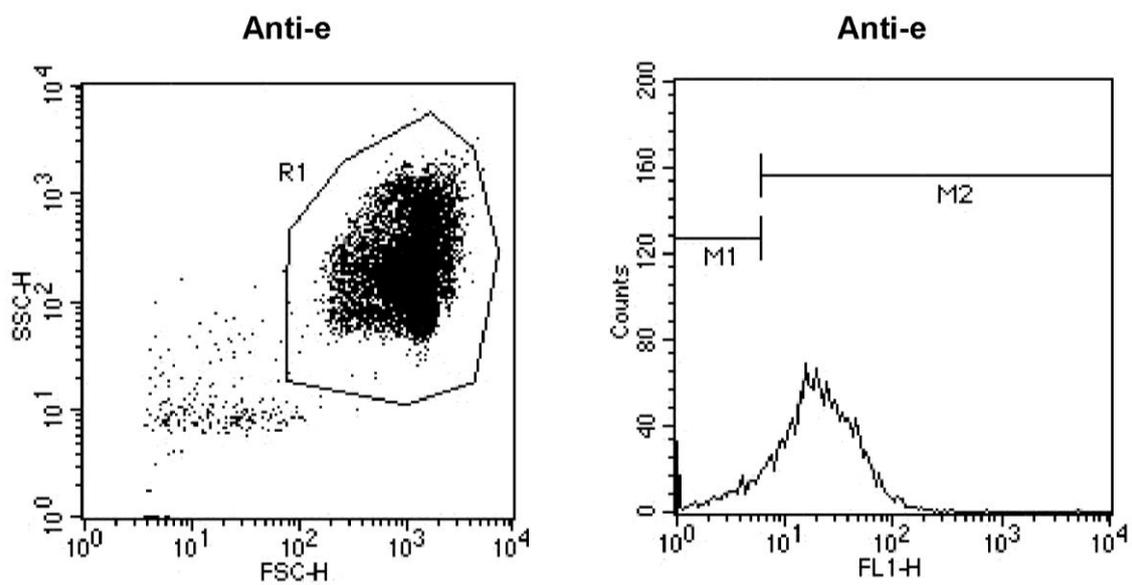


Abbildung 6: Beispiel: Lage der hinsichtlich Rhesus-e analysierten Zellen in G1 = R1 (links). Im Histogramm erschienen im gewählten Beispiel im Vergleich zum Isotyp M2 =85,3% als e-positiv

### 3.7 FACS-Analyse von MSC

Die frisch von der Zellkultur abgelösten MSC wurden zu je  $1 \times 10^5$  Zellen in 100  $\mu$ l FACS-Puffer in FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden 3 min bei 400 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet auf dem Vortex in 100  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert.

Die Antikörper wurden entsprechend der in Tabelle 13 aufgeführten Konzentrationen mit PBS + 1% BSA verdünnt. Je 10  $\mu$ l Antikörperlösung wurden mit 100 ml der Zellsuspension bei RT im Dunkeln gemäß Tabelle 14 inkubiert und zweimal mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation 3 min bei 400 x g), der Überstand jeweils abgekippt und das Zellpellet auf dem Vortex resuspendiert.

Die mit primär unmarkierten Antikörpern versehenen Ansätze, wurden erneut mit Sekundärantikörper (Tabelle 13) 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert, zweimal mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und die Zellen wie bereits beschrieben in 250  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert.

Unmittelbar vor der FACS-Analyse wurde zu jedem Ansatz 5  $\mu$ l 1/10 verdünnte 7-AAD Lösung (25 ng/Test) gegeben und die Proben 10 min auf Eis im Dunkeln inkubiert.

Primärantikörper	Isotyp	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
anti-A-FITC	IgG <sub>3</sub> -FITC	1/5, 1/10	-	
anti-B-FITC	IgG <sub>3</sub> -FITC	1/5	-	
anti-H	IgG <sub>1</sub>	1/10	IgG <sub>1</sub> -FITC/PE	1/50
anti-D-FITC	IgG-FITC	1/80	-	
anti-C	IgM	1/80	F(ab') <sub>2</sub> -FITC	1/50
anti-c	IgM	1/80		
anti-E	IgG	1/80		
anti-e	IgM	1/80		
anti-Jka	IgM	1/8		
anti-Jkb	IgM	1/8		

anti-K	IgM	1/80	F(ab') <sub>2</sub> -FITC	1/50
anti-k	IgG	1/4		
anti-DARC-PE	IgG <sub>2a</sub> -PE	unverdünnt	-	

Tabelle 13: Verdünnung der Antikörperlösungen für die FACS-Analyse der MSC

		MSC		
		H 93	H 95	H 98
		B CCD.ee kk	0 ccddee kk	A CcD.ee kk
		Fya-b+	Fya+b+	Fya+b+
		Jka+b+	Jka-b+	Jka++b++++
Antikörper	anti-A			
	anti-B			
	anti-H			
	anti-D			
	anti-C			
	anti-c			
	anti-E			
	anti-e			
	anti-Jka			
	anti-Jkb			
	anti-K			
	anti-k			
anti-DARC				

Tabelle 14: Pipettierschema MSC

x = pipettiert

Wie bereits bei der FACS Analyse der Erythrozyten beschrieben, wurde die MSC-Population anhand ihrer charakteristischen Lage im dot plot mit den Parametern FSC und SSC identifiziert und anhand der Verteilung der Isotyp-Zellen ein Gate G1=R1 für MSC definiert und für die Analyse der Blutgruppenantigene übernommen (Abb. 7). Mit Hilfe dieses Gates wurde zunächst mit FL3 die Fluoreszenzintensität von 7-AAD betrachtet (Abb. 8). Die Marker M1 und M2 wurden so gewählt, dass die 7-AAD positiven Zellen in M1,

die 7-AAD negativen in M2 liegen. Die Zellen innerhalb der Region R2 = M1 beim Isotyp und R3 = M1 bei der Messung des Blutgruppenantigens wurden in einem weiteren Histogramm der Betrachtung von FL1 bei Markierung mit FITC bzw. FL2 bei PE zugeführt. Abbildung 9 zeigt bei der Betrachtung von G4 = R1 + R2 und G5 = R1 + R3 die intakten und Antigen-positiven Zellen unter Verwendung eines Markers M3, der anhand des Isotyps gesetzt wurde.

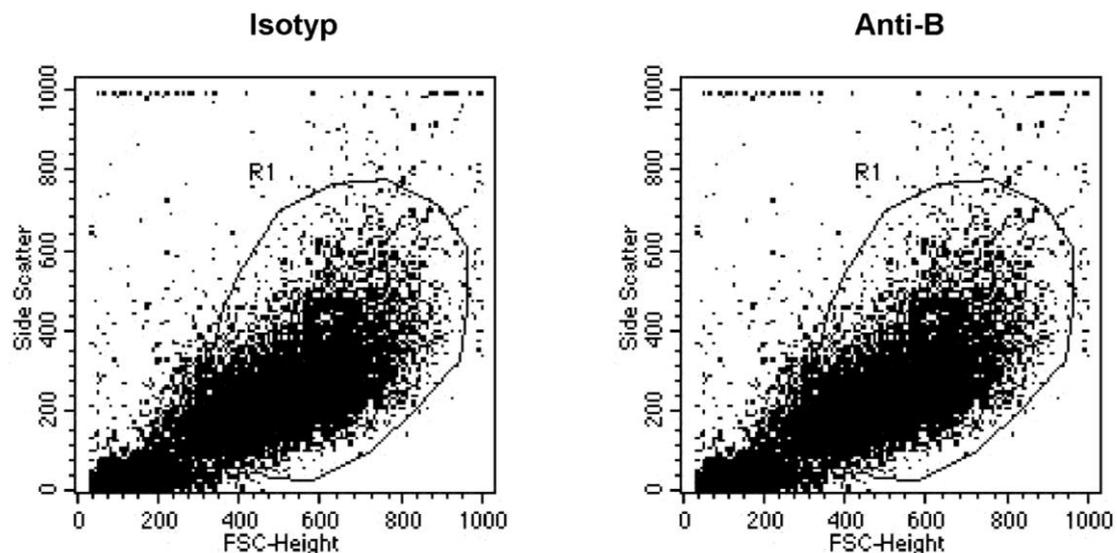


Abbildung 7: Beispiel: Setzen von G1 = R1 im Punktwolkendiagramm des Isotyps und Verteilung der hinsichtlich Blutgruppenantigen B untersuchten MSC in G1

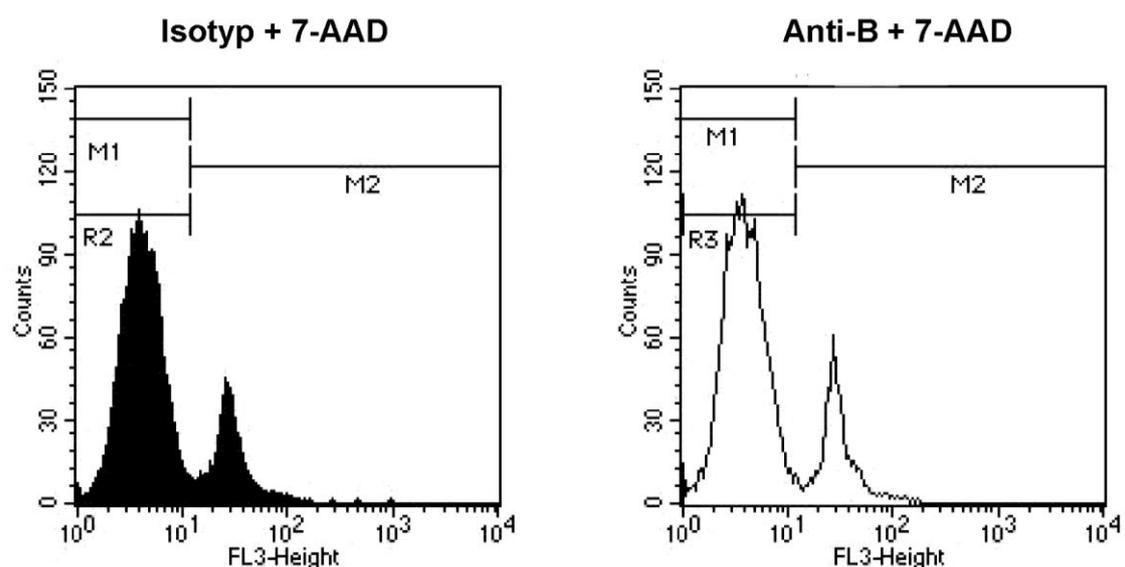
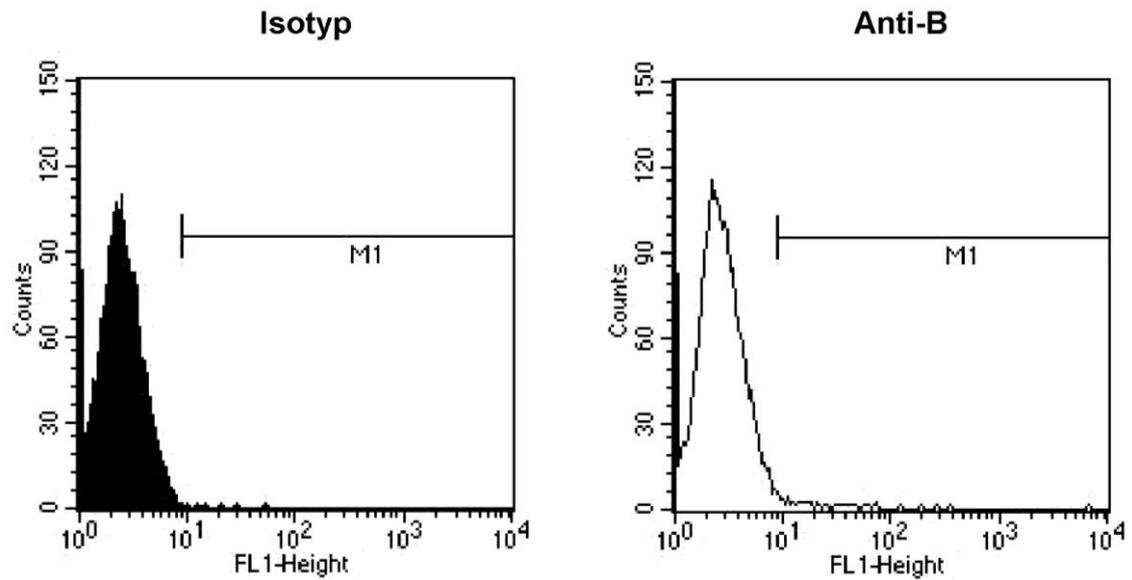


Abbildung 8: Setzen der Marker M1 und M2  
Definieren von R2 = M2 bzw. R3 = M3

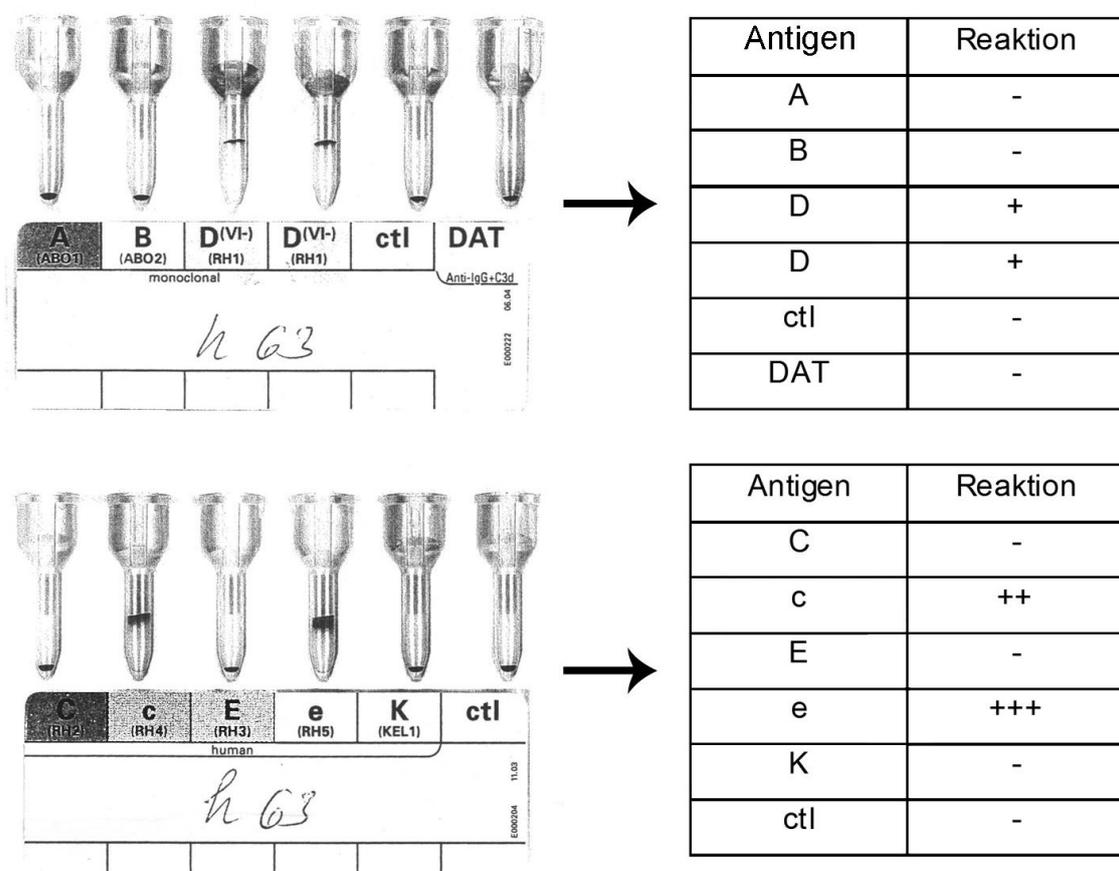


**Abbildung 9: Betrachtung der MSC mit Isotyp- und Blutgruppen Antikörper**  
Betrachtet wird der Isotyp in  $G4 = R1 + R2$ . Setzen von M1 (links) und Betrachtung der MSC mit Blutgruppenantikörper (hier Anti-B) in  $G5 = R1 + R3$  hinsichtlich FL1 (rechts)

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Serologische Blutgruppenbestimmung der MSC Spender

Zur Auswertung der Antigenprofile wurde die Agglutination in den Gelen der Karten semiquantitativ bewertet. Agglutinate sind nach Zentrifugation auf der Geloberfläche detektierbar. (Abb. 10)



**Abbildung 10: Serologische Blutgruppenbestimmung**

Exemplarische Darstellung der ID-Karten „DiaClon AB0/D+DAT“ und „DiaClon Rh subgroups + K“ mit semiquantitativer Beurteilung der Agglutination unter Verwendung von Erythrozyten vom Spender der MSC-Population h63. Ermittelter Phänotyp: 0 ccD.ee kk. Ctl = Negativkontrolle, DAT = direkter Antihumanglobulintest; Negativ: - Positiv: + bis stark positiv +++

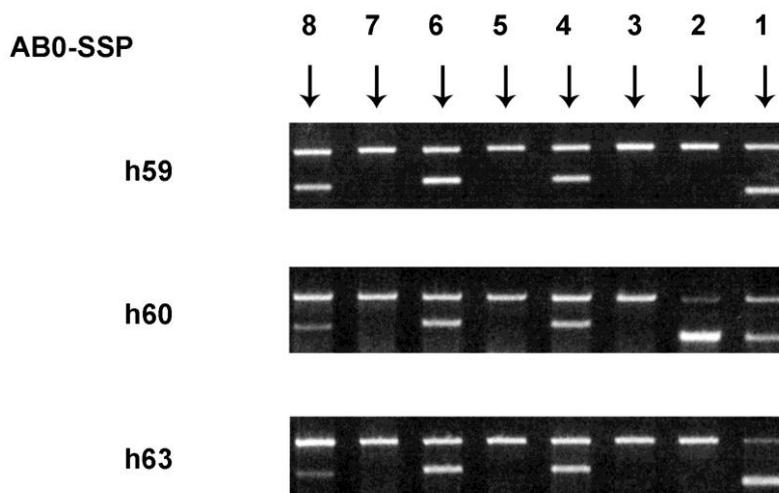
Für die untersuchten Populationen h59, h60, h63, h93, h95 und h98 wurden die in Tabelle 15 dargestellten Blutgruppen ermittelt.

MSC Population	Blutgruppenphänotyp				
h 59	0	ccddee	kk	Fy <sup>a-b+</sup>	JK <sup>a+b+</sup>
h 60	A <sub>1</sub>	CcDEe	Kk	Fy <sup>a-b+</sup>	JK <sup>a-b+</sup>
h 63	0	ccD.ee	kk	Fy0	JK <sup>a+b-</sup>
h 93	B	CCD.ee	kk	Fy <sup>a-b+</sup>	JK <sup>a+b</sup>
h 95	0	ccddee	kk	Fy <sup>a+b+</sup>	JK <sup>a-b+</sup>
h 98	A	CcD.ee	kk	Fy <sup>a+b+</sup>	JK <sup>a+b+</sup>

**Tabelle 15: Serologische Bestimmung des Blutgruppenphänotyps auf Erythrozyten der MSC-Spender**

## 4.2 Genomische PCR der MSC

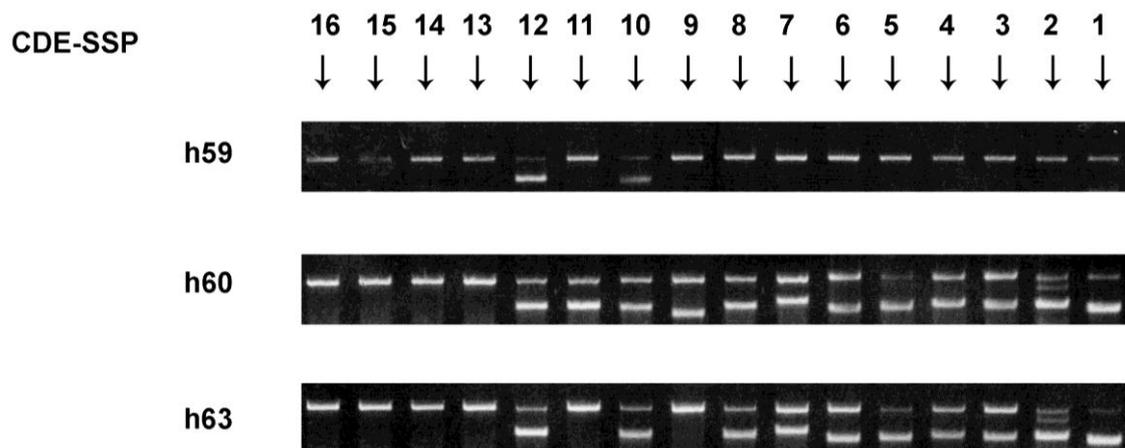
Die genomische SSP-PCR der MSC konnte bei allen verwendeten MSC-Populationen durchgeführt werden. Der Genotyp der MSC stimmte mit dem serologisch bestimmten Phänotyp der Erythrozyten vom jeweiligen Spender (Tab. 15) überein. Für die Populationen h93, h95 und h98 wurde auf eine genomische PCR verzichtet. Die Abbildungen 11-13 zeigen Fotos der PCR-Gele mit dem Nachweis der blutgruppenspezifischen Amplifikate als Banden. Die Tabellen 16-18 zeigen die detektierten PCR-Produkte für die Populationen h59, h60 und h63 und den daraus ermittelten Genotyp.



**Abbildung 11: Genomische ABO-PCR der MSC Populationen h59, h60 und h63**

Primermix Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8		
PCR-Produkt (Größe in bp)	134	133	194	193	195	194	172	173		
Bezeichnung	O <sub>1</sub>	Non O <sub>1</sub>	O <sub>2</sub>	Non O <sub>2</sub>	B	Non B	A <sub>2</sub>	Non A <sub>2</sub>		
Ergebnis:									Geno typ	Phäno typ
h59	+	-	-	+	-	+	-	+	O <sup>1</sup> O <sup>1</sup>	O
h60	+	+	-	+	-	+	-	+	O <sup>1</sup> A	A
h63	+	-	-	+	-	+	-	+	O <sup>1</sup> O <sup>1</sup>	O

**Tabelle 16: Bezeichnung und Größe der PCR-Produkte der genomischen ABO-PCR. Ermittlung des ABO-Geno- und Phänotyps aus den Banden in Abb. 11**



**Abbildung 12: Genomische Rhesus CDE-PCR  
MSC Populationen h59, h60 und h63**

Primermix Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
PCR-Produkt (Größe in bp)	124	148 305	139	152 303	130	122	186	147
Bezeichnung	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub> , C D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>	D <sub>5</sub> psi	D <sub>6</sub>	D <sub>7</sub>	D <sub>9</sub>	D <sub>10</sub>
Ergebnis:								
h59	-	-	-	-	-	-	-	-
h60	+	+	+	+	+	+	+	+
h63	+	+	+	+	+	+	+	+

Primermix Nr.	9	10	11	12	13	14	15	16
PCR-Produkt (Größe in bp)	106 298	145	157	155	166 107	166 165	139 135	139 133
Bezeichnung	C „W“	c	E	e	D <sup>VII</sup> DHMi	D <sup>VII</sup> DAU	DNB 697A	DNB 697C
Ergebnis:								
h59	-	+	-	+	-	-	-	-
h60	+	+	+	+	-	-	-	-
h63	-	+	-	+	-	-	-	-

Tabelle 17: Bezeichnung und Größe der PCR-Produkte der genomischen CDE-PCR.

Ermittlung des CDE-Genotyps aus den Banden in Abb. 12

Es ergeben sich folgende Rhesusformeln: h59 ccddee, h60 CcD.Ee, h63 ccD.ee.

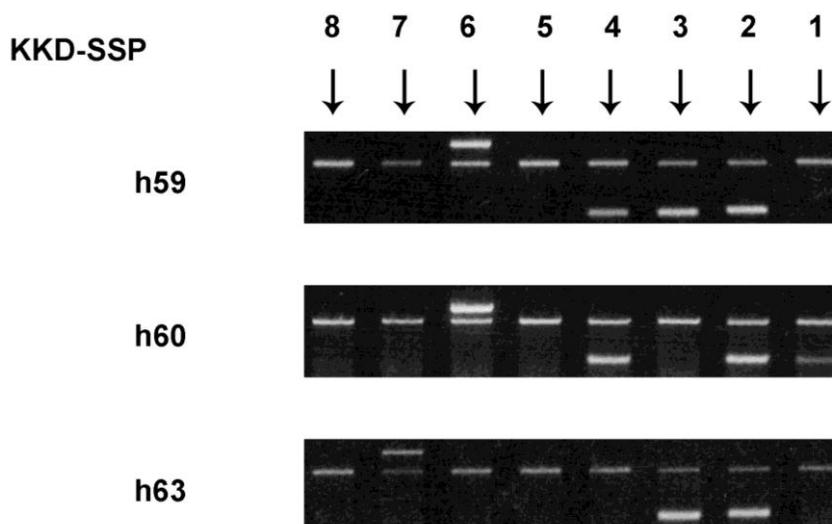


Abbildung 13: Genomische KKD (Kell, Kidd und Duffy)-PCR  
MSC Populationen h59, h60 und h63

Primer mix Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
PCR-Produkt (Größe in bp)	141	141	131	131	720	720	720	187
Allel	KEL1	KEL2	JK*A	JK*B	FY*A	FY*B	FY*null 01	FY*X
Glyko-protein	Kell	Cellano	JK <sup>a</sup>	JK <sup>b</sup>	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup> , Fy <sup>bweak</sup>	Fy <sup>null</sup>	Fy <sup>bweak</sup>
Ergebnis:								
h59	-	+	+	+	-	+	-	-
h60	+	+	-	+	-	+	-	-
h63	-	+	+	-	-	-	+	-

**Tabelle 18: Bezeichnung und Größe der PCR-Produkte der genomischen KKD-PCR. Ermittlung des KKD-Genotyps aus den Banden in Abb. 13**

### 4.3 RT-PCR der MSC

Alle untersuchten MSC Populationen exprimierten FUT1, RHCE, KEL und Kidd (HUT11) mRNA. RHCE und Kidd mRNA fand sich durchgängig in allen untersuchten Passagen. FUT1 mRNA ließ sich bei h60 und h63 in Passage 2 (P2), bei h95 in P1 und P3 und bei h93 und h98 in P1-P3 nachweisen. KEL fand sich in h59 P1, h60 P1, h63 P2, h93 P1 und P2, h95 P1 und P3, h98 P1 und P2. DARC mRNA war in h63 P2, h93 P2, h95 P1 und P3 und in h98 P2 nachzuweisen. Messenger-RNA der AB0-Glykosyltransferase (AB0), Rhesus-D (RHD) und mRNA des Rhesus-Assoziierten Glykoproteins (RHAG) wurden von den untersuchten MSC nicht exprimiert. (Abb.14-16)

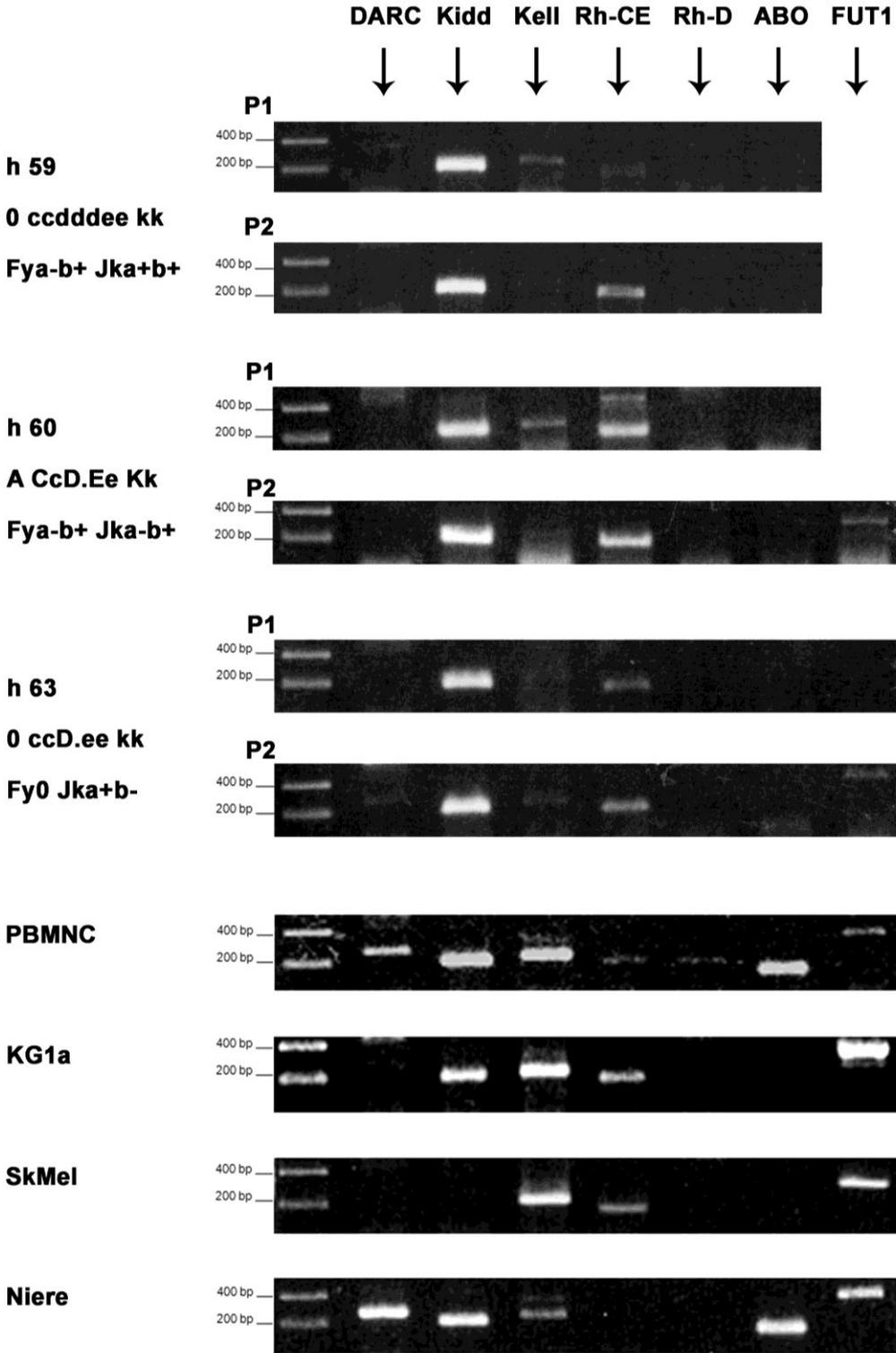


Abbildung 14: Expression von Blutgruppen-mRNA in undifferenzierten MSC, Populationen h59, h60, h63

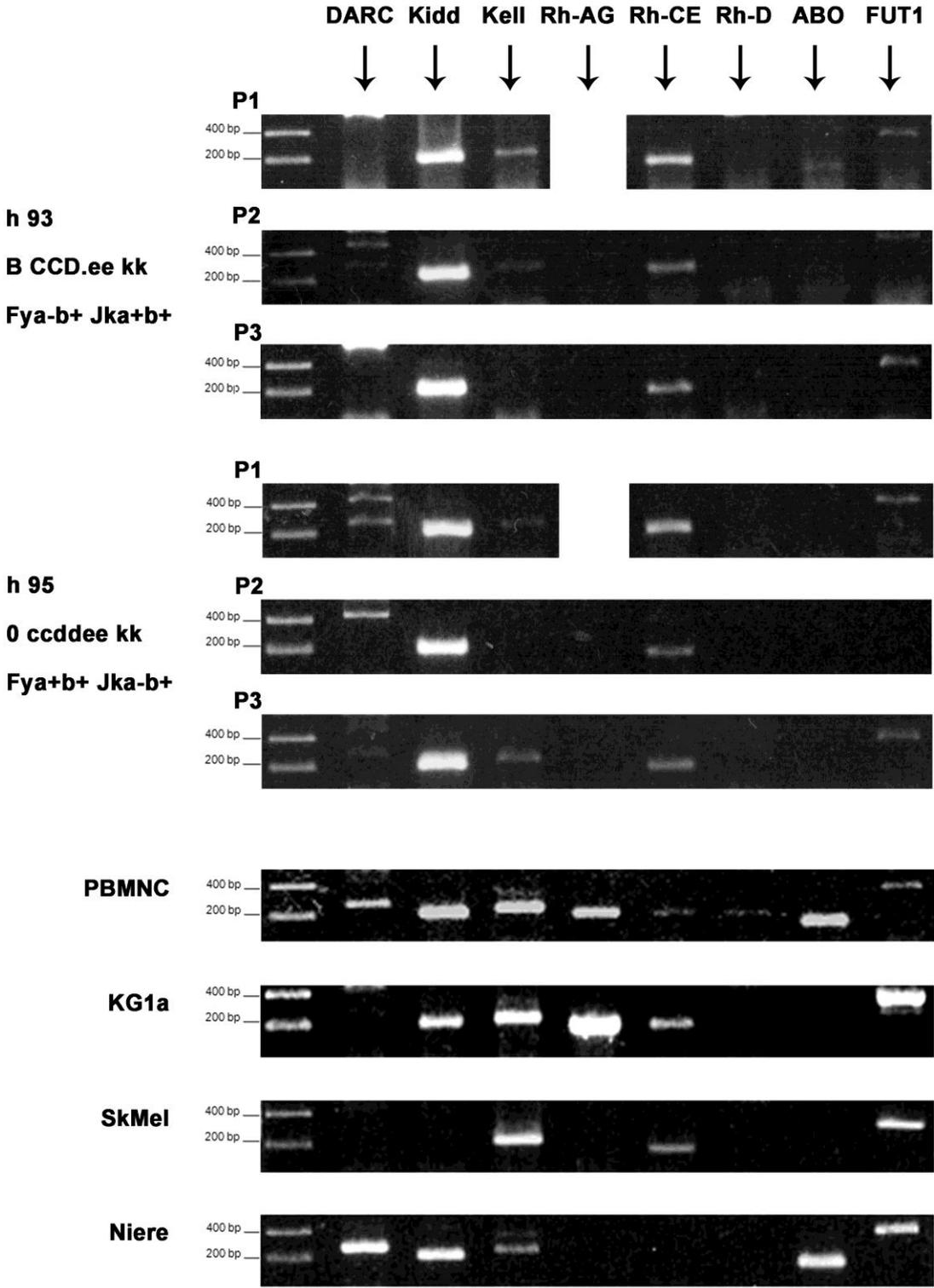


Abbildung 15: Expression von Blutgruppen-mRNA in undifferenzierten MSC, Populationen h93, und h95

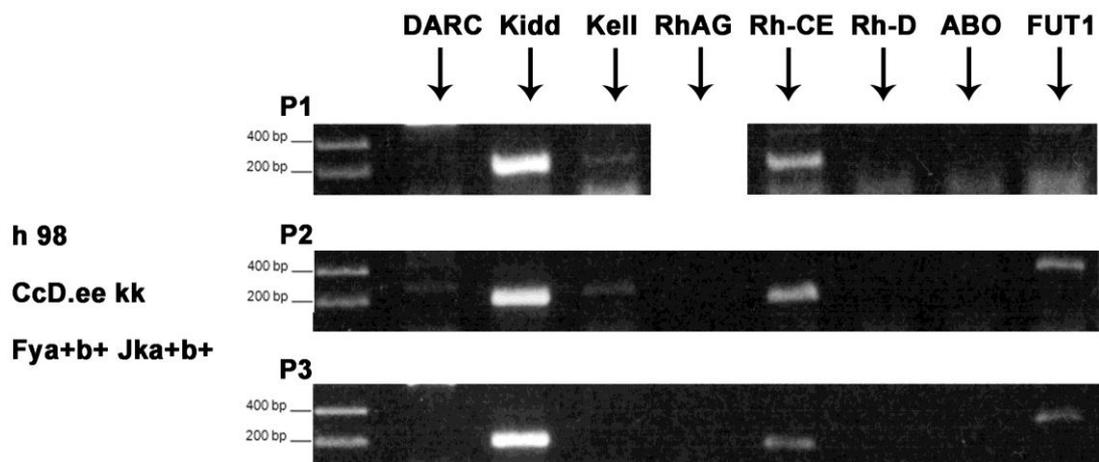


Abbildung 16: Expression von Blutgruppen-mRNA in undifferenzierten MSC, Population h98

#### 4.4 Etablierung der FACS-Analyse von Erythrozyten

Im Rahmen der Etablierung des FACS-Protokolls für die Blutgruppenantigene A, B und H stellte sich die Fixierung der Erythrozyten mit 5% Formaldehyd in PBS über 12h als adäquates Mittel zur Verhinderung einer Agglutination heraus.

Nicht mit Formalin inkubierte Zellen neigten insbesondere bei höheren Antikörperkonzentrationen zur Agglutination (Tabelle 19). Bei Formalinfixierung zeigte keine der Proben eine Agglutination. Die in 3.6 (Tabelle 9) aufgeführten Verdünnungen stellten sich als optimal heraus.

	Antikörper-Verdünnungen			
	unverdünnt (10µg)	1:10 (5µg)	1:100 (0,5µg)	1:1000 (0,05µg)
A-Erythrozyt + Anti-A	A	A	A	A
B-Erythrozyt + Anti-B	A	A	∅	∅
H-Erythrozyt + Anti-H	A	A	A	∅

**Tabelle 19: Optisch erkennbare Agglutination der nicht mit Formalin inkubierten Proben der Titrationsreihe, abgelesen unmittelbar vor der FACS-Messung. A =Agglutination, ∅ = keine Agglutination**

Bei der FACS-Analyse stellen sich die Erythrozytenagglutinate bei den nicht in Formalin inkubierten Zellen in R2 in Abb. 17 als Punkte mit hohen FSC- und SSC-Werten dar. Bei den mit Formalin vorbehandelten Erythrozyten sind entsprechend in Region R2 keine Zellen zu finden. Die Region R1 wurde entsprechend der Erythrozytenwolke des Isotyps (nicht gezeigt) gewählt und beinhaltet alle Erythrozyten inklusive der Agglutinate. Desweiteren fanden sich in den Messungen mit Formalin wesentlich weniger Zelltrümmer, dargestellt als Punkte außerhalb R1.

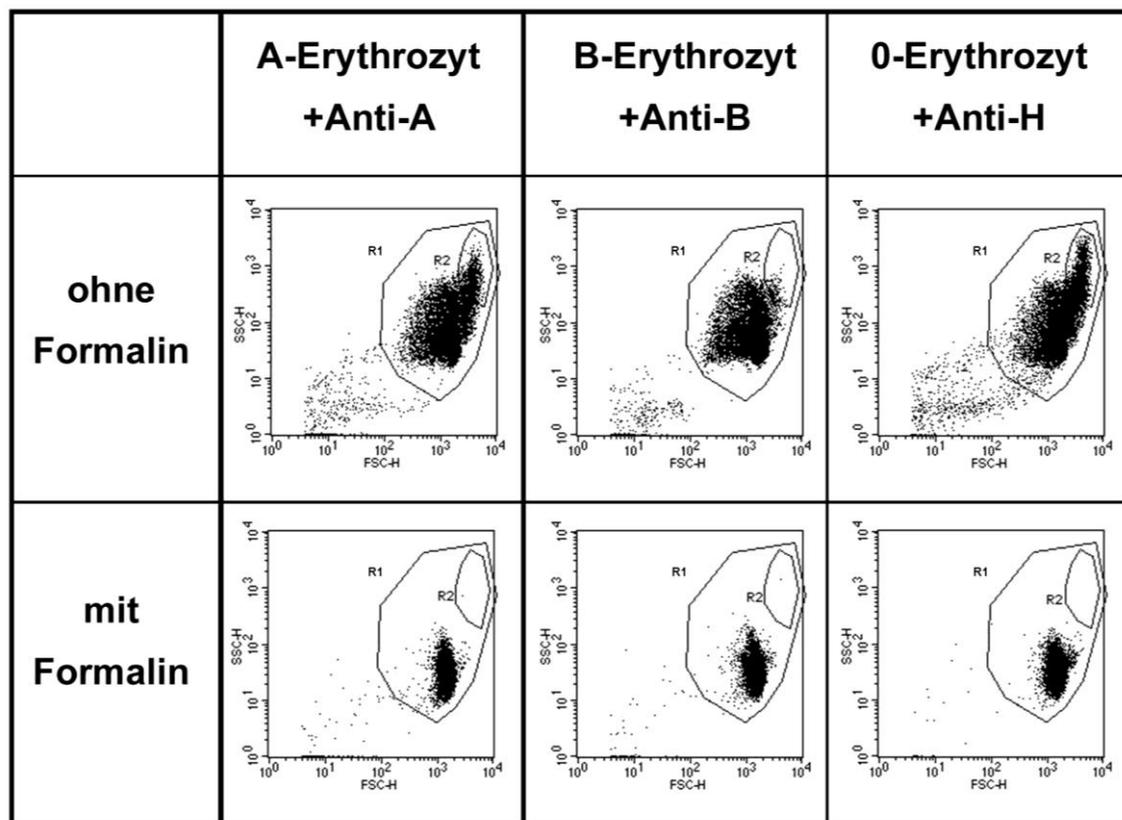
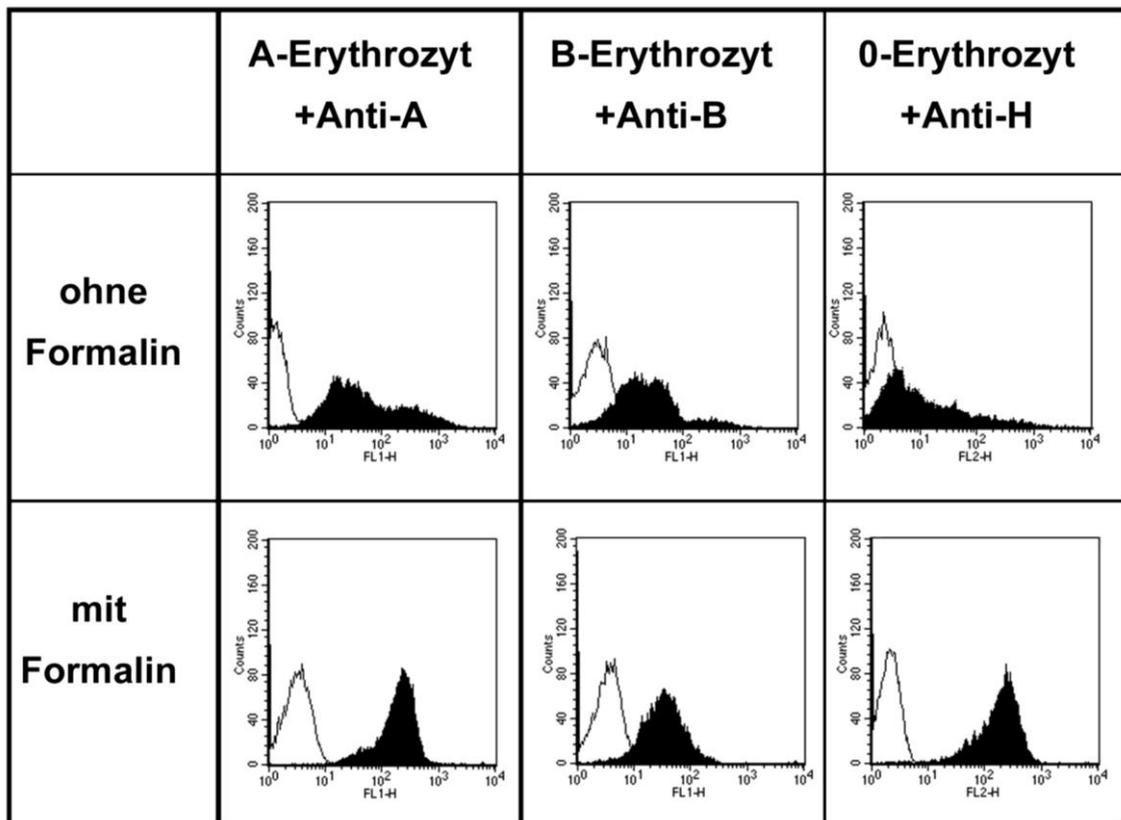


Abbildung 17: Repräsentative dot plots der FACS-Messungen für A-, B-, bzw. H-Antigen positive Zellen mit und ohne Formalin im Vergleich.

Bei Betrachtung der Fluoreszenzintensitäten der Erythrozyten in R1, zeigte sich, dass diese sich bei Formalininkubation in wesentlich schärfer begrenzten Bereichen bewegen (Abb. 18).



**Abbildung 18: Histogramme der in Abb. 17 dargestellten Messungen für R1  
Isotyp: Linie; Anti-A, -B bzw. -H: ausgefüllte Kurve**

Bei 3 gemachten Versuchen ließen sich die in Tabelle 20 gezeigten, arithmetischen Mittelwerte berechnen. Die Zellen stellten sich in Übereinstimmung mit dem bekannten Phänotyp dar. Werte < 4% wurden definiert als durch unspezifische Bindung des Antikörpers verursacht. Nachdem zunächst Erythrozyten von Tübinger Blutspendern für die Durchflusszytometrie verwendet wurden, wurden aus Gründen der einfacheren Handhabung im Weiteren für das ABO-System, sowie für die Blutgruppensysteme Rhesus, Kell, Kidd und Duffy kommerziell erhältliche Erythrozyten verwendet, mit denen sich die bereits erhobenen Ergebnisse bestätigen ließen (Tabelle 21).

Erythrozyten	Antikörper		
	Anti-A	Anti-B	Anti-H
A	94,9%	3,8%	35,7%
B	3,5%	90,1%	67,5%
0	2,3%	2,1%	95,0%

**Tabelle 20: Expression der Blutgruppen A, B, 0 auf Erythrozyten (IKET Tübingen) mit bekanntem Phänotyp**

Erythrozyten	Antikörper		
	Anti-A	Anti-B	Anti-H
A	94,6%	0,7%	19,9%
B	0,1%	49,5%	72,6%
0	0,6%	0,5%	94,9%

**Tabelle 21: Expression der Blutgruppen A, B, 0 auf Erythrozyten (Fa. Biotest) mit bekanntem Phänotyp**

Auch die Expression der Blutgruppenantigene Rhesus -D, -C, -c, -E, -e ließ sich entsprechend dem bekannten Phänotyp mit der FACS-Analyse auf Erythrozyten nachweisen (Tabelle 22). Abb. 19-24 zeigen repräsentative Histogramme.

Rhesus-Phänotyp der Erythrozyten	Antikörper				
	Anti-D	Anti-C	Anti-c	Anti-E	Anti-e
CCD.ee	88,6%	92,5%	2,3%	0%	85,3%
Ccddee	0%	94,2%	75,5%		
ccD.EE		0%	81,2%	93,8%	0%
ccddEe				72,5%	53,0%

**Tabelle 22: Expression der Rhesusantigene auf Erythrozyten mit bekanntem Phänotyp**

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde die FACS-Analyse mit einem zweiten Sortiment Erythrozyten 2-fach wiederholt. Tabelle 23 zeigt die Mittelwerte aus diesen Versuchen.

Rhesus-Phänotyp der Erythrozyten	Antikörper				
	Anti-D	Anti-C	Anti-c	Anti-E	Anti-e
CCD.ee		91,7%	1,8%	1,6%	88,8%
CcD.Ee	94,5%	83,3%	48,6%	73,5%	80,9%
ccD.EE		0,5%	61,2%	82,1%	1,5%
Ccddee	0,0%	0,6%	47,2%	0,1%	61,1%

**Tabelle 23: Expression der Rhesusantigene auf Erythrozyten mit bekanntem Phänotyp (Wiederholungsversuch)**

Auch die Antigene Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, K, k und DARC ließen sich mit den verwendeten Antikörpern mittels FACS nachweisen. Tabelle 24 zeigt den Mittelwert bei 3 gemachten Versuchen.

Erythrozyten	Antikörper		Erythrozyten	Antikörper		Erythrozyten	Antikörper
	Anti-K	Anti-k		Anti-Jka	Anti-Jkb		
KK	94,7%	2,6%	Jka+b+	79,1%	42,2%	Fya+b+	83,8%
Kk	90,0%	30,4%	Jka+b-	88,0%	2,1%	Fya+b-	88,0%
kk	0%	58,5%	Jka-b+	2,2%	52,8%	Fy0	2,8%

**Tabelle 24: Expression der Blutgruppenantigene Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, K, k und DARC auf Erythrozyten mit bekanntem Phänotyp**

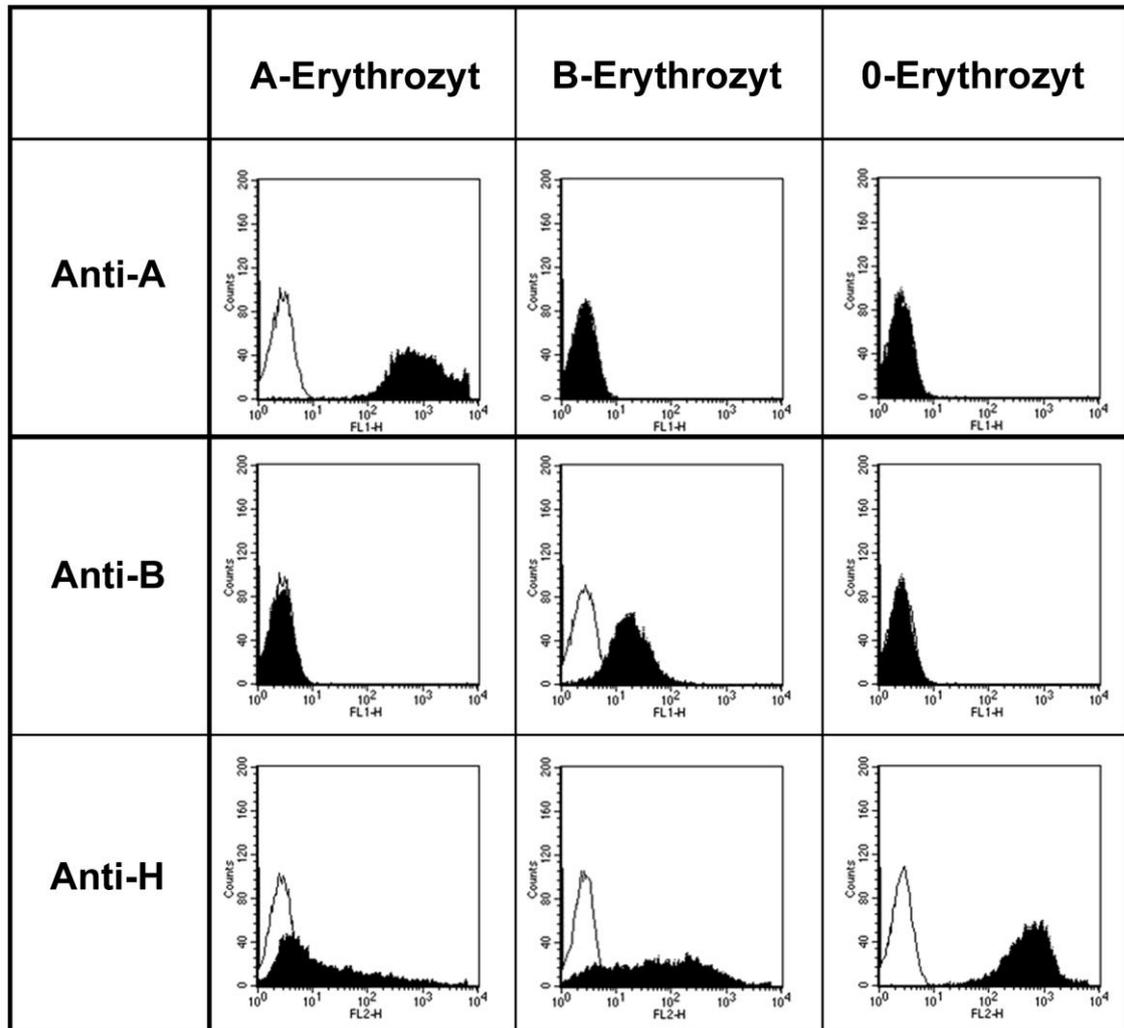


Abbildung 19: Detektion von A-, B-, und H-Antigen auf Erythrozyten mittels FACS  
Isotyp: Linie; Anti-A, Anti-B bzw. Anti-H: Ausgefüllte Kurve.

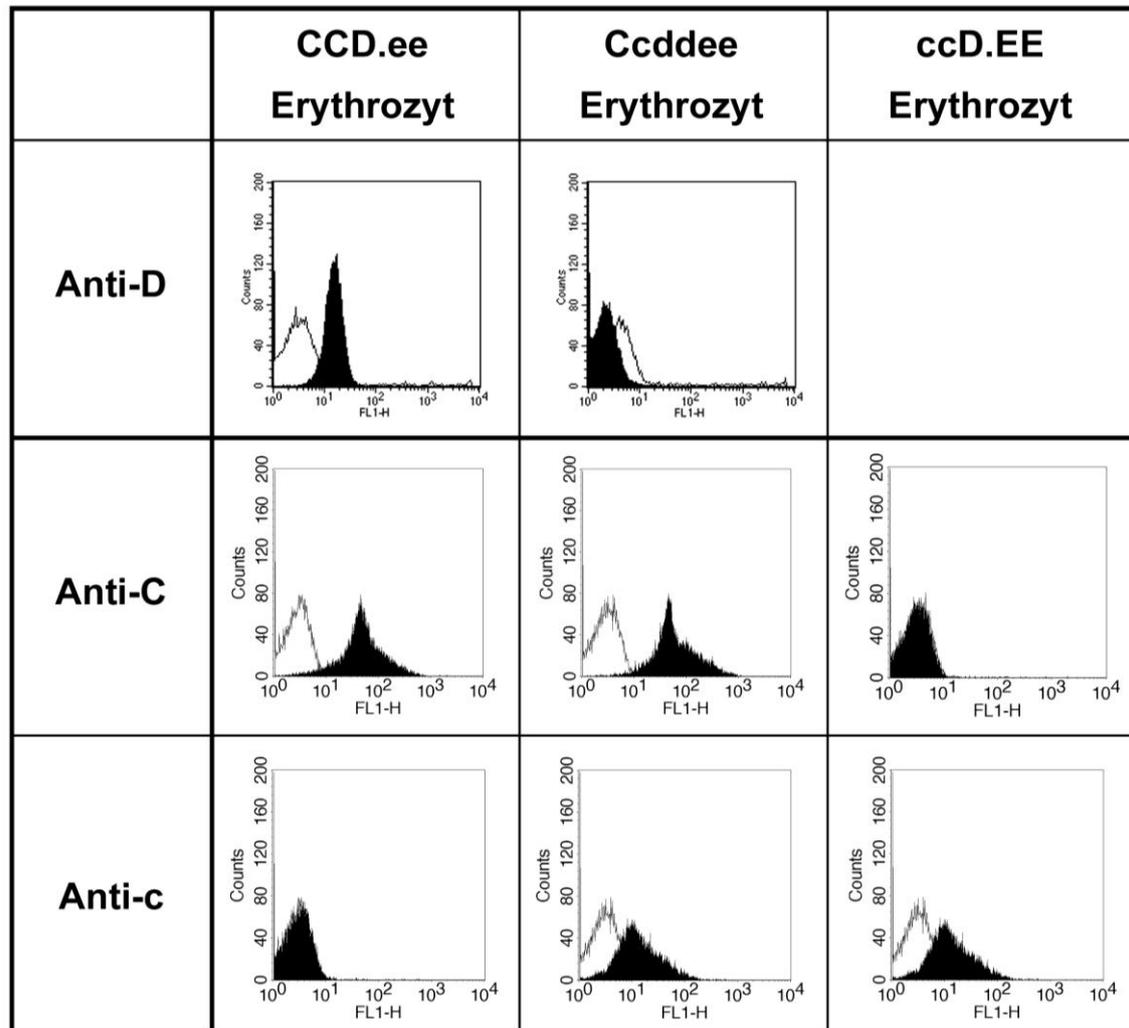
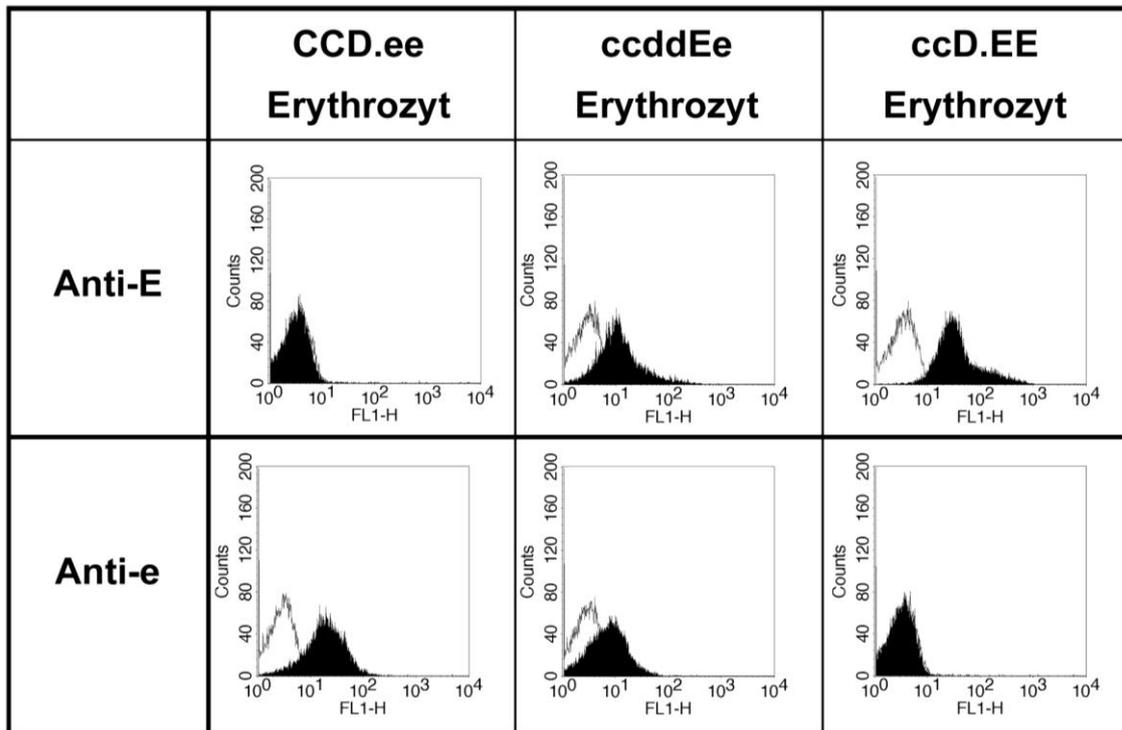


Abbildung 20: Detektion von Rhesus-D-, -C- und -c-Antigen auf Erythrozyten mittels FACS

Isotyp: Linie; Anti-D, Anti-C bzw. Anti-c: Ausgefüllte Kurve.



**Abbildung 21: Detektion von Rhesus-E- und -e-Antigen auf Erythrozyten mittels FACS**  
Isotyp: Linie; Anti-E, bzw. Anti-e: Ausgefüllte Kurve.

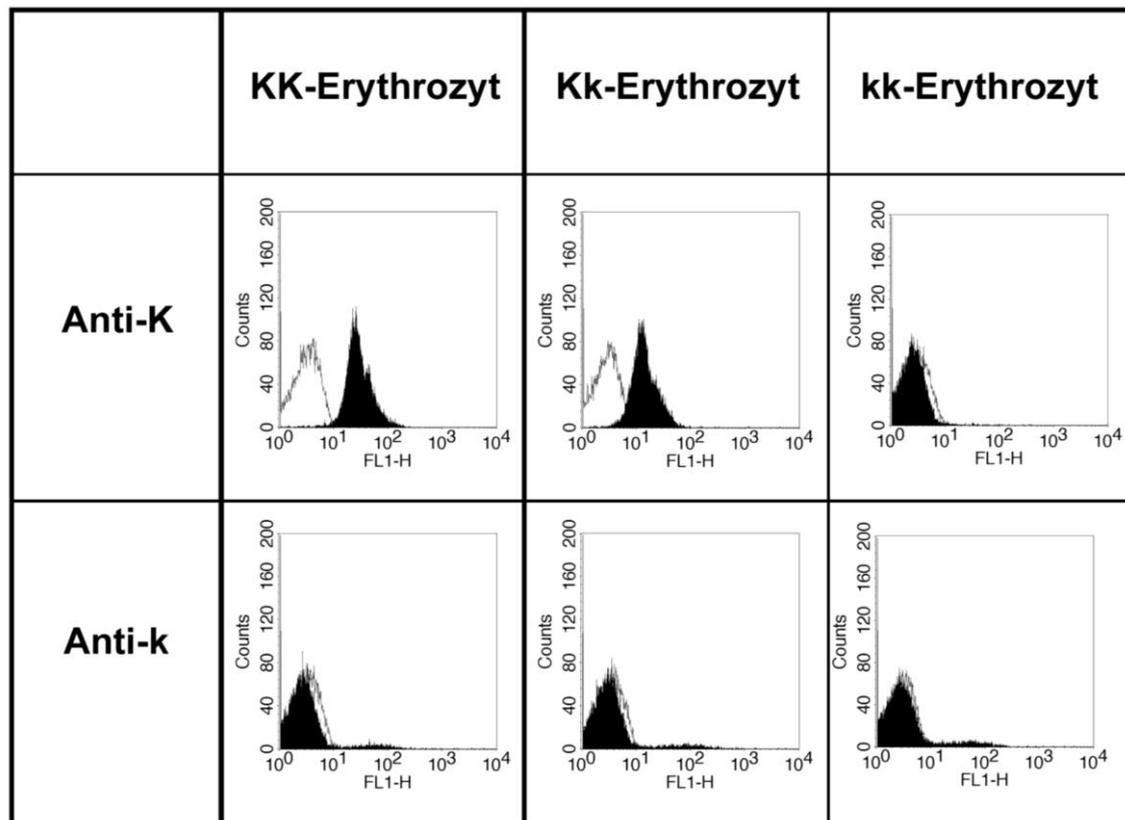


Abbildung 22: Detektion der Antigene Kell (K) und Cellano (k) auf Erythrozyten mittels FACS

Isotyp: Linie; Anti-K, bzw. Anti-k: Ausgefüllte Kurve.

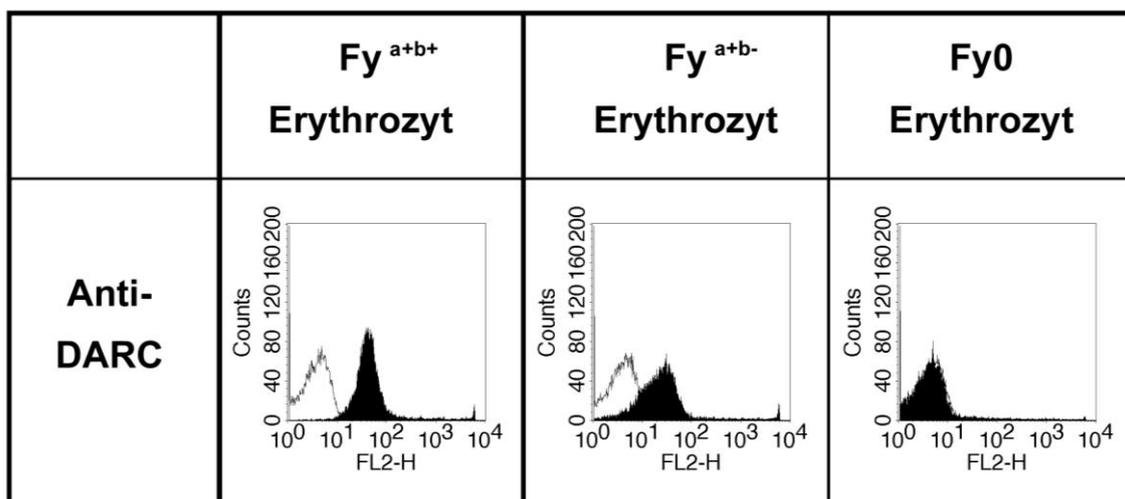


Abbildung 23: Detektion von DARC auf Erythrozyten mittels FACS

Isotyp: Linie; Anti-DARC: Ausgefüllte Kurve.

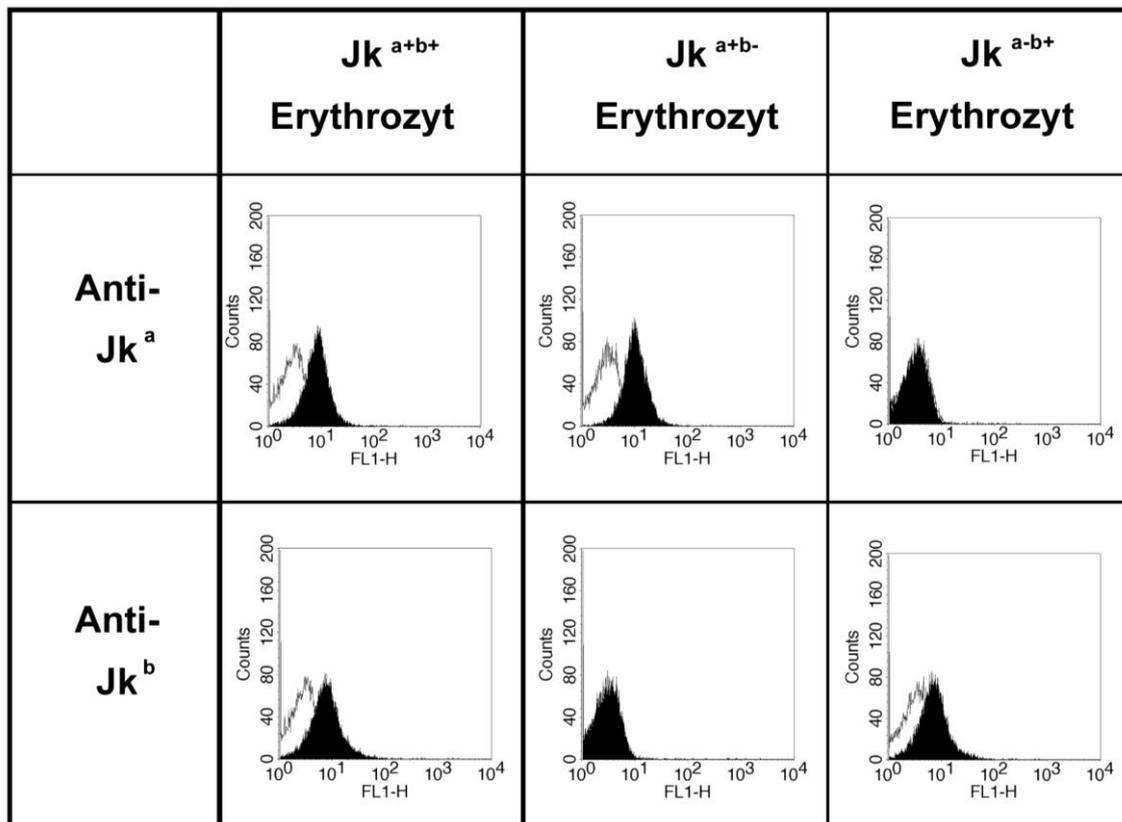
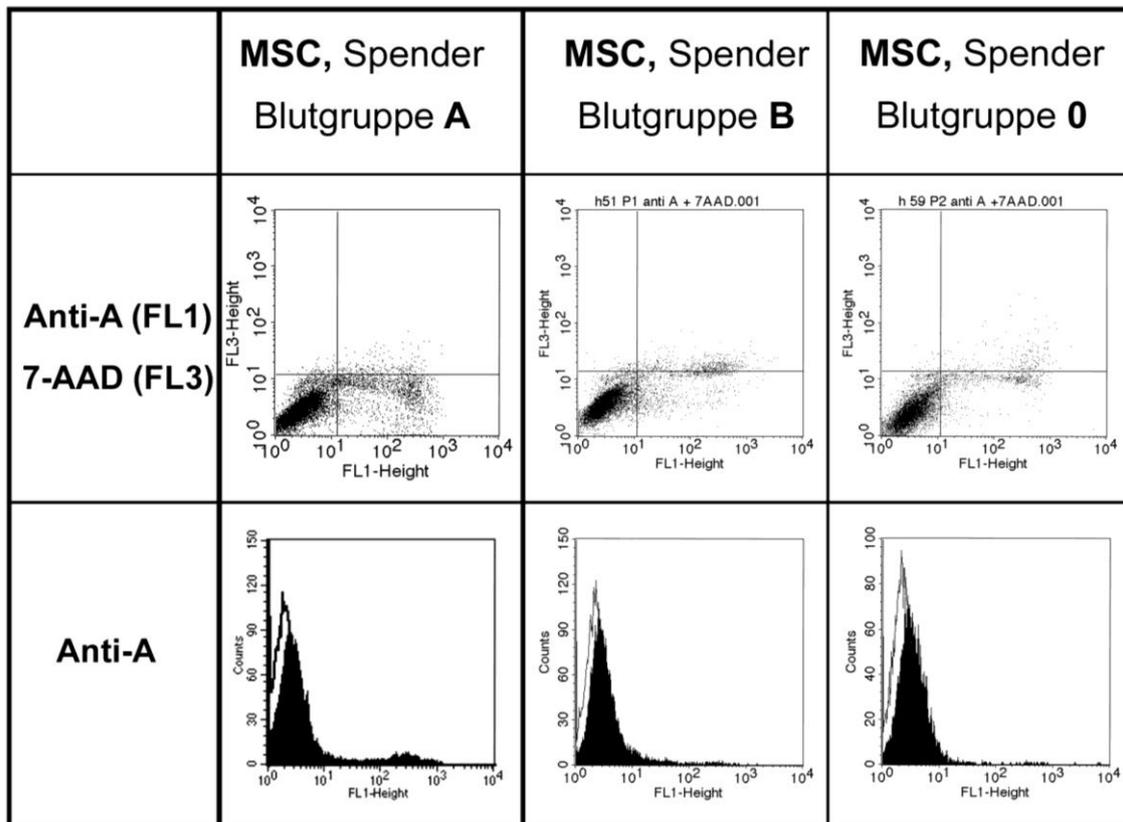


Abbildung 24: Detektion von Jk<sup>a</sup>- und Jk<sup>b</sup>-Antigen auf Erythrozyten mittels FACS  
Isotyp: Linie; Anti-Jk<sup>a</sup>, bzw. Anti-Jk<sup>b</sup>: Ausgefüllte Kurve.

#### 4.5 FACS-Analyse von MSC

Bei der Etablierung der FACS-Analyse der Blutgruppenantigene A, B und H bei MSC zeigten erste Versuche mit in FCS kultivierten MSC eine Positivität von Antigen A auf MSC von Spendern sowohl der Blutgruppe A als auch der Blutgruppen B und 0 (Abb. 25), trotz fehlendem Nachweis von ABO Transferase mRNA, was den Schluss nahe legte, dass es sich dabei um Artefakte handelt. Bei in AB-Serum kultivierten Zellen traten die bei Zellkultur mit FCS beobachteten Artefakte nicht auf, was darauf hindeutet, dass diese als durch FCS bedingte Artefakte anzusehen sind.



**Abbildung 25: FACS-Analyse von mit FCS kultivierten MSC**

Sowohl bei Spendern der Blutgruppe A wie auch der Blutgruppen B und O zeigen sich in der Analyse ein Teil der Zellen Anti-A positiv und 7-AAD negativ. Sie stellen sich in den dot plots als Punkte im rechten unteren Quadranten, in den Histogrammen als Verschiebung der ausgefüllten Kurve gegenüber der Linie nach rechts dar. Isotyp: Linie; Anti-A: Ausgefüllte Kurve.

In AB-Serum kultivierte MSC stellten sich in der FACS-Analyse als negativ für die Antigene A, B, Rhesus-D, Rhesus-C, Rhesus-c, Rhesus-E, Rhesus-e, Kell, Cellano, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup> und DARC dar. MSC der Blutgruppe 0 waren leicht positiv für Antigen H. (Abb. 26-31)

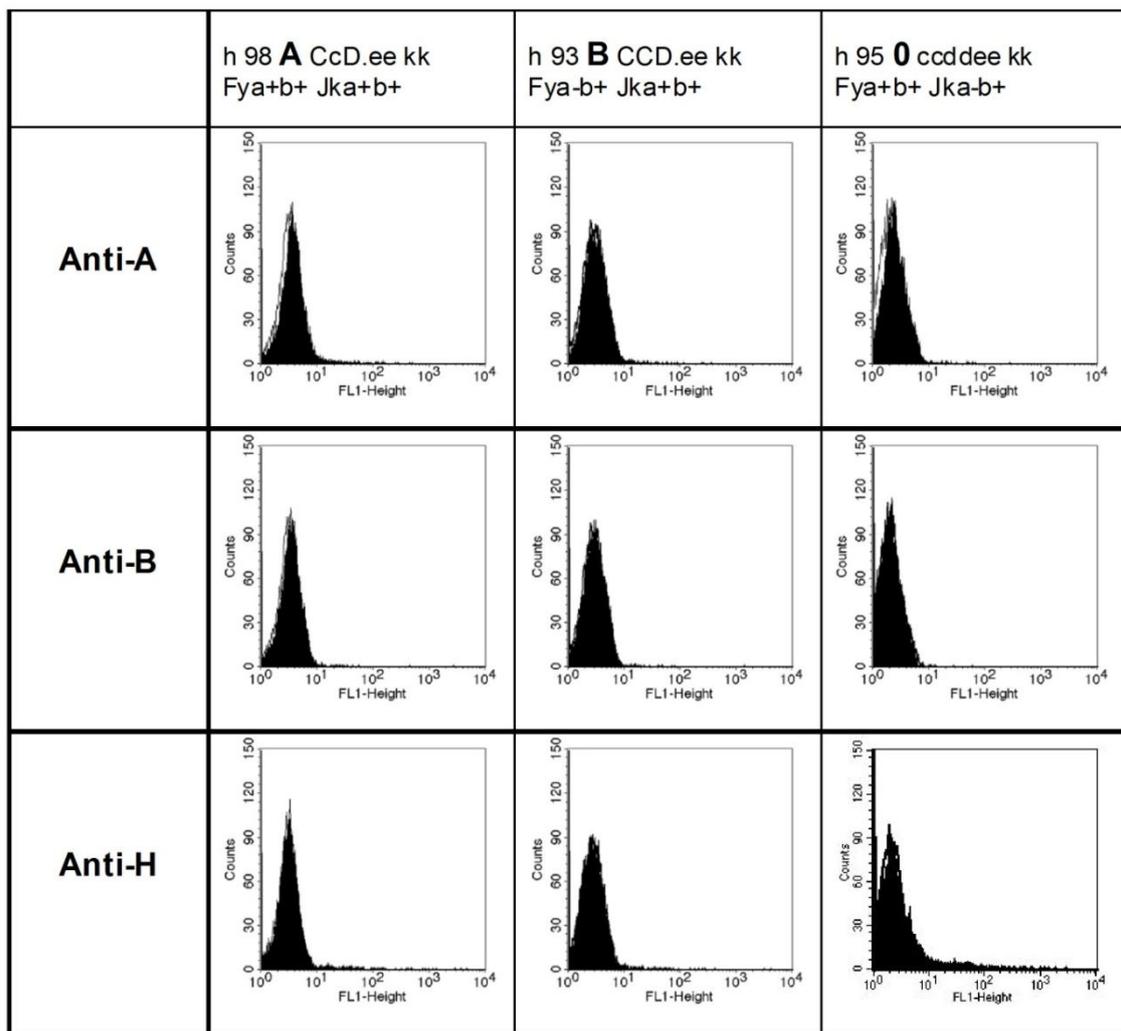


Abbildung 26: Detektion von A-, B- und H-Antigen auf MSC mittels FACS

Verwendet wurden MSC von humanen Spendern der Blutgruppen A, B und 0, benannt als h98, h93 und h95. Isotyp: Linie; Anti-A, Anti-B bzw. Anti-H: Ausgefüllte Kurve.

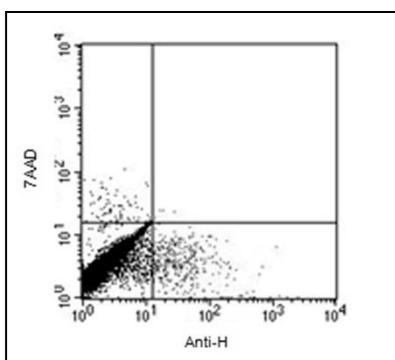
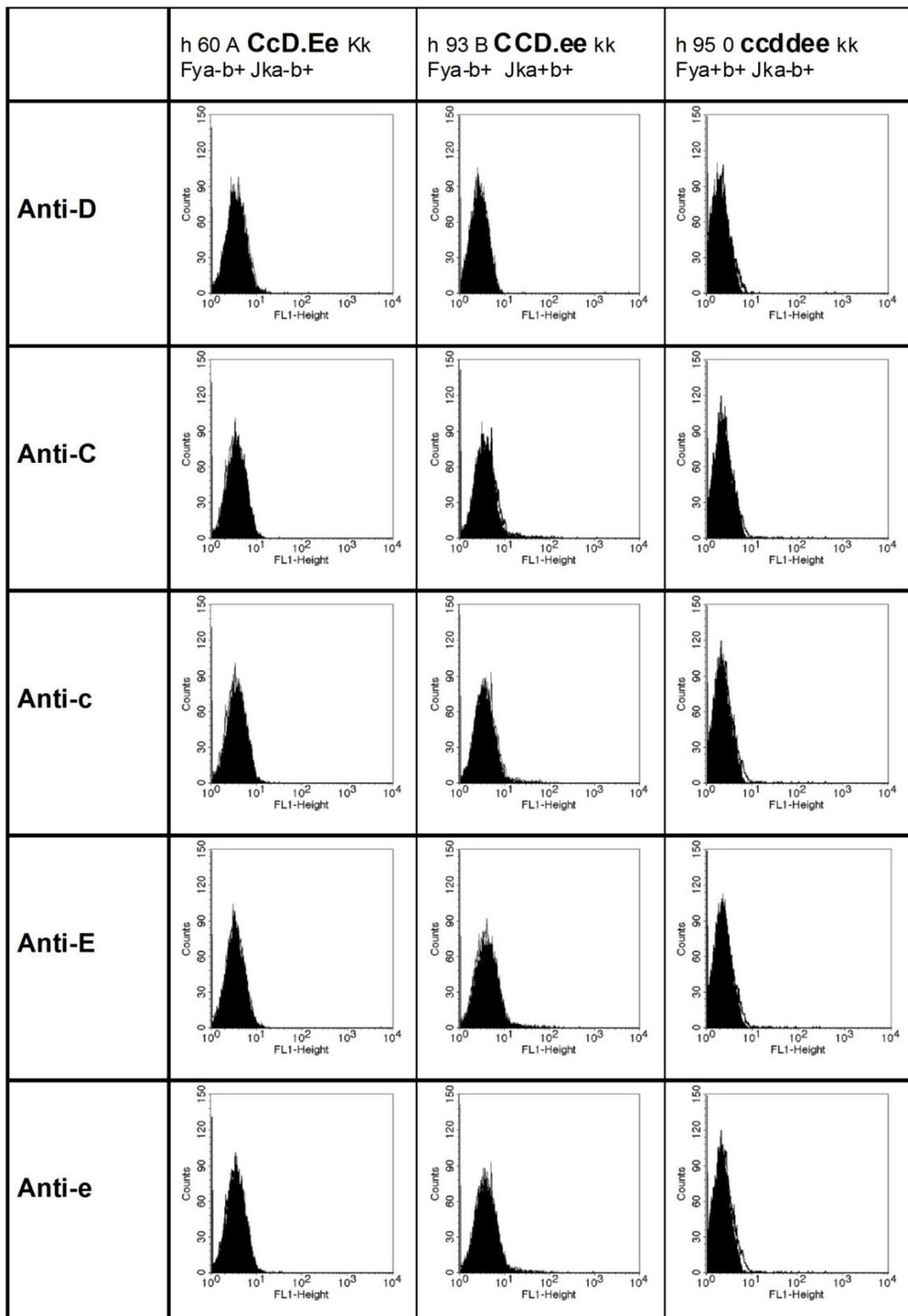


Abbildung 27: Expression von Antigen H auf MSC

(h95, Spender Blutgruppe 0). Lebende, 7-AAD-negative und H-positive Zellen stellen sich im rechten unteren Quadranten dar.



**Abbildung 28: Detektion von Rhesus D-, C-, c-, E-, e-Antigen auf MSC mittels FACS**  
 Verwendet wurden MSC von humanen Spendern mit den Rhesusformeln CcD.Ee, CCD.ee und ccddee benannt als h 60, h 93 und h 95. Isotyp: Linie; Anti-D, Anti-C, Anti-c, Anti-E bzw. Anti-e: Ausgefüllte Kurve.

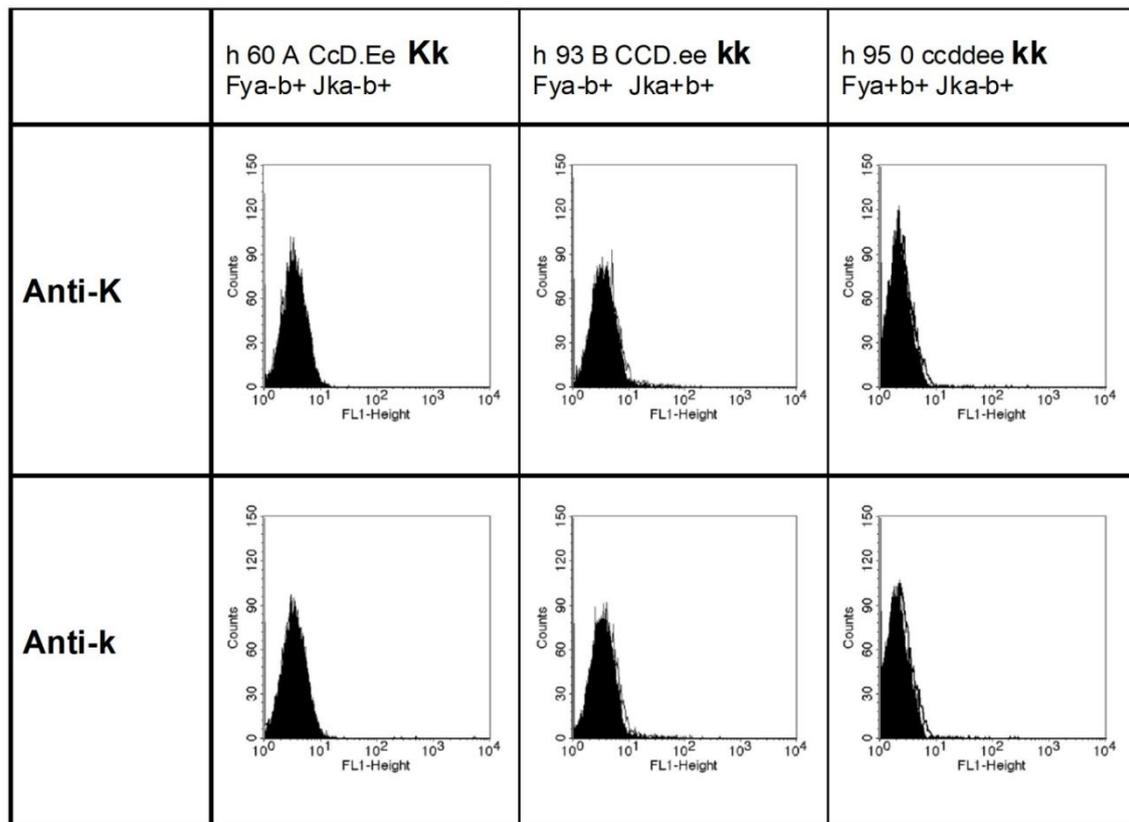


Abbildung 29: Detektion von K- und k-Antigen auf MSC mittels FACS

Verwendet wurden MSC von humanen Spendern mit den Blutgruppen-Phänotypen Kk und kk benannt als h60, h93 und h95. Isotyp: Linie; Anti-K, bzw. Anti-k: Ausgefüllte Kurve.

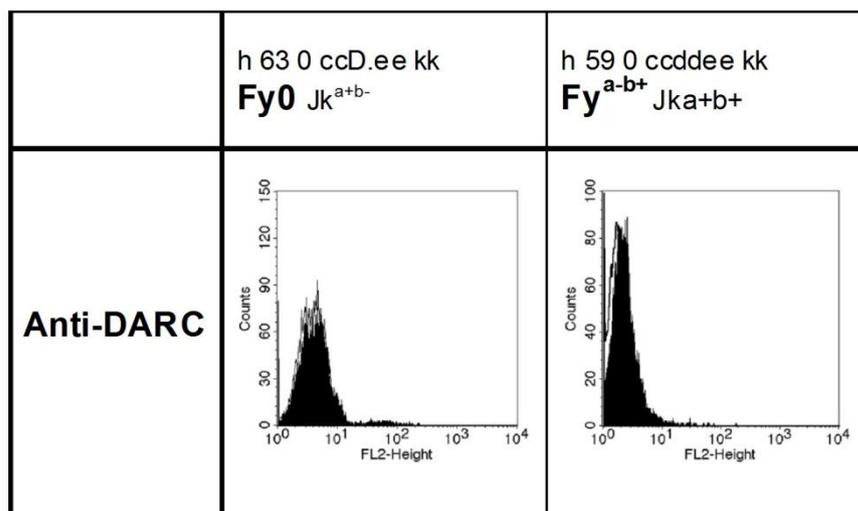


Abbildung 30: Detektion von DARC-Antigen auf MSC mittels FACS

Verwendet wurden MSC von humanen Spendern mit den Blutgruppen-Phänotypen Fy0 und Fy<sup>a-b+</sup> benannt als h63 und h59. Isotyp: Linie; Anti-DARC: Ausgefüllte Kurve.

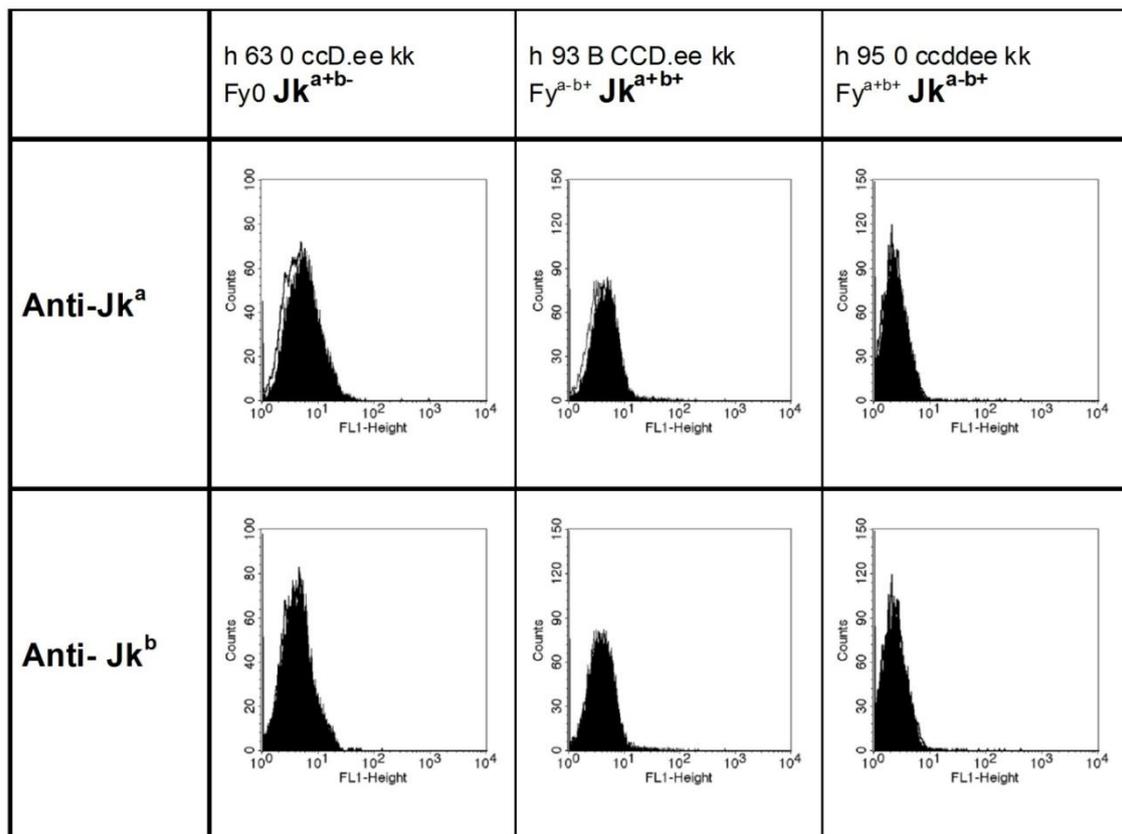


Abbildung 31: Detektion von Jk<sup>a</sup>- und Jk<sup>b</sup>-Antigenen auf MSC mittels FACS

Verwendet wurden MSC von humanen Spendern mit den Blutgruppen-Phänotypen Jk<sup>a+b-</sup>, Jk<sup>a+b+</sup> und Jk<sup>a-b+</sup> benannt als h63, h93 und h95. Isotyp: Linie; Anti-Jk<sup>a</sup>, bzw. Anti-Jk<sup>b</sup>: Ausgefüllte Kurve.

## 5 Diskussion

In einer zunehmenden Anzahl klinischer Studien werden die immunmodulatorischen Eigenschaften von MSC bei einem breitem Spektrum an Erkrankungen wie der GvHD, Morbus Crohn und Diabetes Mellitus Typ I untersucht<sup>50, 68</sup>. In der Entwicklung von Protokollen zur Transplantation von MSC sollte es ein vorrangiges Ziel sein, medikamentöse Immunsuppression entbehrlich zu machen. Allogene MSC können jedoch insbesondere in immunkompetenten Individuen immunogen sein. In einer Studie von Nauta et al.<sup>51</sup> erhielten subletal bestrahlte Mäuse Knochenmark mit oder ohne Spender- oder Empfänger-MSC. Das Verabreichen von allogenen Spender-MSC war hierbei mit signifikant höheren Abstoßungsraten verbunden, während Empfänger-MSC ein engraftment der HSC förderten. Darüber hinaus führte die Infusion von MSC in immunkompetente Mäuse zu einer Gedächtnis T-Zell Reaktion. Mehrere Studien stützen diese Ergebnisse: Humane MSC (hMSC) lösten, in das Myokard immunkompetenter Ratten injiziert, eine Infiltration mit Makrophagen und Abstoßungsreaktionen aus, während immuninkompetente Ratten die hMSC gut vertrugen<sup>52</sup>. Eliopoulos et al.<sup>162</sup> fanden eine Abstoßung allogener transplantierte MHC I- und MHC II-inkompatibler Maus-MSC mit Infiltration von CD8-positiven T-Lymphozyten, Natürlichen Killer T-Zellen und Natürlichen Killerzellen vom Empfänger. Desweiteren wurden in dieser Studie Splenozyten von Mäusen, die MSC verabreicht bekommen hatten, bei erneutem Kontakt mit allogenen MSC aktiviert. Die Immunantwort nach Infusion von MSC eines allogenen Spenders könnte also bei erneutem Kontakt eine Abstoßungsreaktion gegenüber allogener Knochenmark verstärken. Passend zu diesen Beobachtungen ist, dass MSC bei Kultivierung in Anwesenheit proinflammatorischer Zytokine wie IFN- $\gamma$  die Fähigkeit der Antigenpräsentation entwickeln<sup>48</sup>.

Weniger gut untersucht als die zellvermittelte Immunantwort auf die Gabe von MSC ist bisher die humorale Immunantwort. Humorale, alloimmune Mechanismen sind von hoher klinischer Relevanz bei Organtransplantationen, richten sich gegen HLA und mHag und können eine Abstoßung verursachen<sup>163</sup>. Bei Transplantation hämatopoetischer Stammzellen sind vorhergehende

Transfusionen vor allem bei Patienten mit einer schweren aplastischen Anämie (SAA) mit einer höheren Rate an Abstoßungen verbunden, was durch eine Alloimmunisierung gegen mHag und Blutgruppenantigene erklärt wird <sup>164-165</sup>. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass bei einigen SAA-Patienten vorhandene Antikörper mit Monozyten reagieren und so eine Abstoßung verursachen <sup>166</sup>. MSC stimulieren in vitro die IgG-Produktion in B-Zellen <sup>167</sup>. Auch im Tiermodell konnte eine Bildung von Alloantikörpern nach Gabe allogener MSC detektiert werden <sup>168</sup>.

Allogene Blutgruppenantigene sind hoch immunogene Moleküle. Durch Alloimmunisierung entstandene Antikörper, insbesondere des ABO Blutgruppensystems können bei inkompatibler Organtransplantation eine hyperakute Abstoßungsreaktion verursachen. Nach Transplantation von Organen und hämatopoetischen Stammzellen wurde vielfach über das Auftreten von Antikörpern der Blutgruppen Rhesus <sup>114-117</sup>, Kell <sup>124</sup>, Duffy <sup>158-159</sup> und Kidd <sup>124, 146-149</sup> berichtet. Eine mögliche Rolle der Antigene der Blutgruppen Duffy und Kidd als mHag wird diskutiert <sup>145</sup>. Die vorliegende Arbeit untersuchte die Expression der klinisch relevanten Blutgruppenantigene A, B, H, Rhesus-D, -C, -c, -E, -e, RhAG, K, k, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup> und DARC durch MSC auf Genom-, Transkriptom- und Proteinebene. Das primäre Ziel dabei war, durch die Kenntnis der Expression einen Hinweis zu erlangen, ob Blutgruppenantigene im Rahmen der Transplantation von allogenen MSC als immunologisch relevante Strukturen auszuschließen, oder ob sie gegebenenfalls als mögliche Kandidaten für Antikörper-vermittelte Reaktionen in Betracht zu ziehen sind.

## 5.1 Etablierung der FACS-Analyse von Erythrozyten

Berneman et al. <sup>169</sup> führten 1991 zur Bestimmung des Blutgruppenantigens A auf Erythrozyten ein Protokoll mit Formalininkubation ein, um eine Agglutination der Erythrozyten zu verhindern. Blanchard et al. <sup>170</sup> übernahmen die Methode 1994 für die Antigene B und H. Der Mechanismus, der zur Inhibition der Agglutination von Zellen durch Formalin führt ist nicht vollständig aufgeklärt. Es steht jedoch fest, dass Formalin mit Proteinen unter Herstellung von

Querverbindungen reagiert und damit die Erythrozytenmembran stabilisiert, so dass die für eine effiziente Agglutination benötigte laterale Beweglichkeit der jeweiligen verantwortlichen Antigene gehemmt wird<sup>171</sup>. David et al.<sup>172</sup> beschrieben 1999 die adäquate Verdünnung der Erythrozytensuspension als Alternative zur Inkubation in Formaldehyd-Lösung. Die im Rahmen der Etablierung der FACS-Analyse von Erythrozyten in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Titrationsreihe bestätigte für die Antigene B und H die Beobachtungen von Blanchard et al. und David et al., dass sowohl die Formalininkubation als auch eine hohe Verdünnungsstufe probate Mittel sind um eine Agglutination zu verhindern. Da bei der Inkubation von A-Erythrozyten mit Anti-A selbst bei einer Verdünnung von 1:1000 noch eine Agglutination auftrat, entschieden wir uns für die Formalininkubation, welche eine Agglutination in allen Verdünnungsstufen der Titrationsreihe verhinderte. Das Verhindern der Agglutination durch Formalininkubation konnte auch in den Punktwolkendiagrammen der FACS-Analysen nachvollzogen werden. Das vermehrte Auftreten von Zelltrümmern bei FACS ohne Formalin kann dadurch erklärt werden, dass Zellagglutinate bei der hämodynamischen Fokussierung in der Analysekapillare auseinandergerissen und so eher beschädigt werden als Einzelzellen in Suspension. Durch die verhinderte Agglutination und weniger Zelltrümmer bewegen sich die Erythrozyten bei Formalininkubation auch bezüglich der Verteilung der Fluoreszenzintensität in einem wesentlich schärfer abgegrenzten Bereich.

## 5.2 Blutgruppenstatus der MSC

Die genomische Bestimmung des Blutgruppenstatus mittels SSP-PCR konnte durchgeführt werden. Die Ergebnisse stimmten mit dem mit den ID-Karten „DiaClon AB0/D+DAT“ und „DiaClon Rh subgroups + K“ serologisch bestimmten Phänotyp überein, was dafür spricht, dass die Genotypisierung bezüglich des Blutgruppenstatus zur Charakterisierung von MSC für den klinischen Gebrauch eingeführt werden könnte.

Alle untersuchten MSC Populationen exprimierten FUT1, RHCE, KEL und Kidd (HUT11) mRNA. mRNA der AB0-Glykosyltransferase (AB0), Rhesus-D (RHD) und mRNA des Rhesus-Assoziierten Glykoproteins (RHAG) wurden von den untersuchten MSC nicht exprimiert.

In der FACS-Analyse stellten sich die MSC als negativ für die Antigene A, B, Rhesus-D, Rhesus-C, Rhesus-c, Rhesus-E, Rhesus-e, Kell, Cellano, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup> und DARC dar. MSC der Blutgruppe 0 waren leicht positiv für Antigen H.

### 5.2.1 Die Blutgruppensysteme Rhesus und RhAG

Die Rhesus-Homologe RhCG und RhBG werden auch von humanen nicht-erythrozytären Geweben exprimiert: RhCG in Niere, Hoden, Gehirn, Pankreas und Prostata<sup>173-174</sup>, RhBG in Niere, Ovar, Haut und Leber<sup>175</sup>.

RhAG wird bereits früh in der Erythropoese exprimiert und ist auch auf CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Progenitorzellen zu finden. RhCE erscheint erst später, gefolgt von RhD<sup>176</sup>. Die Expression der Rhesus-Proteine des RHD- und RHCE-Gens ist nach bisheriger Erkenntnis weitgehend auf die Erythropoese beschränkt<sup>177</sup>. Fehlende Expression von RhAG führt zu einem RH<sub>null</sub> Phänotyp, da die Expression der Rhesus-Proteine von RHAG-mRNA als Regulator abhängt<sup>178-180</sup>. Es ist daher schlüssig, dass MSC trotz Expression von RHCE-mRNA bei fehlender RHAG-mRNA keine RhCcEe-Proteine exprimierten. Die Ergebnisse stehen folglich im Einklang mit der posttranskriptionellen Abhängigkeit der Expression der RhesusCcEe-Proteine von RHAG-mRNA. Darüber hinaus bestätigen sie die Ansicht, dass die Expression von RhAG und RhD auf Zellen der Erythropoese beschränkt ist und dass die untersuchten MSC von nicht-erythrozytärem Charakter sind. Infolge der fehlenden Expression der Rhesus-Proteine auf der Oberfläche von MSC ist nicht zu erwarten, dass eine Gabe Rhesus inkompatibler MSC zu immunologischen Komplikationen wie etwa der Bildung von Alloantikörpern führen könnte.

### 5.2.2 Das Blutgruppensystem Kell

Ähnliches gilt für das Blutgruppensystem Kell. Neben Erythrozyten exprimieren auch eine große Anzahl anderer Zellen und Gewebe wie myeloide Progenitorzellen, Hodengewebe und Skelettmuskel das Kell-Glykoprotein <sup>122</sup>. CD34<sup>+</sup>-hämatogene Progenitorzellen exprimieren Kell- und XK-mRNA aber keine entsprechenden Oberflächenproteine <sup>181</sup>. Auch MSC exprimierten Kell-mRNA, mittels FACS konnte weder Kell- noch Cellano-Antigen auf der Zelloberfläche detektiert werden, was für ihren nicht-erythropoetischen Stammzellcharakter spricht.

### 5.2.3 Das Blutgruppensystem Duffy

Neben dem Vorkommen auf Erythrozyten wird DARC von Endothelzellen postkapillärer Venolen im ganzen Körper außer in der Leber, von Purkinjezellen und von Epithelzellen renaler Sammelrohre exprimiert <sup>126</sup>. Im Rahmen zellvermittelter und humoraler Abstoßungsreaktionen bei transplantierten Nieren wird die Expression von DARC hochreguliert <sup>182-183</sup>. Watorek et al. <sup>159</sup> beschrieben einen Fall einer Nieren-Empfängerin mit dem Phänotyp Fy(a-b+) und vorbestehendem Anti-Fy<sup>a</sup> mit einem ungünstigen Verlauf bei einem Fy(a+b+)-Allograft und Auftreten von C4d-Ablagerungen in den peritubulären Kapillaren als Zeichen einer Alloantikörper-vermittelten Abstoßungsreaktion. Lerut et al. <sup>145</sup> fanden in Nierenbiopsaten von Duffy-inkompatibel transplantierten Nieren signifikant mehr chronische Läsionen als bei kompatibel transplantierten und werteten das als Hinweis darauf, dass den Duffy-Antigenen eine Rolle als Minor Histokompatibilitätsantigene zukommen könnte. Seltsam et al. <sup>158</sup> berichteten von einem Fall einer Antikörper-vermittelten Hämolyse nach Nierentransplantation bei einem Fy(a+) Empfänger mit vom Spender stammendem Anti-Fy<sup>a</sup>. Individuen mit dem Phänotyp Fy(a-b-) haben Akalin et al. <sup>184</sup> zufolge bei gleichzeitigem Auftreten einer verzögerten Transplantatfunktion ein kürzeres Transplantatüberleben. Mange et al. <sup>185</sup> konnten dies nicht bestätigen.

DARC mRNA wird von MSC exprimiert, das DARC-Glykoprotein konnte jedoch nicht detektiert werden. Weiterführende quantitative PCR-Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ergaben, dass die Expression von DARC mRNA unter adipogener und osteogener Differenzierung der MSC verstärkt wird, was für eine verstärkte Sekretion von Chemokinen spricht <sup>186</sup>.

#### 5.2.4 Das Blutgruppensystem Kidd

Das Kidd-Glykoprotein wird nicht nur auf Erythrozyten, sondern auch in den vasa recta und dem äußeren Mark der Niere sowie im Darm exprimiert <sup>187-188</sup>. Entsprechende mRNA wird zusätzlich in vielen anderen Geweben des ZNS, Knochen- und Knorpelgeweben, Muskel und Niere, nicht aber in der Leber gefunden <sup>177</sup>.

Prichet et al. <sup>189</sup> fanden HUT11-mRNA in Zellkulturen von menschlichen Knochen-Explantaten. Die Zellkulturen enthielten Osteoblasten und zu einem unbekanntem Anteil mutmaßlich auch MSC. Diese wurden jedoch lediglich im Hinblick auf ihr adipogenes Differenzierungspotential beschrieben. Im Gegensatz hierzu wurden in der vorliegenden Arbeit MSC verwendet, die hinsichtlich ihrem adipogenen, chondrogenen und osteogenen Differenzierungspotential sowie der Expression von Oberflächenmarkern umfassend charakterisiert worden waren. Die Expression von HUT11-mRNA konnte bestätigt werden. In weiterführenden Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnte mittels Western Blot nachgewiesen werden, dass MSC Kidd-Glykoprotein synthetisieren <sup>186</sup>. Mittels FACS konnte jedoch kein Protein auf der Oberfläche detektiert werden. Die Oberflächenexpression von in der Zelle vorhandenem Kidd-Protein scheint also auf der Stufe des Transportes zur oder der Integration in die Zellmembran unterbunden zu werden. Infolge der fehlenden Expression des Kidd-Glykoproteins auf der Oberfläche von MSC ist nicht zu erwarten dass eine Gabe Kidd-inkompatibler MSC zu immunologischen Komplikationen führt.

### 5.2.5 Die Blutgruppensysteme ABO und Hh

Die Antigene A, B und H werden über Erythrozyten hinaus von vielen humanen Zellen, epitheliale wie endotheliale, exprimiert, weshalb ABO gemeinsam mit den anderen Kohlenhydrat-Blutgruppen auch als „Histo-Blood-Group“ bezeichnet wird. Man kann sie beispielsweise auf Thrombozyten, Lymphozyten, Epithelien der Atemwege, des Gastrointestinal- und Urogenitaltrakts und auf Gefäßendothel finden <sup>190</sup>. Edvardsson et al. <sup>96</sup> detektierten Antigen A mittels FACS auf einer Subpopulation CD34<sup>+</sup> Knochenmarkszellen. Mölne et al. <sup>81</sup> berichteten über den immunhistochemischen Nachweis der Antigene A und B auf humanen embryonalen Stammzellen (hESC), sowie von Antigen B auf hepatogen, nicht aber auf kardiomyogen differenzierten hESC.

Tang et al. <sup>191</sup> fanden über die Bindung von anti-SSEA-5, dass hESC H1-Grundsubstanz exprimieren. Diese kann zu anderen Glykanen inklusive der Lewis und ABO Blutgruppenantigene modifiziert werden. Darüber hinaus beobachteten sie bei einer 3-tägigen Behandlung der hESC mit Retinsäure eine Verschiebung der Expression hin zu einem Vorherrschen der Typ 2-Grundsubstanz (Antigen H2).

CD34<sup>+</sup> Leukämie-Zellen der Linie KG1a und CD34<sup>+</sup> hämatopoetische Progenitorzellen exprimieren Antigen H2 und FUT1-mRNA <sup>97</sup>.

Die in dieser Arbeit untersuchten MSC exprimierten keine mRNA der ABO-Glykosyltransferase und folgerichtig auch kein Antigen A und B auf der Zelloberfläche. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen von Sundin et al. <sup>192</sup> die mittels FACS ebenfalls kein Antigen A und B auf humanen MSC detektierten, die Zellen jedoch nicht auf Antigen H2 hin untersuchten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass eine Subpopulation undifferenzierter MSC FUT1-mRNA und Antigen H2 exprimiert. Vor dem Hintergrund der von Tang et al. <sup>191</sup> beobachteten Verschiebung der H1-Expression hin zu einem Überwiegen von Antigen H2 mit fortschreitender Differenzierung kann dieser Befund als Indiz dafür gesehen werden, dass die H2 positive MSC-Subpopulation sich gegenüber hESC in einem differenzierteren Zellstadium befindet.

In zusätzlichen, immunhistochemischen Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnte die Antigen H2 positive Subpopulation als schwach GD2 positiv (GD2<sup>dim+</sup>) charakterisiert werden<sup>186</sup>. GD2 wird nach heutigen Kenntnissen im Knochenmark ausschließlich von MSC exprimiert<sup>22</sup>. FUT1 werden vielfältige Funktionen in der Tumorgenese zugeschrieben. So ist FUT1-mRNA beteiligt an der Biosynthese von Globo H, einem potentiellen Tumor-assoziierten Antigen in Brustkrebs-Stammzellen<sup>193</sup> und spielt eine Rolle in der Expression von Nukleolin, einem DNA-bindenden Protein, dem eine proliferationsfördernde Wirkung zugeschrieben wird. RNA-vermitteltes Abschalten des FUT1-Gens inhibiert die Adhäsion und Proliferation von bovinen postkapillären venösen Endothelzellen und humanen A431-Tumorzellen (epidermoides Karzinom) über eine Inhibition des EGFR (epidermal growth factor receptor)<sup>194-195</sup> und beeinträchtigt in vitro die Angiogenese und Migration von aus dem Knochenmark stammenden Endothelzellen<sup>196</sup>. Dahingegen fanden Matthieu et. al<sup>197</sup> im Mausmodell, dass durch Transduktion des FUT1-Gens in hepatozelluläre Karzinomzellen Vaskulogenese und Tumorwachstum gehemmt werden und interpretierten die Ergebnisse dahingehend, dass FUT1 je nach Art der Tumorzelle proliferationsfördernd oder -hemmend wirkt.

Klinisch signifikante H-spezifische Antikörper finden sich regelhaft bei den seltenen Bombay und Para-Bombay Phänotypen, die auf ihren Erythrozyten kein Antigen H exprimieren<sup>198-199</sup>. Solche Patienten müssen mit Blut von H-defizienten Spendern transfundiert werden. Neben Blutgruppe 0-Erythrozyten exprimieren auch Erythrozyten der Blutgruppen A<sub>2</sub>, Antigen-H stark, A<sub>1</sub>-, B-, und A<sub>1</sub>B-Erythrozyten schwächer. Beim A<sub>1</sub>-und A<sub>1</sub>B-Phänotyp kommen nicht selten schwache Kälteantikörper der Klasse IgM vor, die jedoch klinisch nicht relevant sind<sup>200</sup>. Die Expression von Antigen H auf einer Subpopulation undifferenzierter MSC impliziert, dass bei Transplantation von MSC in Individuen der Bombay und Para-Bombay Phänotypen möglicherweise mit einer Antikörper-vermittelten Abstoßungsreaktion der Antigen H tragenden Zellen zu rechnen ist. Aufgrund des geringen Anteils der Antigen H exprimierenden Subpopulation an den untersuchten Populationen ist es jedoch fraglich, ob eine solche Abstoßung klinische Relevanz hätte. In der Literatur ist bisher kein entsprechender Fall beschrieben.

## 6 Zusammenfassung

Unter den klinisch relevanten und am stärksten immunogenen Blutgruppenantigenen konnte nur das Kidd-Glykoprotein in humanen MSC, nicht aber auf deren Zelloberfläche detektiert werden. Die gewonnenen Kenntnisse über die Expression von Blutgruppenantigenen auf mesenchymalen Stammzellen implizieren, dass auch im nicht immunsupprimierten Empfänger weder eine Immunisierung gegen die klassischen Blutgruppenantigene noch eine damit verbundene Funktionsminderung zu erwarten ist. Eine Ausnahme könnte die Gabe von MSC an Individuen der seltenen Bombay und Para-Bombay Phänotypen darstellen. Welche Konsequenzen eine Gabe von MSC an Anti-H seropositive Individuen hätte, müsste in präklinischen Studien geklärt werden.

Die Ergebnisse liefern einen Beitrag zur näheren Charakterisierung humaner MSC und deren Kompatibilität im Hinblick auf ihren Einsatz in der Immuntherapie und der Regenerativen Medizin und fanden Eingang in die Veröffentlichung „Expression of blood group genes by mesenchymal stem cells“ im British Journal of Haematology <sup>186</sup>.

## 7 Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit enthält Teile des Gesamtprojektes „Expression of blood group genes by mesenchymal stem cells“ veröffentlicht 2012 im British Journal of Haematology <sup>186</sup>. Verantwortlich für Konzeption, Betreuung des Gesamtprojektes und Verfassung der Veröffentlichung war Herr Dr. med. Richard Schäfer.

Einzelne Versuche, die Gegenstand dieser Arbeit sind wurden in Gemeinschaftsarbeit durchgeführt: Die genomische PCR und die RT-PCR der MSC erfolgte unter Mitarbeit von Frau Maria Anna Rädlein. Die FACS-Analyse der MSC erfolgte unter Mitarbeit von Frau Ursula Hermanutz-Klein und Herrn Dr. rer. nat. Roland Klaffschenkel. Die Etablierung und Durchführung, Auswertung und Interpretation der FACS-Analyse von Erythrozyten ist Eigenleistung des Doktoranden, Herrn Michael Schüle.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Morrison S.J., Shah, N.M. und Anderson, D.J. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*. Feb 7 1997;88(3):287-298.
2. Seaberg R.M. und van der Kooy, D. Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosci*. Mar 2003;26(3):125-131.
3. Friedenstein A.J., Petrakova, K.V., Kurolesova, A.I. und Frolova, G.P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. Mar 1968;6(2):230-247.
4. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. Sep 1991;9(5):641-650.
5. Le Blanc K. und Pittenger, M. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. *Cytotherapy*. 2005;7(1):36-45.
6. Horwitz E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S. und Keating, A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-395.
7. Phinney D.G. und Prockop, D.J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*. Nov 2007;25(11):2896-2902.
8. Dominici M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. und Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317.
9. Williams J.T., Southerland, S.S., Souza, J., Calcutt, A.F. und Cartledge, R.G. Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg*. Jan 1999;65(1):22-26.
10. Zuk P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P. und Hedrick, M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. Apr 2001;7(2):211-228.
11. De Bari C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P. und Luyten, F.P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*. Aug 2001;44(8):1928-1942.
12. Kuznetsov S.A., Mankani, M.H., Gronthos, S., Satomura, K., Bianco, P. und Robey, P.G. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol*. May 28 2001;153(5):1133-1140.
13. In 't Anker P.S., Scherjon, S.A., Kleijburg-van der Keur, C., Noort, W.A., Claas, F.H., Willemze, R., Fibbe, W.E. und Kanhai, H.H. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*. Aug 15 2003;102(4):1548-1549.
14. Campagnoli C., Roberts, I.A., Kumar, S., Bennett, P.R., Bellantuono, I. und Fisk, N.M. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*. Oct 15 2001;98(8):2396-2402.

15. Fan C.G., Tang, F.W., Zhang, Q.J., Lu, S.H., Liu, H.Y., Zhao, Z.M., Liu, B., Han, Z.B. und Han, Z.C. Characterization and neural differentiation of fetal lung mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.* 2005;14(5):311-321.
16. Dominici M., Hofmann, T.J. und Horwitz, E.M. Bone marrow mesenchymal cells: biological properties and clinical applications. *J Biol Regul Homeost Agents.* Jan-Mar 2001;15(1):28-37.
17. Reyes M. und Verfaillie, C.M. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci.* Jun 2001;938:231-233; discussion 233-235.
18. Barry F.P., Boynton, R.E., Haynesworth, S., Murphy, J.M. und Zaia, J. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun.* Nov 1999;265(1):134-139.
19. Barry F., Boynton, R., Murphy, M., Haynesworth, S. und Zaia, J. The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* Nov 30 2001;289(2):519-524.
20. Deans R.J. und Moseley, A.B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol.* Aug 2000;28(8):875-884.
21. Pountos I., Corscadden, D., Emery, P. und Giannoudis, P.V. Mesenchymal stem cell tissue engineering: techniques for isolation, expansion and application. *Injury.* Sep 2007;38 Suppl 4:S23-33.
22. Martinez C., Hofmann, T.J., Marino, R., Dominici, M. und Horwitz, E.M. Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs. *Blood.* May 15 2007;109(10):4245-4248.
23. Anjos-Afonso F. und Bonnet, D. Nonhematopoietic/endothelial SSEA-1+ cells define the most primitive progenitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment. *Blood.* Feb 1 2007;109(3):1298-1306.
24. Quirici N., Soligo, D., Bossolasco, P., Servida, F., Lumini, C. und Delilieri, G.L. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol.* Jul 2002;30(7):783-791.
25. Giesert C., Marxer, A., Sutherland, D.R., Schuh, A.C., Kanz, L. und Buhning, H.J. Antibody W7C5 defines a CD109 epitope expressed on CD34+ and CD34- hematopoietic and mesenchymal stem cell subsets. *Ann N Y Acad Sci.* May 2003;996:227-230.
26. Buhning H.J., Kuci, S., Conze, T., Rathke, G., Bartolovic, K., Grunebach, F., Scherl-Mostageer, M., Brummendorf, T.H., Schweifer, N. und Lammers, R. CDCP1 identifies a broad spectrum of normal and malignant stem/progenitor cell subsets of hematopoietic and nonhematopoietic origin. *Stem Cells.* 2004;22(3):334-343.
27. Wakitani S., Saito, T. und Caplan, A.I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve.* Dec 1995;18(12):1417-1426.
28. Fukuda K. und Fujita, J. Mesenchymal, but not hematopoietic, stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction in mice. *Kidney Int.* Nov 2005;68(5):1940-1943.

29. Sato Y., Araki, H., Kato, J., Nakamura, K., Kawano, Y., Kobune, M., Sato, T., Miyanishi, K., Takayama, T., Takahashi, M., Takimoto, R., Iyama, S., Matsunaga, T., Ohtani, S., Matsuura, A., Hamada, H. und Niitsu, Y. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood*. Jul 15 2005;106(2):756-763.
30. Kopen G.C., Prockop, D.J. und Phinney, D.G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 14 1999;96(19):10711-10716.
31. Arnhold S., Heiduschka, P., Klein, H., Absenger, Y., Basnaoglu, S., Kreppel, F., Henke-Fahle, S., Kochanek, S., Bartz-Schmidt, K.U., Addicks, K. und Schraermeyer, U. Adenovirally transduced bone marrow stromal cells differentiate into pigment epithelial cells and induce rescue effects in RCS rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. Sep 2006;47(9):4121-4129.
32. Nakagawa H., Akita, S., Fukui, M., Fujii, T. und Akino, K. Human mesenchymal stem cells successfully improve skin-substitute wound healing. *Br J Dermatol*. Jul 2005;153(1):29-36.
33. Herrera M.B., Bussolati, B., Bruno, S., Fonsato, V., Romanazzi, G.M. und Camussi, G. Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. *Int J Mol Med*. Dec 2004;14(6):1035-1041.
34. Majumdar M.K., Thiede, M.A., Haynesworth, S.E., Bruder, S.P. und Gerson, S.L. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematother Stem Cell Res*. Dec 2000;9(6):841-848.
35. in 't Anker P.S., Noort, W.A., Kruisselbrink, A.B., Scherjon, S.A., Beekhuizen, W., Willemze, R., Kanhai, H.H. und Fibbe, W.E. Nonexpanded primary lung and bone marrow-derived mesenchymal cells promote the engraftment of umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol*. Oct 2003;31(10):881-889.
36. Ball L.M., Bernardo, M.E., Roelofs, H., Lankester, A., Cometa, A., Egeler, R.M., Locatelli, F. und Fibbe, W.E. Cotransplantation of ex vivo expanded mesenchymal stem cells accelerates lymphocyte recovery and may reduce the risk of graft failure in haploidentical hematopoietic stem-cell transplantation. *Blood*. Oct 1 2007;110(7):2764-2767.
37. Krampera M., Glennie, S., Dyson, J., Scott, D., Laylor, R., Simpson, E. und Dazzi, F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*. May 1 2003;101(9):3722-3729.
38. Di Nicola M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P.D., Matteucci, P., Grisanti, S. und Gianni, A.M. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. May 15 2002;99(10):3838-3843.
39. Glennie S., Soeiro, I., Dyson, P.J., Lam, E.W. und Dazzi, F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*. Apr 1 2005;105(7):2821-2827.

40. Corcione A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Risso, M., Gualandi, F., Mancardi, G.L., Pistoia, V. und Uccelli, A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. Jan 1 2006;107(1):367-372.
41. Nauta A.J., Kruisselbrink, A.B., Lurvink, E., Willemze, R. und Fibbe, W.E. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*. Aug 15 2006;177(4):2080-2087.
42. Aggarwal S. und Pittenger, M.F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. Feb 15 2005;105(4):1815-1822.
43. Meisel R., Zibert, A., Laryea, M., Gobel, U., Daubener, W. und Dilloo, D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. Jun 15 2004;103(12):4619-4621.
44. Spaggiari G.M., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Mingari, M.C. und Moretta, L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*. Feb 1 2008;111(3):1327-1333.
45. Krampera M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., Santarlasci, V., Mazzinghi, B., Pizzolo, G., Vinante, F., Romagnani, P., Maggi, E., Romagnani, S. und Annunziato, F. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. Feb 2006;24(2):386-398.
46. Sato K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K. und Ozawa, K. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*. Jan 1 2007;109(1):228-234.
47. Spaggiari G.M., Capobianco, A., Becchetti, S., Mingari, M.C. und Moretta, L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*. Feb 15 2006;107(4):1484-1490.
48. Le Blanc K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E. und Ringden, O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. Oct 2003;31(10):890-896.
49. Pittenger M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S. und Marshak, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. Apr 2 1999;284(5411):143-147.
50. Le Blanc K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., Lanino, E., Sundberg, B., Bernardo, M.E., Remberger, M., Dini, G., Egeler, R.M., Bacigalupo, A., Fibbe, W. und Ringden, O. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. May 10 2008;371(9624):1579-1586.
51. Nauta A.J., Westerhuis, G., Kruisselbrink, A.B., Lurvink, E.G., Willemze, R. und Fibbe, W.E. Donor-derived mesenchymal stem cells are

- immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood*. Sep 15 2006;108(6):2114-2120.
52. Grinnemo K.H., Mansson, A., Dellgren, G., Klingberg, D., Wardell, E., Drvota, V., Tammik, C., Holgersson, J., Ringden, O., Sylven, C. und Le Blanc, K. Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg*. May 2004;127(5):1293-1300.
  53. Pereira R.F., O'Hara, M.D., Laptev, A.V., Halford, K.W., Pollard, M.D., Class, R., Simon, D., Livezey, K. und Prockop, D.J. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 3 1998;95(3):1142-1147.
  54. Ortiz L.A., Gambelli, F., McBride, C., Gaupp, D., Baddoo, M., Kaminski, N. und Phinney, D.G. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jul 8 2003;100(14):8407-8411.
  55. Kunter U., Rong, S., Djuric, Z., Boor, P., Muller-Newen, G., Yu, D. und Floege, J. Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. Aug 2006;17(8):2202-2212.
  56. Lee R.H., Seo, M.J., Reger, R.L., Spees, J.L., Pulin, A.A., Olson, S.D. und Prockop, D.J. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 14 2006;103(46):17438-17443.
  57. Minguell J.J. und Erices, A. Mesenchymal stem cells and the treatment of cardiac disease. *Exp Biol Med (Maywood)*. Jan 2006;231(1):39-49.
  58. Phinney D.G. und Isakova, I. Plasticity and therapeutic potential of mesenchymal stem cells in the nervous system. *Curr Pharm Des*. 2005;11(10):1255-1265.
  59. Lazarus H.M., Haynesworth, S.E., Gerson, S.L., Rosenthal, N.S. und Caplan, A.I. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant*. Oct 1995;16(4):557-564.
  60. Horwitz E.M., Gordon, P.L., Koo, W.K., Marx, J.C., Neel, M.D., McNall, R.Y., Muul, L. und Hofmann, T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 25 2002;99(13):8932-8937.
  61. Koc O.N., Day, J., Nieder, M., Gerson, S.L., Lazarus, H.M. und Krivit, W. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). *Bone Marrow Transplant*. Aug 2002;30(4):215-222.
  62. van Osch G.J., Brittberg, M., Dennis, J.E., Bastiaansen-Jenniskens, Y.M., Erben, R.G., Konttinen, Y.T. und Luyten, F.P. Cartilage repair: past and future--lessons for regenerative medicine. *J Cell Mol Med*. May 2009;13(5):792-810.
  63. Strauer B.E., Brehm, M., Zeus, T., Kostering, M., Hernandez, A., Sorg, R.V., Kogler, G. und Wernet, P. Repair of infarcted myocardium by

- autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation*. Oct 8 2002;106(15):1913-1918.
64. Chen S.L., Fang, W.W., Ye, F., Liu, Y.H., Qian, J., Shan, S.J., Zhang, J.J., Chunhua, R.Z., Liao, L.M., Lin, S. und Sun, J.P. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. Jul 1 2004;94(1):92-95.
65. Hare J.M., Traverse, J.H., Henry, T.D., Dib, N., Strumpf, R.K., Schulman, S.P., Gerstenblith, G., DeMaria, A.N., Denktas, A.E., Gammon, R.S., Hermiller, J.B., Jr., Reisman, M.A., Schaer, G.L. und Sherman, W. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. Dec 8 2009;54(24):2277-2286.
66. Mirotso M., Zhang, Z., Deb, A., Zhang, L., Gneccchi, M., Noiseux, N., Mu, H., Pachori, A. und Dzau, V. Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan 30 2007;104(5):1643-1648.
67. Anversa P., Kajstura, J., Leri, A. und Bolli, R. Life and death of cardiac stem cells: a paradigm shift in cardiac biology. *Circulation*. Mar 21 2006;113(11):1451-1463.
68. Osiris Therapeutics I. Clinical Trials. 2010; <http://www.osiris.com/clinical.php>.
69. Daniels G.L., Fletcher, A., Garratty, G., Henry, S., Jorgensen, J., Judd, W.J., Levene, C., Lomas-Francis, C., Moulds, J.J., Moulds, J.M., Moulds, M., Overbeeke, M., Reid, M.E., Rouger, P., Scott, M., Sistonen, P., Smart, E., Tani, Y., Wendel, S. und Zelinski, T. Blood group terminology 2004: from the International Society of Blood Transfusion committee on terminology for red cell surface antigens. *Vox Sang*. Nov 2004;87(4):304-316.
70. Issitt P.D. *Applied Blood Group Serology*. 3. Auflage ed. Miami, Florida, USA: Montgomery Scientific Publications; 1989.
71. Flegel W.A. und Wagner, F.F. *Blutgruppen: Alloantigene auf Erythrozyten*. In: Mueller-Eckhardt, C. (Hrsg.) *Transfusionsmedizin*. 3. Auflage ed. Berlin Heidelberg New York: Springer 2004.
72. Daniels G., Castilho, L., Flegel, W.A., Fletcher, A., Garratty, G., Levene, C., Lomas-Francis, C., Moulds, J.M., Moulds, J.J., Olsson, M.L., Overbeeke, M., Poole, J., Reid, M.E., Rouger, P., van der Schoot, E., Scott, M., Sistonen, P., Smart, E., Storry, J.R., Tani, Y., Yu, L.C., Wendel, S., Westhoff, C., Yahalom, V. und Zelinski, T. International Society of Blood Transfusion Committee on terminology for red blood cell surface antigens: Macao report. *Vox Sang*. Feb 2009;96(2):153-156.
73. Cartron J.P. und Colin, Y. Structural and functional diversity of blood group antigens. *Transfus Clin Biol*. Jun 2001;8(3):163-199.
74. Reid M.E. und Mohandas, N. Red blood cell blood group antigens: structure and function. *Semin Hematol*. Apr 2004;41(2):93-117.
75. Avent N.D., Martinez, A., Flegel, W.A., Olsson, M.L., Scott, M.L., Nogués, N., Písäcka, M., Daniels, G., van der Schoot, E., Muñiz-Diaz, E., Madgett, T.E., Storry, J.R., Beiboer, S.H., Maaskant-van Wijk, P.A., von

- Zabern, I., Jiménez, E., Tejedor, D., López, M., Camacho, E. und Cheroutre, G. The BloodGen project: toward mass-scale comprehensive genotyping of blood donors in the European Union and beyond. *Transfusion*. 2007;47:40S-46S.
76. Flegel W.A. Blood group genotyping in Germany. *Transfusion*. Jul 2007;47(1 Suppl):47S-53S.
77. Landsteiner K. Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe *Zbl. Bakt.* 1900;27:357-362.
78. Bernstein F. Zusammenfassende Betrachtungen über die erblichen Blutstrukturen des Menschen. *Z. Indukt. Abstammungs. Vererbungslehre*. 1925;37:237-370.
79. Larsen R.D., Ernst, L.K., Nair, R.P. und Lowe, J.B. Molecular cloning, sequence, and expression of a human GDP-L-fucose:beta-D-galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase cDNA that can form the H blood group antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 1990;87(17):6674-6678.
80. Le Pendu J., Lemieux, R.U., Lambert, F., Dalix, A.M. und Oriol, R. Distribution of H type 1 and H type 2 antigenic determinants in human sera and saliva. *Am J Hum Genet*. May 1982;34(3):402-415.
81. Molne J., Bjorquist, P., Andersson, K., Diswall, M., Jeppsson, A., Strokan, V., Rydberg, L. und Breimer, M.E. Blood group ABO antigen expression in human embryonic stem cells and in differentiated hepatocyte- and cardiomyocyte-like cells. *Transplantation*. Nov 27 2008;86(10):1407-1413.
82. Bhende Y.M., Deshpande, C.K., Bhatia, H.M., Sanger, R., Race, R.R., Morgan, W.T.J. und Watkins, W.M. A 'new' blood group character related to the ABO system. *Lancet*. 1952; I:903-904.
83. Kelly R.J., Ernst, L.K., Larsen, R.D., Bryant, J.G., Robinson, J.S. und Lowe, J.B. Molecular basis for H blood group deficiency in Bombay (Oh) and para-Bombay individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 21 1994;91(13):5843-5847.
84. Aloysia M., Gelb, A.G., Fudenberg, H., Hamper, J., Tippett, P. und Race, R.R. The expected "Bombay" groups OhA1 and OhA2. *Transfusion*. Jul-Aug 1961;1:212-217.
85. Amundadottir L., Kraft, P., Stolzenberg-Solomon, R.Z., Fuchs, C.S., Petersen, G.M., Arslan, A.A., Bueno-de-Mesquita, H.B., Gross, M., Helzlsouer, K., Jacobs, E.J., LaCroix, A., Zheng, W., Albanes, D., Bamlet, W., Berg, C.D., Berrino, F., Bingham, S., Buring, J.E., Bracci, P.M., Canzian, F., Clavel-Chapelon, F., Clipp, S., Cotterchio, M., de Andrade, M., Duell, E.J., Fox, J.W., Jr., Gallinger, S., Gaziano, J.M., Giovannucci, E.L., Goggins, M., Gonzalez, C.A., Hallmans, G., Hankinson, S.E., Hassan, M., Holly, E.A., Hunter, D.J., Hutchinson, A., Jackson, R., Jacobs, K.B., Jenab, M., Kaaks, R., Klein, A.P., Kooperberg, C., Kurtz, R.C., Li, D., Lynch, S.M., Mandelson, M., McWilliams, R.R., Mendelsohn, J.B., Michaud, D.S., Olson, S.H., Overvad, K., Patel, A.V., Peeters, P.H., Rajkovic, A., Riboli, E., Risch, H.A., Shu, X.O., Thomas, G., Tobias, G.S., Trichopoulos, D., Van Den Eeden, S.K., Virtamo, J., Wactawski-Wende, J., Wolpin, B.M., Yu, H., Yu, K., Zeleniuch-Jacquotte, A., Chanock, S.J., Hartge, P. und Hoover, R.N. Genome-wide association study identifies variants in the ABO locus

- associated with susceptibility to pancreatic cancer. *Nat Genet.* Sep 2009;41(9):986-990.
86. Yamamoto F., Clausen, H., White, T., Marken, J. und Hakomori, S. Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature.* May 17 1990;345(6272):229-233.
  87. Blumenfeld O.O. und Patnaik, S.K. Allelic genes of blood group antigens: a source of human mutations and cSNPs documented in the Blood Group Antigen Gene Mutation Database. *Hum Mutat.* Jan 2004;23(1):8-16.
  88. Springer G.F., Williamson, P. und Readler, B.L. Blood group active gram-negative bacteria and higher plants. *Ann N Y Acad Sci.* 1962;97:104-110.
  89. Murray N.A. und Roberts, I.A. Haemolytic disease of the newborn. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* Mar 2007;92(2):F83-88.
  90. Daniels G. Functions of red cell surface proteins. *Vox Sang.* Nov 2007;93(4):331-340.
  91. Warner P.R. und Nester, T.A. ABO-incompatible solid-organ transplantation. *Am J Clin Pathol.* Jun 2006;125 Suppl:S87-94.
  92. Tobian A.A., Shirey, R.S., Montgomery, R.A., Ness, P.M. und King, K.E. The critical role of plasmapheresis in ABO-incompatible renal transplantation. *Transfusion.* Nov 2008;48(11):2453-2460.
  93. Farges O., Kalil, A.N., Samuel, D., Saliba, F., Arulnaden, J.L., Debat, P., Bismuth, A., Castaing, D. und Bismuth, H. The use of ABO-incompatible grafts in liver transplantation: a life-saving procedure in highly selected patients. *Transplantation.* Apr 27 1995;59(8):1124-1133.
  94. Heffron T., Welch, D., Pillen, T., Asolati, M., Smallwood, G., Hagedorn, P., Nam, C., Duncan, A., Guy, M., Martinez, E., Spivey, J., Douglas, P., Fasola, C., De Paolo, J., Rodriguez, J. und Romero, R. Successful ABO-incompatible pediatric liver transplantation utilizing standard immunosuppression with selective postoperative plasmapheresis. *Liver Transpl.* Jun 2006;12(6):972-978.
  95. West L.J., Pollock-Barziv, S.M., Dipchand, A.I., Lee, K.J., Cardella, C.J., Benson, L.N., Rebeyka, I.M. und Coles, J.G. ABO-incompatible heart transplantation in infants. *N Engl J Med.* Mar 15 2001;344(11):793-800.
  96. Edvardsson L., Dykes, J., Olsson, M.L. und Olofsson, T. Clonogenicity, gene expression and phenotype during neutrophil versus erythroid differentiation of cytokine-stimulated CD34+ human marrow cells in vitro. *Br J Haematol.* Nov 2004;127(4):451-463.
  97. Cao Y., Merling, A., Karsten, U. und Schwartz-Albiez, R. The fucosylated histo-blood group antigens H type 2 (blood group O, CD173) and Lewis Y (CD174) are expressed on CD34+ hematopoietic progenitors but absent on mature lymphocytes. *Glycobiology.* Aug 2001;11(8):677-683.
  98. Stussi G., Mueller, R.J., Passweg, J., Schanz, U., Rieben, R. und Seebach, J.D. ABO blood group incompatible haematopoietic stem cell transplantation and xenograft rejection. *Swiss Med Wkly.* Jan 13 2007;137(1-2):13-20.
  99. Avent N.D. und Reid, M.E. The Rh blood group system: a review. *Blood.* Jan 15 2000;95(2):375-387.
  100. Smythe J.S., Avent, N.D., Judson, P.A., Parsons, S.F., Martin, P.G. und Anstee, D.J. Expression of RHD and RHCE gene products using

- retroviral transduction of K562 cells establishes the molecular basis of Rh blood group antigens. *Blood*. Apr 1 1996;87(7):2968-2973.
101. Colin Y., Cherif-Zahar, B., Le Van Kim, C., Raynal, V., Van Huffel, V. und Cartron, J.P. Genetic basis of the RhD-positive and RhD-negative blood group polymorphism as determined by Southern analysis. *Blood*. Nov 15 1991;78(10):2747-2752.
  102. Hackney D.N., Knudtson, E.J., Rossi, K.Q., Krugh, D. und O'Shaughnessy, R.W. Management of pregnancies complicated by anti-c isoimmunization. *Obstet Gynecol*. Jan 2004;103(1):24-30.
  103. Chapman J. und Waters, A.H. Haemolytic disease of the newborn due to Rhesus anti-e antibody. *Vox Sang*. 1981;41(1):45-47.
  104. Moise K.J., Jr. Non-anti-D antibodies in red-cell alloimmunization. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. Sep 2000;92(1):75-81.
  105. Geifman-Holtzman O., Wojtowycz, M., Kosmas, E. und Artal, R. Female alloimmunization with antibodies known to cause hemolytic disease. *Obstet Gynecol*. Feb 1997;89(2):272-275.
  106. Dean L. Blood Groups and Red Cell Antigens. In: Beck B., ed: NCBI; 2005.
  107. Avent N.D., Madgett, T.E., Lee, Z.E., Head, D.J., Maddocks, D.G. und Skinner, L.H. Molecular biology of Rh proteins and relevance to molecular medicine. *Expert Rev Mol Med*. 2006;8(13):1-20.
  108. Marini A.M., Matassi, G., Raynal, V., Andre, B., Cartron, J.P. und Cherif-Zahar, B. The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast. *Nat Genet*. Nov 2000;26(3):341-344.
  109. Zidi-Yahiaoui N., Mouro-Chanteloup, I., D'Ambrosio, A.M., Lopez, C., Gane, P., Le van Kim, C., Cartron, J.P., Colin, Y. und Ripoche, P. Human Rhesus B and Rhesus C glycoproteins: properties of facilitated ammonium transport in recombinant kidney cells. *Biochem J*. Oct 1 2005;391(Pt 1):33-40.
  110. Westhoff C.M. The Rh blood group system in review: a new face for the next decade. *Transfusion*. Nov 2004;44(11):1663-1673.
  111. Bryan C.F., Mitchell, S.I., Lin, H.M., Nelson, P.W., Shield, C.F., 3rd, Luger, A.M., Pierce, G.E., Ross, G., Warady, B.A., Aeder, M.I., Helling, T.S., Landreneau, M.D. und Harrell, K.M. Influence of the Rh (D) blood group system on graft survival in renal transplantation. *Transplantation*. Feb 27 1998;65(4):588-592.
  112. Osman Y., El-Husseini, A., Sheashaa, H., Amani, M., Bakr, M.A. und El-Din, A.B. Impact of Rh(D) blood group system on graft function and survival in live-donor kidney transplantation: a single-institution experience. *Transplantation*. Dec 15 2004;78(11):1693-1696.
  113. Busquets J., Castellote, J., Torras, J., Fabregat, J., Ramos, E., Llado, L., Rafecas, A., de la Banda, E. und Figueras, J. Liver transplantation across Rh blood group barriers increases the risk of biliary complications. *J Gastrointest Surg*. Apr 2007;11(4):458-463.
  114. Ramsey G. Red cell antibodies arising from solid organ transplants. *Transfusion*. Jan 1991;31(1):76-86.
  115. Lee J.H. und Mintz, P.D. Graft versus host anti-Rho(D) following minor Rh-incompatible orthotopic liver transplantation. *Am J Hematol*. Nov 1993;44(3):168-171.

116. Cserti-Gazdewich C.M., Waddell, T.K., Singer, L.G., Chaparro, C., Pendergrast, J.M., Hawes, J., denHollander, N., Tinckam, K. und Keshavjee, S. Passenger lymphocyte syndrome with or without immune hemolytic anemia in all Rh-positive recipients of lungs from rhesus alloimmunized donors: three new cases and a review of the literature. *Transfus Med Rev.* Apr 2009;23(2):134-145.
117. Ainsworth C.D., Crowther, M.A., Treleaven, D., Evanovitch, D., Webert, K.E. und Blajchman, M.A. Severe hemolytic anemia post-renal transplantation produced by donor anti-D passenger lymphocytes: case report and literature review. *Transfus Med Rev.* Apr 2009;23(2):155-159.
118. Lee S., Zambas, E.D., Marsh, W.L. und Redman, C.M. Molecular cloning and primary structure of Kell blood group protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 15 1991;88(14):6353-6357.
119. Lee S., Wu, X., Reid, M., Zelinski, T. und Redman, C. Molecular basis of the Kell (K1) phenotype. *Blood.* Feb 15 1995;85(4):912-916.
120. Jung H.H., Danek, A. und Frey, B.M. McLeod syndrome: a neurohaematological disorder. *Vox Sang.* Aug 2007;93(2):112-121.
121. Chiaroni J., Dettori, I., Ferrera, V., Legrand, D., Touinssi, M., Mercier, P., de Micco, P. und Reviron, D. HLA-DRB1 polymorphism is associated with Kell immunisation. *Br J Haematol.* Feb 2006;132(3):374-378.
122. Lee S., Lin, M., Mele, A., Cao, Y., Farmar, J., Russo, D. und Redman, C. Proteolytic processing of big endothelin-3 by the kell blood group protein. *Blood.* Aug 15 1999;94(4):1440-1450.
123. Russo D., Wu, X., Redman, C.M. und Lee, S. Expression of Kell blood group protein in nonerythroid tissues. *Blood.* Jul 1 2000;96(1):340-346.
124. de La Rubia J., Arriaga, F., Andreu, R., Sanz, G., Jimenez, C., Vicente, A., Carpio, N., Marty, M.L. und Sanz, M.A. Development of non-ABO RBC alloantibodies in patients undergoing allogeneic HPC transplantation. Is ABO incompatibility a predisposing factor? *Transfusion.* Jan 2001;41(1):106-110.
125. Erker C.G., Steins, M.B., Fischer, R.J., Kienast, J., Berdel, W.E., Sibrowski, W. und Cassens, U. The influence of blood group differences in allogeneic hematopoietic peripheral blood progenitor cell transplantation. *Transfusion.* Aug 2005;45(8):1382-1390.
126. Hadley T.J. und Peiper, S.C. From malaria to chemokine receptor: the emerging physiologic role of the Duffy blood group antigen. *Blood.* May 1 1997;89(9):3077-3091.
127. Tournamille C., Le Van Kim, C., Gane, P., Cartron, J.P. und Colin, Y. Molecular basis and PCR-DNA typing of the Fya/fyb blood group polymorphism. *Hum Genet.* Apr 1995;95(4):407-410.
128. Tournamille C., Colin, Y., Cartron, J.P. und Le Van Kim, C. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. *Nat Genet.* Jun 1995;10(2):224-228.
129. Chaudhuri A., Polyakova, J., Zbrzezna, V. und Pogo, A.O. The coding sequence of Duffy blood group gene in humans and simians: restriction fragment length polymorphism, antibody and malarial parasite specificities, and expression in nonerythroid tissues in Duffy-negative individuals. *Blood.* Feb 1 1995;85(3):615-621.

130. Le Pennec P.Y., Rouger, P., Klein, M.T., Robert, N. und Salmon, C. Study of anti-Fya in five black Fy(a-b-) patients. *Vox Sang.* 1987;52(3):246-249.
131. Kim H.H., Park, T.S., Oh, S.H., Chang, C.L., Lee, E.Y. und Son, H.C. Delayed hemolytic transfusion reaction due to anti-Fyb caused by a primary immune response: a case study and a review of the literature. *Immunohematology.* 2004;20(3):184-186.
132. Vescio L.A., Farina, D., Rogido, M. und Sola, A. Hemolytic disease of the newborn caused by anti-Fyb. *Transfusion.* Jul-Aug 1987;27(4):366.
133. Chitnis C.E., Chaudhuri, A., Horuk, R., Pogo, A.O. und Miller, L.H. The domain on the Duffy blood group antigen for binding Plasmodium vivax and P. knowlesi malarial parasites to erythrocytes. *J Exp Med.* Oct 1 1996;184(4):1531-1536.
134. Neote K., Darbonne, W., Ogez, J., Horuk, R. und Schall, T.J. Identification of a promiscuous inflammatory peptide receptor on the surface of red blood cells. *J Biol Chem.* Jun 15 1993;268(17):12247-12249.
135. Pruenster M., Mudde, L., Bombosi, P., Dimitrova, S., Zsak, M., Middleton, J., Richmond, A., Graham, G.J., Segerer, S., Nibbs, R.J. und Rot, A. The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity. *Nat Immunol.* Jan 2009;10(1):101-108.
136. Oppenheim J.J., Zachariae, C.O., Mukaida, N. und Matsushima, K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:617-648.
137. Westhoff C.M. und Reid, M.E. Review: the Kell, Duffy, and Kidd blood group systems. *Immunohematology.* 2004;20(1):37-49.
138. Olives B., Mattei, M.G., Huet, M., Neau, P., Martial, S., Cartron, J.P. und Bailly, P. Kidd blood group and urea transport function of human erythrocytes are carried by the same protein. *J Biol Chem.* Jun 30 1995;270(26):15607-15610.
139. Irshaid N.M., Henry, S.M. und Olsson, M.L. Genomic characterization of the kidd blood group gene: different molecular basis of the Jk(a-b-) phenotype in Polynesians and Finns. *Transfusion.* Jan 2000;40(1):69-74.
140. Daniels G., Poole, J., de Silva, M., Callaghan, T., MacLennan, S. und Smith, N. The clinical significance of blood group antibodies. *Transfus Med.* Oct 2002;12(5):287-295.
141. Matson G.A., Swanson, J. und Tobin, J.D. Severe hemolytic disease of the newborn caused by anti-Jka. *Vox Sang.* Apr 1959;4(2):144-147.
142. Kim W.D. und Lee, Y.H. A fatal case of severe hemolytic disease of newborn associated with anti-Jk(b). *J Korean Med Sci.* Feb 2006;21(1):151-154.
143. Pierce S.R., Hardman, J.T., Steele, S. und Beck, M.L. Hemolytic disease of the newborn associated with anti-Jk3. *Transfusion.* Mar-Apr 1980;20(2):189-191.
144. Sands J.M., Gargus, J.J., Frohlich, O., Gunn, R.B. und Kokko, J.P. Urinary concentrating ability in patients with Jk(a-b-) blood type who lack carrier-mediated urea transport. *J Am Soc Nephrol.* Jun 1992;2(12):1689-1696.

145. Lerut E., Van Damme, B., Noizat-Pirenne, F., Emonds, M.P., Rouger, P., Vanrenterghem, Y., Pirenne, J. und Ansart-Pirenne, H. Duffy and Kidd blood group antigens: minor histocompatibility antigens involved in renal allograft rejection? *Transfusion*. Jan 2007;47(1):28-40.
146. Leo A., Mytilineos, J., Voso, M.T., Weber-Nordt, R., Liebisch, P., Lensing, C. und Schraven, B. Passenger lymphocyte syndrome with severe hemolytic anemia due to an anti-Jk(a) after allogeneic PBPC transplantation. *Transfusion*. Jun 2000;40(6):632-636.
147. Leo A., Lenz, V. und Winteroll, S. Nonhemolytic passenger lymphocyte syndrome with anti-Jk after allogeneic peripheral blood progenitor cell transplantation. *Transfusion*. Aug 2004;44(8):1259-1260.
148. Robertson V., Hill, M., Bryant, J. und Dickson, L. Anti-Jkb identified in a Jkb positive recipient following T-cell depleted bone marrow transplant [abstract]. *Transfusion*. 1987;27.
149. Hareuveni M., Merchav, H., Austerlitz, N., Rahimi-Levene, N. und Ben-Tal, O. Donor anti-Jk(a) causing hemolysis in a liver transplant recipient. *Transfusion*. Mar 2002;42(3):363-367.
150. Murphy K., Travers, T. und Walport, M. *Janeway's Immunobiology*. 7 ed. New York: Garland Science; 2008.
151. Dierselhuis M. und Goulmy, E. The relevance of minor histocompatibility antigens in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. Aug 2009;14(4):419-425.
152. Colvin R.B. und Smith, R.N. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol*. Oct 2005;5(10):807-817.
153. Racusen L.C., Colvin, R.B., Solez, K., Mihatsch, M.J., Halloran, P.F., Campbell, P.M., Cecka, M.J., Cosyns, J.P., Demetris, A.J., Fishbein, M.C., Fogo, A., Furness, P., Gibson, I.W., Glotz, D., Hayry, P., Hunsickern, L., Kashgarian, M., Kerman, R., Magil, A.J., Montgomery, R., Morozumi, K., Nickleit, V., Randhawa, P., Regele, H., Seron, D., Seshan, S., Sund, S. und Trpkov, K. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant*. Jun 2003;3(6):708-714.
154. Takemoto S.K., Zeevi, A., Feng, S., Colvin, R.B., Jordan, S., Kobashigawa, J., Kupiec-Weglinski, J., Matas, A., Montgomery, R.A., Nickerson, P., Platt, J.L., Rabb, H., Thistlethwaite, R., Tyran, D. und Delmonico, F.L. National conference to assess antibody-mediated rejection in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. Jul 2004;4(7):1033-1041.
155. Piazza A., Poggi, E., Borrelli, L., Servetti, S., Monaco, P.I., Buonomo, O., Valeri, M., Torlone, N., Adorno, D. und Casciani, C.U. Impact of donor-specific antibodies on chronic rejection occurrence and graft loss in renal transplantation: posttransplant analysis using flow cytometric techniques. *Transplantation*. Apr 27 2001;71(8):1106-1112.
156. Pelletier R.P., Hennessy, P.K., Adams, P.W., VanBuskirk, A.M., Ferguson, R.M. und Orosz, C.G. Clinical significance of MHC-reactive alloantibodies that develop after kidney or kidney-pancreas transplantation. *Am J Transplant*. Feb 2002;2(2):134-141.
157. Terasaki P.I. und Ozawa, M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am J Transplant*. Mar 2004;4(3):438-443.

158. Seltsam A., Hell, A., Heymann, G. und Salama, A. Donor-derived alloantibodies and passenger lymphocyte syndrome in two of four patients who received different organs from the same donor. *Transfusion*. Mar 2001;41(3):365-370.
159. Watorek E., Boratynska, M., Halon, A. und Klinger, M. Anti-Fya antibodies as the cause of an unfortunate post-transplant course in renal transplant recipient. *Ann Transplant*. 2008;13(1):48-52.
160. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 1968;97:7.
161. Wadkins R.M. und Jovin, T.M. Actinomycin D and 7-aminoactinomycin D binding to single-stranded DNA. *Biochemistry*. Oct 1 1991;30(39):9469-9478.
162. Eliopoulos N., Stagg, J., Lejeune, L., Pommey, S. und Galipeau, J. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. *Blood*. Dec 15 2005;106(13):4057-4065.
163. Hernandez-Fuentes M.P., Baker, R.J. und Lechler, R.I. The alloresponse. *Rev Immunogenet*. 1999;1(3):282-296.
164. Storb R., Epstein, R.B., Rudolph, R.H. und Thomas, E.D. The effect of prior transfusion on marrow grafts between histocompatible canine siblings. *J Immunol*. Sep 1970;105(3):627-633.
165. Storb R., Prentice, R.L. und Thomas, E.D. Marrow transplantation for treatment of aplastic anemia. An analysis of factors associated with graft rejection. *N Engl J Med*. Jan 13 1977;296(2):61-66.
166. Gluckman J.C., Gluckman, E., Azogui, O., Guillet, J., Baldwin, W.M., Devergie, A., Chapuis, F., Brisson, E., Andersen, E. und Dausset, J. Monocytotoxic antibodies after bone marrow transplantation in aplastic anemia. *Transplantation*. Jun 1982;33(6):599-602.
167. Rasmusson I., Le Blanc, K., Sundberg, B. und Ringden, O. Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand J Immunol*. Apr 2007;65(4):336-343.
168. Beggs K.J., Lyubimov, A., Borneman, J.N., Bartholomew, A., Moseley, A., Dodds, R., Archambault, M.P., Smith, A.K. und McIntosh, K.R. Immunologic consequences of multiple, high-dose administration of allogeneic mesenchymal stem cells to baboons. *Cell Transplant*. 2006;15(8-9):711-721.
169. Berneman Z.N., van Bockstaele, D.R., Uyttenbroeck, W.M., Van Zaelen, C., Cole-Dergent, J., Muylle, L. und Peetermans, M.E. Flow-cytometric analysis of erythrocytic blood group A antigen density profile. *Vox Sang*. 1991;61(4):265-274.
170. Blanchard D., Bruneau, V., Bernard, D., Germond-Arnoult, F., Gourbil, A., David, B. und Muller, J.Y. Flow cytometry analysis of dual red blood cell populations after bone marrow transplantation. *Br J Haematol*. Apr 1995;89(4):741-747.
171. Stussi G., Huggel, K., Lutz, H.U., Schanz, U., Rieben, R. und Seebach, J.D. Isotype-specific detection of ABO blood group antibodies using a novel flow cytometric method. *Br J Haematol*. Sep 2005;130(6):954-963.
172. David B., Bernard, D., Navenot, J.M., Muller, J.Y. und Blanchard, D. Flow cytometric monitoring of red blood cell chimerism after bone marrow transplantation. *Transfus Med*. Sep 1999;9(3):209-217.

173. Han K.H., Croker, B.P., Clapp, W.L., Werner, D., Sahni, M., Kim, J., Kim, H.Y., Handlogten, M.E. und Weiner, I.D. Expression of the ammonia transporter, rh C glycoprotein, in normal and neoplastic human kidney. *J Am Soc Nephrol.* Oct 2006;17(10):2670-2679.
174. Liu Z., Chen, Y., Mo, R., Hui, C., Cheng, J.F., Mohandas, N. und Huang, C.H. Characterization of human RhCG and mouse Rhcg as novel nonerythroid Rh glycoprotein homologues predominantly expressed in kidney and testis. *J Biol Chem.* Aug 18 2000;275(33):25641-25651.
175. Liu Z., Peng, J., Mo, R., Hui, C. und Huang, C.H. Rh type B glycoprotein is a new member of the Rh superfamily and a putative ammonia transporter in mammals. *J Biol Chem.* Jan 12 2001;276(2):1424-1433.
176. Southcott M.J., Tanner, M.J. und Anstee, D.J. The expression of human blood group antigens during erythropoiesis in a cell culture system. *Blood.* Jun 15 1999;93(12):4425-4435.
177. Rojewski M.T., Schrezenmeier, H. und Flegel, W.A. Tissue distribution of blood group membrane proteins beyond red cells: evidence from cDNA libraries. *Transfus Apher Sci.* Aug 2006;35(1):71-82.
178. Cherif-Zahar B., Raynal, V., Gane, P., Mattei, M.G., Bailly, P., Gibbs, B., Colin, Y. und Cartron, J.P. Candidate gene acting as a suppressor of the RH locus in most cases of Rh-deficiency. *Nat Genet.* Feb 1996;12(2):168-173.
179. Huang C.H. The human Rh50 glycoprotein gene. Structural organization and associated splicing defect resulting in Rh(null) disease. *J Biol Chem.* Jan 23 1998;273(4):2207-2213.
180. Mouro-Chanteloup I., D'Ambrosio, A.M., Gane, P., Le Van Kim, C., Raynal, V., Dhermy, D., Cartron, J.P. und Colin, Y. Cell-surface expression of RhD blood group polypeptide is posttranscriptionally regulated by the RhAG glycoprotein. *Blood.* Aug 1 2002;100(3):1038-1047.
181. Pu J.J., Redman, C.M., Visser, J.W. und Lee, S. Onset of expression of the components of the Kell blood group complex. *Transfusion.* Jun 2005;45(6):969-974.
182. Segerer S., Regele, H., Mac, K.M., Kain, R., Cartron, J.P., Colin, Y., Kerjaschki, D. und Schlondorff, D. The Duffy antigen receptor for chemokines is up-regulated during acute renal transplant rejection and crescentic glomerulonephritis. *Kidney Int.* Oct 2000;58(4):1546-1556.
183. Segerer S., Bohmig, G.A., Exner, M., Colin, Y., Cartron, J.P., Kerjaschki, D., Schlondorff, D. und Regele, H. When renal allografts turn DARC. *Transplantation.* Apr 15 2003;75(7):1030-1034.
184. Akalin E. und Neylan, J.F. The influence of Duffy blood group on renal allograft outcome in African Americans. *Transplantation.* May 15 2003;75(9):1496-1500.
185. Mange K.C., Prak, E.L., Kamoun, M., Du, Y., Goodman, N., Danoff, T., Hoy, T., Newman, M., Joffe, M.M. und Feldman, H.I. Duffy antigen receptor and genetic susceptibility of African Americans to acute rejection and delayed function. *Kidney Int.* Sep 2004;66(3):1187-1192.
186. Schafer R., Schnaidt, M., Klaffschenkel, R.A., Siegel, G., Schule, M., Radlein, M.A., Hermanutz-Klein, U., Ayturan, M., Buadze, M., Gassner, C., Danielyan, L., Kluba, T., Northoff, H. und Flegel, W.A. Expression of

- blood group genes by mesenchymal stem cells. *Br J Haematol.* May 2011;153(4):520-528.
187. Timmer R.T., Klein, J.D., Bagnasco, S.M., Doran, J.J., Verlander, J.W., Gunn, R.B. und Sands, J.M. Localization of the urea transporter UT-B protein in human and rat erythrocytes and tissues. *Am J Physiol Cell Physiol.* Oct 2001;281(4):C1318-1325.
188. Inoue H., Jackson, S.D., Vikulina, T., Klein, J.D., Tomita, K. und Bagnasco, S.M. Identification and characterization of a Kidd antigen/UT-B urea transporter expressed in human colon. *Am J Physiol Cell Physiol.* Jul 2004;287(1):C30-35.
189. Prichett W.P., Patton, A.J., Field, J.A., Brun, K.A., Emery, J.G., Tan, K.B., Rieman, D.J., McClung, H.A., Nadeau, D.P., Mooney, J.L., Suva, L.J., Gowen, M. und Nuttall, M.E. Identification and cloning of a human urea transporter HUT11, which is downregulated during adipogenesis of explant cultures of human bone. *J Cell Biochem.* Jan 2000;76(4):639-650.
190. Storry J.R. Review: the function of blood group-specific RBC membrane components. *Immunohematology.* 2004;20(4):206-216.
191. Tang C., Lee, A.S., Volkmer, J.P., Sahoo, D., Nag, D., Mosley, A.R., Inlay, M.A., Ardehali, R., Chavez, S.L., Pera, R.R., Behr, B., Wu, J.C., Weissman, I.L. und Drukker, M. An antibody against SSEA-5 glycan on human pluripotent stem cells enables removal of teratoma-forming cells. *Nat Biotechnol.* Sep 2011;29(9):829-834.
192. Sundin M., Ringden, O., Sundberg, B., Nava, S., Gotherstrom, C. und Le Blanc, K. No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica.* Sep 2007;92(9):1208-1215.
193. Chang W.W., Lee, C.H., Lee, P., Lin, J., Hsu, C.W., Hung, J.T., Lin, J.J., Yu, J.C., Shao, L.E., Yu, J., Wong, C.H. und Yu, A.L. Expression of Globo H and SSEA3 in breast cancer stem cells and the involvement of fucosyl transferases 1 and 2 in Globo H synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 19 2008;105(33):11667-11672.
194. Palumberi D., Aldi, S., Ermini, L., Ziche, M., Finetti, F., Donnini, S. und Rosati, F. RNA-mediated gene silencing of FUT1 and FUT2 influences expression and activities of bovine and human fucosylated nucleolin and inhibits cell adhesion and proliferation. *J Cell Biochem.* May 12 2010.
195. Zhang Z., Sun, P., Liu, J., Fu, L., Yan, J., Liu, Y., Yu, L., Wang, X. und Yan, Q. Suppression of FUT1/FUT4 expression by siRNA inhibits tumor growth. *Biochim Biophys Acta.* Feb 2008;1783(2):287-296.
196. Moehler T.M., Sauer, S., Witzel, M., Andrulis, M., Garcia-Vallejo, J.J., Grobholz, R., Willhauck-Fleckenstein, M., Greiner, A., Goldschmidt, H. und Schwartz-Albiez, R. Involvement of alpha 1-2-fucosyltransferase I (FUT1) and surface-expressed Lewis(y) (CD174) in first endothelial cell-cell contacts during angiogenesis. *J Cell Physiol.* Apr 2008;215(1):27-36.
197. Mathieu S., Gerolami, R., Luis, J., Carmona, S., Kol, O., Crescence, L., Garcia, S., Borentain, P. und El-Battari, A. Introducing alpha(1,2)-linked fucose into hepatocarcinoma cells inhibits vasculogenesis and tumor growth. *Int J Cancer.* Oct 15 2007;121(8):1680-1689.

198. Davey R.J., Tourault, M.A. und Holland, P.V. The clinical significance of anti-H in an individual with the Oh (Bombay) phenotype. *Transfusion*. Nov-Dec 1978;18(6):738-742.
199. Lin-Chu M. und Broadberry, R.E. Blood transfusion in the para-Bombay phenotype. *Br J Haematol*. Aug 1990;75(4):568-572.
200. Daniels G.L. Studies on anti-H reagents. *Rev Fr Transfus Immunohematol*. Oct 1984;27(5):603-612.

## 9 Anhang

### 9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wirkungen von MSC auf immunologische Zellen .....	10
Abbildung 2: Neubauer-Zählkammer.....	37
Abbildung 3: Durchflusszytometrische Analyse von Erythrozyten .....	44
Abbildung 4: Punktwolkendiagramm mit den Parametern FSC und SSC .....	49
Abbildung 5: Auswahl des gates G1 = R1 .....	50
Abbildung 6: Beispiel: Lage der hinsichtlich Rhesus-e analysierten Zellen in G1 = R1.....	50
Abbildung 7: Beispiel: Setzen von G1 = R1 im Punktwolkendiagramm des Isotyps und Verteilung der hinsichtlich Blutgruppenantigen B untersuchten MSC in G1.....	53
Abbildung 8: Setzen der Marker M1 und M2 .....	53
Abbildung 9: Betrachtung der MSC mit Isotyp- und Blutgruppen Antikörper ....	54
Abbildung 10: Serologische Blutgruppenbestimmung .....	55
Abbildung 11: Genomische ABO-PCR der MSC.....	56
Abbildung 12: Genomische Rhesus CDE-PCR .....	57
Abbildung 13: Genomische KKD (Kell, Kidd und Duffy)-PCR .....	58
Abbildung 14: Expression von Blutgruppen-mRNA in undifferenzierten MSC, Populationen h59, h60, h63.....	60
Abbildung 15: Expression von Blutgruppen-mRNA in undifferenzierten MSC, Populationen h93, und h95 .....	61
Abbildung 16: Expression von Blutgruppen-mRNA in undifferenzierten MSC, Population h98 .....	62
Abbildung 17: Repräsentative dot plots der FACS-Messungen für A-, B-, bzw. H-Antigen positive Zellen mit und ohne Formalin im Vergleich. ....	64
Abbildung 18: Histogramme der in Abb. 17 dargestellten Messungen für R1 ..	65
Abbildung 19: Detektion von A-, B-, und H-Antigen auf Erythrozyten mittels FACS.....	68
Abbildung 20: Detektion von Rhesus-D-, -C- und -c-Antigen auf Erythrozyten mittels FACS .....	69

Abbildung 21: Detektion von Rhesus-E- und -e-Antigen auf Erythrozyten mittels FACS.....	70
Abbildung 22: Detektion der Antigene Kell (K) und Cellano (k) auf Erythrozyten mittels FACS .....	71
Abbildung 23: Detektion von DARC auf Erythrozyten mittels FACS.....	71
Abbildung 24: Detektion von Jk <sup>a</sup> - und Jk <sup>b</sup> -Antigen auf Erythrozyten mittels FACS .....	72
Abbildung 25: FACS-Analyse von mit FCS kultivierten MSC .....	73
Abbildung 26: Detektion von A-, B- und H-Antigen auf MSC mittels FACS.....	74
Abbildung 27: Expression von Antigen H auf MSC .....	74
Abbildung 28: Detektion von Rhesus D-, C-, c-, E-, e-Antigen auf MSC mittels FACS.....	75
Abbildung 29: Detektion von K- und k-Antigen auf MSC mittels FACS .....	76
Abbildung 30: Detektion von DARC-Antigen auf MSC mittels FACS .....	76
Abbildung 31: Detektion von Jk <sup>a</sup> - und Jk <sup>b</sup> -Antigen auf MSC mittels FACS.....	77

## 9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Phänotyp humaner MSC .....	8
Tabelle 2: Die Blutgruppensysteme, ihre Gene, Genorte und assoziierte CD-Nummern.....	14
Tabelle 3: Antigenmuster der Erythrozyten, IKET Tübingen .....	31
Tabelle 4: Antigenmuster der Erythrozyten, Fa. Immucor und Fa. Sanquin .....	31
Tabelle 5: Antigenmuster der Erythrozyten, Fa. Biotest .....	32
Tabelle 6: PCR-Programm für die Blutgruppensysteme ABO, CDE, KKD nach Inno-Train.....	40
Tabelle 7: Primeransatz der RT-PCR.....	42
Tabelle 8: Primersequenzen und PCR-Produkte.....	43
Tabelle 9: Verdünnung der Antikörperlösungen für die FACS-Analyse der Erythrozyten .....	47
Tabelle 10: Pipettierschema für die Blutgruppensysteme ABO, Kell/cellano, Kidd.....	47

Tabelle 11: Pipettierschema für das Rhesus Blutgruppensystem .....	48
Tabelle 12: Pipettierschema für das Duffy Blutgruppensystem .....	48
Tabelle 13: Verdünnung der Antikörperlösungen für die FACS-Analyse der MSC .....	52
Tabelle 14: Pipettierschema MSC .....	52
Tabelle 15: Serologische Bestimmung des Blutgruppenphänotyps auf Erythrozyten der MSC-Spender .....	56
Tabelle 16: Bezeichnung und Größe der PCR-Produkte der genomischen ABO-PCR. Ermittlung des ABO-Geno- und Phänotyps aus den Banden in Abb. 11	57
Tabelle 17: Bezeichnung und Größe der PCR-Produkte der genomischen CDE-PCR. Ermittlung des CDE-Genotyps aus den Banden in Abb. 12.....	58
Tabelle 18: Bezeichnung und Größe der PCR-Produkte der genomischen KKD-PCR. Ermittlung des KKD-Genotyps aus den Banden in Abb. 13.....	59
Tabelle 19: Optisch erkennbare Agglutination der nicht mit Formalin inkubierten Proben.....	63
Tabelle 20: Expression der Blutgruppen A, B, 0 auf Erythrozyten (IKET Tübingen) mit bekanntem Phänotyp.....	66
Tabelle 21: Expression der Blutgruppen A, B, 0 auf Erythrozyten (Fa. Biotest) mit bekanntem Phänotyp.....	66
Tabelle 22: Expression der Rhesusantigene auf Erythrozyten mit bekanntem Phänotyp .....	66
Tabelle 23: Expression der Rhesusantigene auf Erythrozyten mit bekanntem Phänotyp (Wiederholungsversuch) .....	67
Tabelle 24: Expression der Blutgruppenantigene Jk <sup>a</sup> , Jk <sup>b</sup> , K, k und DARC auf Erythrozyten mit bekanntem Phänotyp.....	67

### 9.3 Abkürzungen

7-AAD	7-Aminoactinomycin
AAMR	Acute Antibody Mediated Rejection
ADC	Analog Digital Converter

APZ	Antigenpräsentierende Zelle
BMMC	Bone Marrow Mononuclear Cells
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine
CCL	Chemokine Ligand (CC family)
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary DNA
CT	Computertomographie
ctl.	control
DARC	Duffy Antigen Receptor for Chemokines
DAT	Direkter Antihumanglobulintest
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DDT	Dithio-DL-threitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejection Fraction
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EPC	Endothelial Progenitor Cell
ESC	Embryonic Stem Cell
Fa.	Firma
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FEV1	Forciertes Expiratorisches 1-Sekunden Volumen
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward light Scatter
FUT	Fukosyltransferase
GA	Gentamicin, Amphotericin B
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GvHD	Graft versus Host Disease
h	human

HLA	Human Leukocyte Antigen
HSC	Haematopoetic Stem Cell
HSCT	Haematopoetic Stem Cell Transplantation
HUT	Human Urea Transporter
IBMX	3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthine
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ISCT	International Society for Cellular Therapy
LISS	Low Ionic Strength Solution
MCGS	Mesenchymal Cell Growth Supplement
MCP	Monocyte Chemotactic Protein
MGSA	Melanocyte Growth Stimulatory Activity
mHag	Minor Histokompatibilitätsantigen
MHC	Major Histocompatibility Complex
MHN	Morbus Haemolyticus neonatorum
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MSC	Mesenchymal Stem Cell, Mesenchymal Stromal Cell
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NOD/SCID	Non Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency
P	Passage
PBMNC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Poymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythin
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PET	Positronen-Emmisions-Tomographie

PGE	Prostaglandin E
PLS	Passenger Lymphocyte Syndrome
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
RANTES	Regulated on Activation, Normal T-Expressed and Secreted
RBC	Red Blood Cell
RhAG	Rhesus Assoziiertes Glykoprotein
RhBG, RhCG	Rhesus B/C Glykoprotein
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RW1, RLT, RPE	Die Abkürzungen der Firma Qiagen. Die genaue Zusammensetzung ist nicht bekannt
SAA	Schwere Aplastische Anämie
SDF	Stromal Derived Factor
Sfrp	Secreted frizzled protein
SLC14A1	Solute Carrier Family 14, member 1
SSC	Sideward light Scatter
SSEA	Stage Specific Embryonic Antigen
SSP	Sequenz Specific Priming
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	TRIS, Borsäure, EDTA
TCR	T-cell Receptor
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolet
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZNS	Zentrales Nervensystem
$\alpha$ -MEM	$\alpha$ -Modified Eagle's Medium

## 10 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. H. Northoff für die Aufnahme in sein Institut. Bei Herrn Dr. med. Richard Schäfer möchte ich mich ganz herzlich für die Überlassung des interessanten Themas für meine Dissertation sowie für die hervorragende und sehr engagierte Betreuung bedanken.

Ein herzliches Dankeschön gilt den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Mesenchymale Stammzellen des Instituts für klinische und experimentelle Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Tübingen: Frau Ursula Hermanutz-Klein für die universelle Unterstützung, insbesondere zu Fragen der FACS-Analyse, Frau Maria Anna Rädlein für ihre zahlreichen Hilfestellungen bei der Blutgruppen-PCR, Frau Monika Hirrlinger für ihre Unterstützung bei der Zellkultur, Herrn Roland Klaffschenkel für seine Hilfestellung bei den FACS-Analysen. Ihm und Herrn Dr. med. Georg Siegel gilt auch ein Dank für wertvolle Ratschläge bei der Ausarbeitung des Manuskripts. Der ganzen Arbeitsgruppe danke ich für die gemeinsamen Stunden im Labor in ausgesprochen freundlicher Arbeitsatmosphäre.

Ebenfalls gilt mein Dank Birgid Zimmermann und den anderen Mitarbeitern des KTM-Labors für ihre freundliche Einarbeitung in immunhämatologische Methoden und ihre Hilfsbereitschaft bei der Bereitstellung von Erythrozyten.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder Georg, die mich in allem Tun immer unterstützen.