

**Aus dem Bereich für Nephrologie, Dialyse und Hochdruckkrankheiten  
(Bereichsleiterin: Frau Prof. Dr. med. Sylvia Stracke, MME) der Klinik und Poliklinik  
für Innere Medizin A (Nephrologie)**

**der Universitätsmedizin Greifswald (Klinikdirektor: Herr Prof. Dr. med. Markus  
Lerch)**

**Expression des Blutgruppe A Antigens und Aktivität der  
Blutgruppe A-Glycosyltransferase in HUVEC nach der  
Kultivierung in humanem Serum der Blutgruppe A, B und  
0:**

**Implikationen für die blutgruppeninkompatible  
Lebendnierentransplantation**

---

**Inaugural - Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde**

**der Medizinischen Fakultät**

**der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald**

**2020**

**vorgelegt von**

**Diana Hartwig**

**geboren am 05.12.1987 in Eberswalde**

**Dekan:** Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

**1.Gutachter:** PD Dr. med. Sylvia Stracke

**2.Gutachter:** Prof. Dr. med. Matthias Girndt

**Jahr der Promotion:** 2020

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1.	Nierentransplantation und ihre Probleme .....	1
1.2.	Blutgruppeninkompatible Nierentransplantation.....	2
1.3.	Das ABO-Blutgruppensystem .....	7
1.4.	Akkommodation und ihre Hypothesen .....	9
1.5.	„Acquired B“ .....	11
<b>2</b>	<b>Fragestellung</b> .....	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
3.1.	Materialien.....	15
3.1.1.	Geräte.....	15
3.1.2.	Verbrauchsmaterialien .....	16
3.1.3.	Chemikalien.....	17
3.1.4.	Reagenzien Zellkultur.....	18
3.1.5.	Antikörper.....	19
3.1.6.	Zellen .....	19
3.1.7.	Kits.....	20
3.1.8.	Puffer .....	21
3.1.9.	Software .....	22
3.2.	Methoden .....	22
3.2.1.	Auftauen, Kultivieren, Passagieren und Kryokonservieren der HUVEC.....	22
3.2.2.	DNA-Isolation aus HUVEC und Blutgruppenbestimmung mittels TaqMan .....	24
3.2.3.	Qualitative Bestimmung der Blutgruppenantigene und der Glycosyltransferaseaktivität auf HUVEC nach Inkubation in blutgruppenfremden und -eigenem Serum über einen Zeitraum von 14 Tagen.....	26
3.2.4.	Immunfluoreszenz der Blutgruppenantigene der HUVEC .....	26
3.2.5.	Immunfluoreszenz der Blutgruppenantigene von Erythrozyten .....	27
3.2.6.	Lyse der HUVEC und Blutgruppen-Glycosyltransferase-Aktivitäts-ELISA.....	27
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>31</b>
4.1.	Vorversuche zur Inkubation der HUVEC in humanem Serum .....	31

4.2. Qualitative Bestimmung der Blutgruppenantigene und -Glycosyltransferaseaktivität auf HUVEC nach Inkubation in blutgruppenfremden und -eigenem Serum über einen Zeitraum von 14 Tagen .....	32
4.3. Immunfluoreszenz der HUVEC und der Erythrozyten.....	34
4.3.1. Immunfluoreszenz der Erythrozyten.....	35
4.3.2. Immunfluoreszenz der HUVEC.....	36
4.3.3. Immunfluoreszenz der HUVEC nach Inkubation in blutgruppenfremden und -eigenem Serum über einen Zeitraum von 14 Tagen .....	40
4.4. ELISA zur Bestimmung der Blutgruppen-Glycosyltransferase-Aktivität .....	45
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>53</b>
5.1. Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse .....	53
5.2. Inkubation der humanen venösen Endothelzellen in humanem Serum.....	53
5.3. 14-Tages-Versuche .....	54
5.4. Immunfluoreszenzfärbung der Blutgruppenantigene der HUVEC.....	55
5.5. Bedeutung der Blutgruppen-Glycosyltransferasen im Kontext der Akkommodation ....	63
5.6. Die Rolle des Antigenchimärismus bei der blutgruppeninkompatiblen Nierentransplantation.....	69
5.7. Spekulationen und Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zur Akkommodation .....	76
5.8. Ausblick.....	79
<b>6 Zusammenfassung .....</b>	<b>81</b>
<b>7 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>83</b>
<b>8 Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>85</b>
<b>9 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>90</b>
<b>10 Danksagung .....</b>	<b>96</b>
<b>11 Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>97</b>
<b>12 Lebenslauf .....</b>	<b>98</b>

# 1 Einleitung

---

## 1.1. Nierentransplantation und ihre Probleme

Die erste Nierentransplantation, bei der es sich um eine Xenotransplantation handelt, wurde zu Beginn des 19. Jahrhunderts unternommen. Problematisch war nur, dass derzeit jegliche Immunsuppression, sowie immunologische Hintergründe weitgehend unbekannt waren. Die erste Transplantation einer Niere in einen Hund wurde 1902 von Emerich Ullmann durchgeführt. 1906 verpflanzte Matthieu Jaboulay dann eine Schweineniere in eine Frau. Dies war also die erste Xenotransplantation einer Niere, welche jedoch nur 3 Tage in dem humanen Körper überlebte (Rödel et al., 2009).

Ein wichtiger Schritt in der Transplantationsmedizin bestand 1954 in der ersten erfolgreichen humanen Nierentransplantation, die am Peter Bent Brigham Hospital in Boston durchgeführt wurde. Hier erhielt ein nierenkranker Patient die Niere seines eineiigen Zwillingsbruders. Diese hatte den Vorteil, dass die Immunsysteme beider Brüder genetisch identisch waren und daher die Transplantation auch ohne Immunsuppression erfolgreich war (Rödel et al., 2009).

Nun gibt es aber zwei entscheidende Barrieren, welche eine solche Transplantation limitieren: Das HLA-System und das ABO-System. Diese beiden Systeme unterscheiden sich im Wesentlichen dadurch, dass beim ABO-System die Antikörper gegen blutgruppenfremde Antigene bereits ohne vorherige Exposition vorhanden sind, während beim HLA-System nur bei Exposition gegenüber bestimmten Antigenen Antikörper gebildet werden. Diese Immunisierung findet man beispielsweise bei Schwangerschaften oder auch Bluttransfusionen (Steiger et al., 2006). Erste Schritte in der Entwicklung einer immunsuppressiven Therapie stellte die Entdeckung der HLA-Antigene 1958 durch den französischen Hämatologen Jean Dausset dar. 1959 gelang es nun erstmals in Boston die Niere eines Verwandten, in diesem Falle eines zweieiigen Zwillingsbruders zu transplantieren und die Abstoßungsreaktion mit Hilfe immunsuppressiver Methoden in Form von Steroiden und Röntgenstrahlung zu unterdrücken (Rödel et al., 2009).

In Deutschland konnte erstmals 1963 von Wilhelm Brosig und Reinhard Nagel in Berlin eine humane Nierentransplantation durchgeführt werden. Auch eine Xenotransplantation wurde unternommen im Jahre 1910 von Dr. Ernst Unger. Hier wurde eine Affenniere transplantiert, da man damals noch der Ansicht war, dass die Blutgruppensysteme von Mensch und Tier identisch seien. Die Patientin starb jedoch wenige Stunden später (Eigler et al., 2002). Natürlich war man in Deutschland bestrebt, den Vorreitern in den USA zu folgen. Den

Wunsch, Nieren zu transplantieren, äußerte 1806 bereits Johann Wolfgang von Goethe, denn dieser litt an „stockendem Blutabgang mit dem Urin“ (Gräf HG., 1895). Jedoch steckte die Nierentransplantation noch in den Kinderschuhen, wurde in den Anfängen eher als *ultima ratio* betrachtet denn als wirkliches Heilverfahren. 1963 wurde Lars Röhl aus Göteborg nach Heidelberg berufen und erhielt dort einen Lehrstuhl im Fach Urologie. Er entwickelte dort 1967 ein Transplantationsprogramm (Eigler, 2002).

Seit den 80er Jahren verfolgte man die Idee, Nieren auch blutgruppeninkompatibel zu transplantieren.

Gerade in Ländern wie Japan, in denen aus kulturellen und religiösen Gründen Organspenden von Toten nur sehr geringfügig durchgeführt werden, stellte sich mit der Zeit ein Mangel an Organen ein. So bleibt für solche Länder nur noch die Möglichkeit der Lebendnierenspende oder der Überkreuzspende. Jedoch können 20 % der Lebendspenden aufgrund der ABO-Inkompatibilität nicht genutzt werden (Mühlbacher et al., 2007).

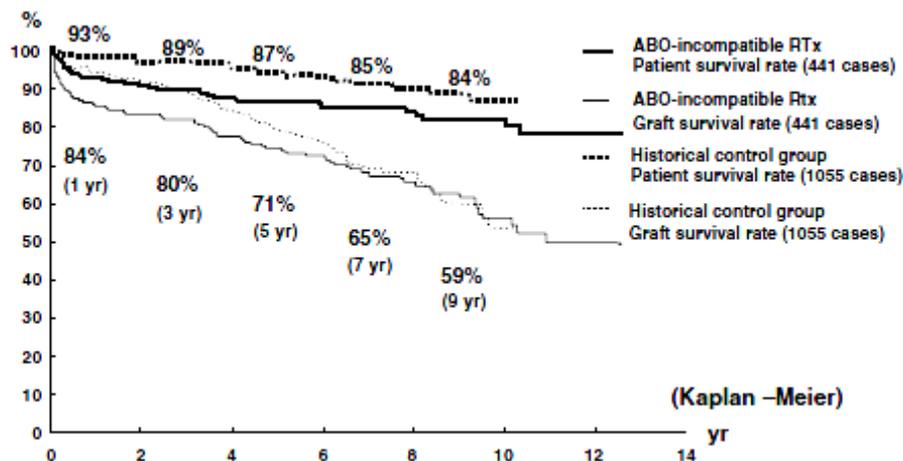
Einen weiteren Aspekt stellt natürlich auch die medizinische Entwicklung dar, sodass immer mehr Organe transplantiert werden können und der „Organmarkt“ in diesem Rahmen nicht proportional mitwächst (Steiger et al., 2006).

Hinzu kommt der demographische Wandel, der natürlich durch die immer älter werdende Bevölkerung auch einen Anteil an einer zunehmenden Nachfrage nach Transplantationsorganen mit sich bringt. Die Menschen werden älter und so auch ihre Organe. Man hat gelernt, Gelenke künstlich zu ersetzen, Herzen mittels Schrittmachersystemen zu unterstützen und auch Zahnlose mittels Prothesen zu versorgen. Im Falle der terminalen Niereninsuffizienz gibt es die apparative Nierenersatztherapie (Dialyse). Diese hat jedoch eigene Risiken und Nachteile. So werden Zweiterkrankungen wie renale Anämie und die sog. CKD-MBD („chronic kidney disease – mineral and bone disorder“) nicht aufgehalten und das Überleben ist an der Dialyse schlechter als nach Nierentransplantation (Wolfe et al. ,1999). Um das Überleben der terminal Nierenkranken zu verbessern und um die Ressourcen der verfügbaren Nieren zu erweitern, ist es sinnvoll, die Lebendnierenspende zu fördern und sich in diesem Rahmen der blutgruppeninkompatiblen Lebendnierenspende zu widmen.

## **1.2. Blutgruppeninkompatible Nierentransplantation**

Von 1989 bis 2001 wurden mehr als 300 Nieren in 40 Zentren blutgruppeninkompatibel transplantiert (Rydberg et al., 2001). Initial wurden dabei zunächst schlechte Ergebnisse erzielt. So wurden beispielsweise in den 70er Jahren in Göteborg 21 Nieren inkompatibel

transplantiert, von denen 40% innerhalb eines Monats und insgesamt 75% in den ersten fünf Jahren abgestoßen wurden. Daher verfolgten einige Länder diese Idee nicht weiter. Aber vor allem die Japaner hielten weiterhin daran fest, was letztendlich darin resultierte, dass seit 2001 die ein- bzw. drei-Jahres-Überlebensraten der Transplantate 96% bzw. 94% betragen und sich damit denen der ABO-kompatiblen Transplantationen angleichen (Abb.1) (Takahashi et al., 2006).



**Abb.1** Patienten- und Transplantatüberlebensraten für ABO-inkompatible Nierentransplantation und historische Kontrollgruppen, welche eine Lebendnierenspende erhielten (Takahashi et al., 2005).

Die Patienten werden auf eine solche Spende mit einer immunsuppressiven Therapie vorbereitet. Ziel dieser Therapie ist es, eine Abstoßung des Transplantats zu verhindern. Man unterscheidet dabei die zelluläre von der sogenannten humoralen, Antikörper-vermittelten Abstoßungsreaktion. Bei der zellulären Abstoßung werden HLA-Antigene auf dem Transplantat von Makrophagen des Empfängers erkannt, wodurch sie sich zu Antigen-präsentierenden Zellen umwandeln. Diese präsentieren ihre Information dann den T-Lymphozyten, welche daraufhin aktiviert werden, um Zytokine zu produzieren. Diese T-Zellen besiedeln aber auch das Transplantat und richten sich gegen bestimmte, ihnen zuvor präsentierte HLA-Antigene. Bei der Antikörper-vermittelten Reaktion existieren im Körper des Empfängers präformierte Antikörper gegen bestimmte Antigene, so z.B. das HLA-System oder auch das ABO-Blutgruppensystem. Sobald diese beiden Konkurrenten aufeinander treffen, formieren sie einen Antigen-Antikörper-Komplex und schädigen über eine Aktivierung des Komplementsystems das Transplantat. Denn hier kommt es zur Bildung

thrombotischer Gefäßverschlüsse und zur Entwicklung von Nekrosen. Die humorale Rejektion heißt daher auch vaskuläre Rejektion (Steiger et al., 2006).

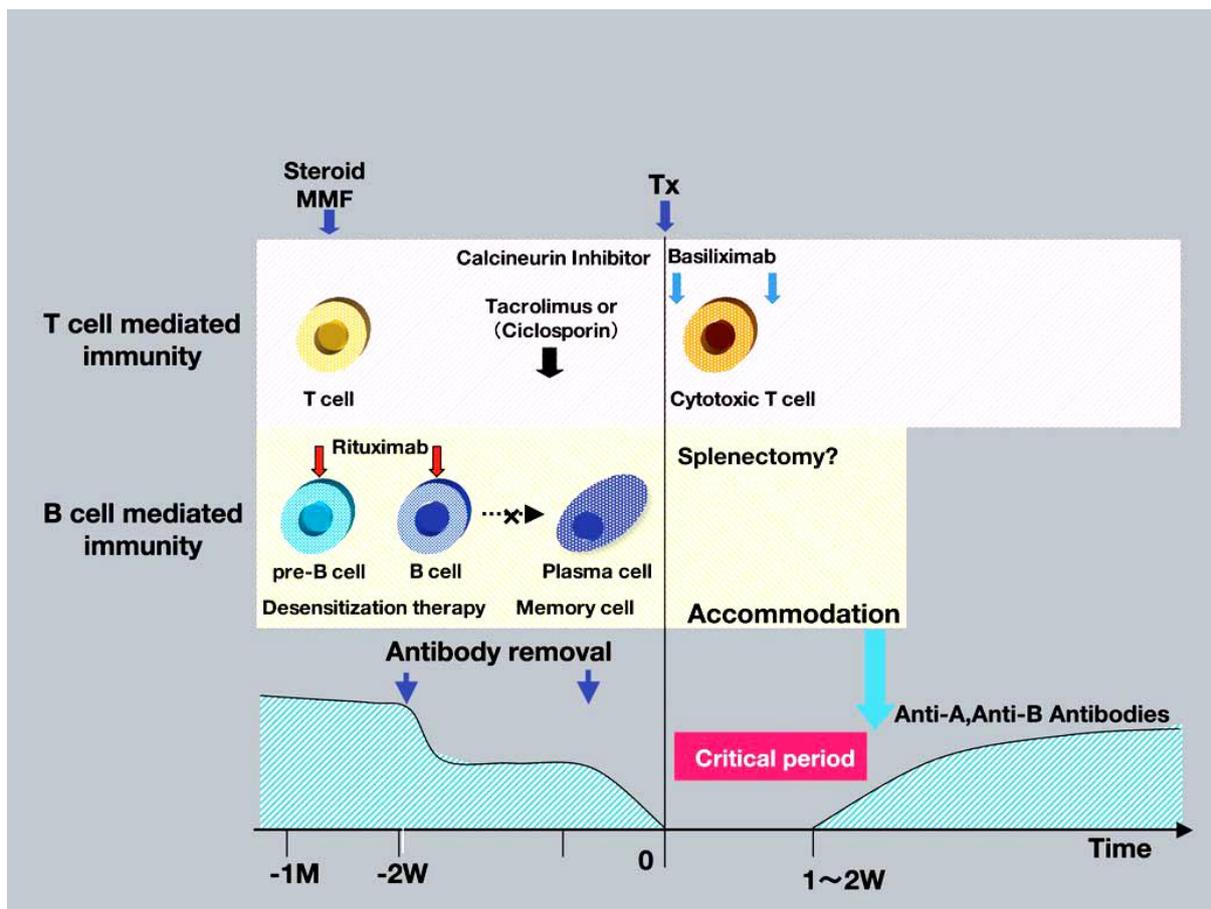
Bei der ABO-inkompatiblen Transplantation geht man davon aus, dass Patienten dann ein hohes immunologisches Risiko haben, d.h. also eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine Abstoßung haben, wenn sie bereits vor der Transplantation hohe Antikörpertiter gegen ABO-Antigene bzw. auch nach Entfernung der Antikörper mittels Immunadsorption oder Plasmapherese einen erneuten Anstieg der Antikörper-Titer aufweisen. Natürlich heißt das nicht, dass Patienten mit niedrigen Antikörper-Titern nie eine Abstoßungsreaktion erfahren. Die höchste Inzidenz für eine akute Antikörper-vermittelte Abstoßungsreaktion ist zwischen Tag zwei und sieben nach einer ABO-inkompatiblen Transplantation zu verzeichnen. Daher wird dieser Zeitraum auch als kritische Phase bezeichnet (Takahashi et al., 2006).

Die Therapie mit Immunsuppressiva ist zum einen wichtig in der Phase der Vorbereitung auf die Transplantation, aber auch in dem kritischen Zeitraum danach. Es ist aber auch darauf zu achten, eine übermäßige Immunsuppression zu vermeiden, da sonst opportunistische Infektionen drohen, die wiederum eine Gefahr für das Transplantat und natürlich auch den Empfänger selbst darstellen. Es soll also zum einen das Immunsystem des Empfängers soweit kontrolliert werden, dass keine Abstoßungsreaktionen initiiert werden und zum anderen die Gefahr von Infektionskrankheiten durch eine entsprechende antiinfektive Prophylaxe möglichst gering gehalten werden kann. Wichtig ist auch, dass nach Abschluss der kritischen Phase die immunsuppressive Therapie auf eine solche umgestellt wird, wie sie bei der blutgruppenkompatiblen Transplantation genutzt wird. Dadurch soll ebenfalls einer Überimmunsuppression und ihren Komplikationen vorgebeugt werden. Eine erste Maßnahme stellt die Entfernung der Antikörper des ABO-Blutgruppensystems aus dem Blut des Empfängers, welche gegen die entsprechenden Blutgruppenantigene des ABO-Systems des Spenders gerichtet sind, mittels Immunadsorption bzw. Plasmapherese dar. Ziel ist es, die Antikörper unter einen im jeweiligen Zentrum festgelegten Titer zu bringen (Khanna et al., 2016). Probleme, die hierbei auftreten können, sind ein zu niedriger kolloidosmotischer Druck und die damit verbundene intravaskuläre Dehydratation. Ein entscheidender Unterschied ist, dass bei der selektiven Immunadsorption lediglich die Antikörper, welche sich gegen die Blutgruppenantigene des Spenders richten, entfernt werden, wohingegen bei der Plasmapherese eine solche Selektion nicht stattfindet. Die Plasmapherese entfernt unselektiv alle Antikörper. Bei einigen Patienten ist es notwendig, diese Prozedur mehrfach zu wiederholen, da sie immer wieder ansteigende Titer aufweisen. Wie bereits erwähnt, sind

diese Patienten mit einem hohen immunologischen Risiko versehen. Nach der Transplantation muss diese Entfernung der Antikörper nicht unbedingt fortgesetzt werden, da das Risiko der Hypoproteinämie auch gleichzeitig das Überleben des Transplantats gefährdet. So führt man in dieser Phase eine erneute Plasmapherese nur durch, wenn es zu einem erneuten Anstieg der Antikörper-Titer kommt (Zschiedrich et al., 2015).

Medikamentös stehen Präparate zur Verfügung, die die T-Lymphozyten supprimieren. Dies ist besonders wichtig in der kritischen Phase nach der Transplantation, um der zellulären Abstoßung vorzubeugen. Hauptsächlich greift man dabei auf Calcineurininhibitoren, wie Tacrolimus oder auch Ciclosporin zurück. Desweiteren werden auch Medikamente verwendet, die gegen die B-Lymphozyten gerichtet sind, wie beispielsweise Rituximab, ein monoklonaler Antikörper. Diese sollten vor allem vor der Transplantation verabreicht werden um die Antikörper-vermittelte Abstoßung zu verhindern. In den Anfängen der blutgruppeninkompatiblen Nierentransplantation führte man vor der Transplantation die Splenektomie durch. Auf diese konnte durch die Einführung von Rituximab verzichtet werden (Amico et al., 2008). Ergänzend nutzt man auch Steroide (Abb.2). Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Therapie mit Antikoagulanzen, denn durch mögliche Antigen-Antikörper-Reaktionen kommt es zur lokalen Aktivierung der Gerinnungskaskade in kleinen Blutgefäßen, sodass sich Mikrothromben bilden. Um diesem Mechanismus vorzubeugen, wird niedermolekulares Heparin genutzt (Takahashi et al., 2006).

Ein Schema, das sich auf ein Stockholmer Protokoll bezieht, sieht beispielsweise so aus, dass vier Wochen vor der Transplantation mit Rituximab behandelt wird, um die Antikörpersynthese zu supprimieren. Zwei Wochen vor der Transplantation beginnt man mit der grundlegenden immunsuppressiven Therapie, bestehend aus Prednisolon, Tacrolimus und Mycophenolat-Mofetil. Eine Woche vorher wird dann mit der selektiven Entfernung der ABO-Antikörper aus dem Blut des Empfängers begonnen – d.h. bei einer geplanten Transplantation von A (Spender) auf B (Empfänger) werden die Anti-A-Antikörper im Blut des Empfängers entfernt (Abb.2). Liegt ein optimaler (in diesem Fall: Anti-A-)Antikörpertiter vor, so kann die Transplantation durchgeführt werden. Auch nach der Transplantation erfolgen tägliche Titerkontrollen, sodass gegebenenfalls auch eine erneute Immunadsorption bzw. Plasmapherese erfolgen muss, um die Titer bis zwei Wochen nach der Transplantation auf einem niedrigen Level zu halten (Steiger et al., 2006). Nach diesem Zeitraum spielt die Höhe der Antikörpertiter des ABO-Systems interessanterweise keine Rolle mehr (s. Kapitel 1.4 Akkommodation).



**Abb. 2** Strategie für die immunsuppressive Therapie in der ABO-inkompatiblen Organtransplantation (Takahashi et al., 2006).

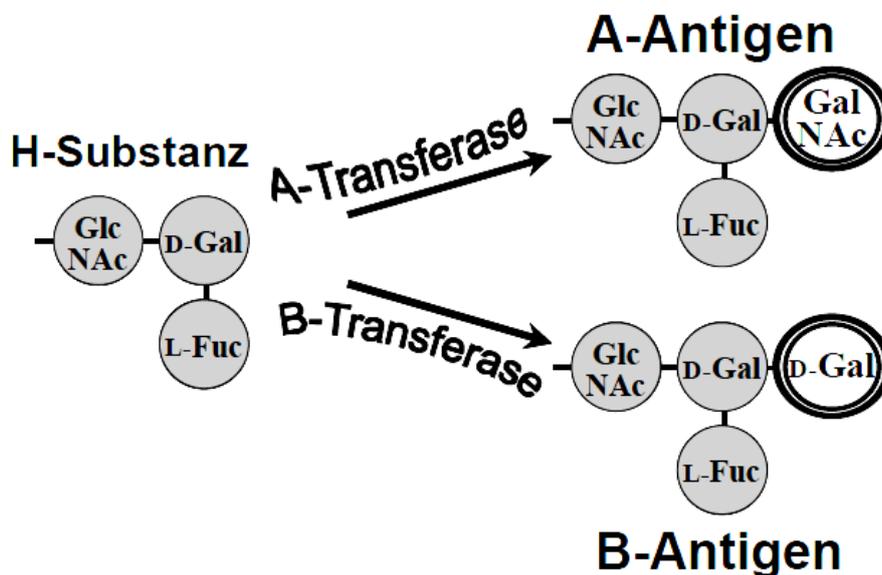
Zurzeit existiert noch keine Möglichkeit die Antigene im Spenderorgan *ex vivo* zu entfernen. Daher stehen im Moment lediglich die bereits genannten Möglichkeiten zur Verfügung.

Zusammenfassend ist es also wichtig, die Antikörpertiter des ABO-Systems unmittelbar vor der Transplantation unter einem im Transplantationszentrum festgelegten Titer zu halten (Takahashi et al., 2006). Bis etwa 14 Tage nach der Transplantation sollten die Titer weiterhin niedrig gehalten werden, um Schäden oder gar eine Abstoßung des Transplantats zu verhindern. Nach dieser kritischen Periode ist es dann nicht mehr notwendig die Antikörpertiter zu senken. Es kommt zu einem Ansteigen der Titer, aber dies scheint nicht von klinischer Relevanz zu sein. Dieses Phänomen wurde vor mehr als 20 Jahren entdeckt und wurde Akkommodation genannt (Lynch et al., 2010). Das bedeutet also, sobald dieses Phänomen einmal eingetreten ist, kann es nicht mehr zu einer Antikörper-vermittelten Abstoßungsreaktion durch Antikörper des ABO-Systems kommen. Die kritische Phase wurde also von einer stabilen Phase abgelöst (Takahashi et al., 2006).

### 1.3. Das ABO-Blutgruppensystem

Das ABO-Blutgruppensystem wurde 1901 erstmals von Karl Landsteiner, einem österreichischen Immunologen beschrieben. Für seine Entdeckung erhielt er 1930 den Nobelpreis für Medizin (Eberhorn et al., 2013).

ABO-Blutgruppenantigene finden sich nicht ausschließlich auf der Oberfläche von Erythrozyten, sondern ebenso in Körperflüssigkeiten und auf anderen Zellen, wie z.B. Endothelzellen oder speziell in den Nieren auch auf den Tubulusepithelien. Es handelt sich um Kohlenhydratstrukturen, die durch Glycosyltransferasen synthetisiert werden. Die Grundstruktur der Antigene stellt eine Disaccharideinheit aus D-Galactose und N-Acetyl-D-Glucosamin dar, an die nun schrittweise Monosaccharide angehängt werden unter Katalyse der entsprechenden Transferasen. So katalysiert die  $\alpha$ -L-Fucosyltransferase die Verknüpfung der Disaccharidgrundstruktur mit Fucose. Das entstandene Trisaccharid ist das H-Antigen, welches bei der Blutgruppe 0 zu finden ist. Durch eine  $\alpha$ -N-Acetylgalactosaminyltransferase bzw. eine  $\alpha$ -Galactosyltransferase wird aus dem Trisaccharid durch Anheftung von N-Acetylgalactosamin bzw. Galactose ein Tetrasaccharid, welches das A- bzw. B-Blutgruppenantigen darstellt (Abb.3). Dabei stellt die entsprechende Glycosyltransferase substratspezifisch eine  $\alpha$ 1,3-glykosidische Bindung her (Löffler et al., 2007).



**Abb.3** Die Entstehung der Blutgruppenantigene A und B aus dem H-Antigen (GalNAc – N-Acetylgalactosamin, Gal – Galactose, GlcNAc – N-Acetylglucosamin, Fuc – Fucose) (Universitätsmedizin Göttingen, 2008).

Gegen die nicht im Individuum ausgebildeten Blutgruppenantigene werden entsprechende Antikörper produziert. Diese Antikörper werden während des ersten Lebensjahres ohne vorherige Exposition gegenüber den blutgruppenfremden Antigenen gebildet (Steiger et al., 2006). Eine Besonderheit ist die Tatsache, dass es auch Individuen gibt, die keine aktive Fucosyltransferase besitzen. Es kann also demzufolge kein H-Blutgruppenantigen gebildet werden. Man spricht vom sogenannten Bombay-Phänotyp. Diese Individuen besitzen also weder ein A-, noch ein B- und auch kein H-Blutgruppenantigen und bilden daher Antikörper gegen diese drei Antigene aus.

Bei der Blutgruppe A existieren noch zwei Untergruppen, A<sub>1</sub> und A<sub>2</sub>. Diese unterscheiden sich lediglich in ihrer Dichte auf der Zelloberfläche. So haben Erythrozyten der Blutgruppe A<sub>1</sub> etwa 1 bis 1,5 Millionen Antigene auf ihrer zellulären Oberfläche. Das heißt also diese Erythrozyten sind im Besitz einer sehr aktiven  $\alpha$ 1,3-N-Acetylgalactosaminyltransferase. Die A<sub>2</sub>-Erythrozyten haben eine trägere Transferase. Für Blutgruppe B existieren auch Untergruppen, die aber eher im ostasiatischen Raum eine Rolle spielen.

Die ABO-Gene kodieren dabei für die entsprechenden Glycosyltransferasen. Diese Gene befinden sich auf Chromosom neun. Nun ist es so, dass bei den Blutgruppen A und B entsprechend aktive Enzyme kodiert werden, während bei der Blutgruppe 0 keine genetische Information für eine aktive Glycosyltransferase zur Verfügung steht, sodass also an die H-Blutgruppensubstanz kein weiteres Kohlenhydratmolekül angebaut werden kann. Die Allele der Blutgruppen A und B sind dabei gegenüber der Blutgruppe 0 dominant. Hat ein Individuum die Blutgruppe AB so spricht man von einer Kodominanz (Löffler et al., 2007).

Die Verteilung der Blutgruppen unterscheidet sich nicht nur unter den verschiedenen Blutgruppentypen, sondern auch weltweit. In Mitteleuropa stellt die Blutgruppe A mit 44,5% die häufigste dar, gefolgt von Blutgruppe 0 mit 40%. Blutgruppe B mit 10,5% und AB mit 4,5% stellen dabei die selteneren Gruppen dar. In anderen Ländern sieht es ganz anders aus, so z.B. ist die Blutgruppe 0 bei den amerikanischen Ureinwohnern zu 90% vertreten.

Weiterhin unterscheidet man die ABO-Blutgruppenantigene und ABO-Blutgruppenassoziierte Antigene. Mit ersteren meint man die Antigene, die auf der Oberfläche von Erythrozyten, Gewebszellen und Endothelzellen exprimiert sind. Mit letzteren meint man dem menschlichen Blutgruppensystem ähnliche Antigene, die in Pflanzen und Tieren zu finden sind. Diese können für die Transplantation eine wichtige Rolle spielen. Im menschlichen Körper können diese eine akute Abstoßungsreaktion des Transplantats verursachen in den ersten Wochen nach der Transplantation. Im Rahmen einer Sepsis reagiert der humane

Organismus auf die ABO-Blutgruppen-assoziierten Antigene durch Bildung von Antikörpern, die dann mit den ABO-Antigenen auf den Endothelzellen des Transplantats reagieren und so zur Antikörper-vermittelten Abstoßungsreaktion führen können (Takahashi et al., 2013).

#### **1.4. Akkommodation und ihre Hypothesen**

Der Begriff der Akkommodation wurde zuerst im Zusammenhang mit der Xenotransplantation verwendet. Hier wurde darunter eine Art Widerstand gegen die hyperakute und akute Abstoßung verstanden.

Im Zusammenhang mit der blutgruppeninkompatiblen Nierentransplantation wurde dieses Phänomen erstmals in den 80er Jahren beschrieben (Lynch et al., 2010).

Akkommodation bedeutet, dass das Immunsystem des Empfängers die blutgruppeninkompatibel transplantierte Spenderniere eigentlich abstoßen müsste, denn es werden Antikörper gebildet, welche gegen die blutgruppenfremden Antigene auf dem Empfängerorgan gerichtet sind. Dennoch kommt es nach Durchstehen der kritischen Phase (bis zwei Wochen nach Transplantation) nicht zu einer Abstoßung. Bisher sind die Ursachen dafür noch unzureichend verstanden. Es bestehen einige Hypothesen bezüglich der Ursachen dieses Phänomens. Einerseits vermutet man die Ursache in den betreffenden Blutgruppenantigenen, die sich möglicherweise morphologisch oder funktionell so verändern, dass weniger Antikörper daran binden, andererseits könnten aber auch die Antikörper selbst verändert werden, sodass sie eine geringere Zytotoxizität aufweisen (Lynch et al., 2010). Es existieren auch Überlegungen, dass Veränderungen auf Genebene als Ursache in Frage kommen könnten. Dies könnte beispielsweise die Expression von Genen betreffen, welche in die Regulation des Zellzyklus, der Apoptose oder auch des Immunsystems, beispielsweise das Komplementsystem eingreifen oder auch in die Regulation zytoprotektiver Mechanismen (Park et al., 2003).

Über die Komponente der Antigene existieren dabei noch relativ wenige Erkenntnisse. Dabei könnte es die zweite logische Erklärung für dieses Phänomen sein, wenn die Antikörper morphologisch keinerlei Veränderung erfahren. Möglicherweise existiert auch ein Zusammenhang zwischen der Expression der Gene, die für Enzyme kodieren, welche an der Bildung der Antigene beteiligt sind. Die Frage ist, ob sich diese Antigene über die Zeit verändern, das heißt: nehmen sie quantitativ ab oder aber verlieren sie über die Zeit möglicherweise ihre Aktivität (Takahashi et al., 2005).

Takahashi et al. hat bezüglich der Antigene in Zusammenhang mit der Akkommodation eine Modellvorstellung entwickelt. Seiner Meinung nach beginnt der Prozess schon während der

Organentnahme und Überführung in den Körper des Empfängers. Denn in dieser Zeit steht der Blutfluss still, das Organ ist ischämisch und wird gekühlt. Dadurch kommt es zu Schäden der Endothelzellen, die in ihrer Funktion beeinträchtigt werden und auch die Blutgruppenantigen-synthetisierenden Enzyme (Glycosyltransferasen) werden inaktiviert. Dadurch ist natürlich auch die Bildung der Blutgruppenantigene für eine gewisse Zeit unterbrochen. Ist der Blutfluss wiederhergestellt, kehrt jedoch die Funktion dieser Blutgruppen-Glycosyltransferasen wieder zurück und Blutgruppenantigene können wieder produziert werden. Diese wird wiederum auf Genebene initiiert. Wichtig ist zu diesem Zeitpunkt die Therapie des Empfängers mit Immunsuppressiva, um die Antikörper-Titer nahe Null zu halten und damit das Risiko einer Abstoßungsreaktion zu minimieren. Die restlichen Blutgruppenantikörper würden seiner Ansicht nach von den Blutgruppenantigenen auf der Oberfläche der Endothelzellen adsorbiert werden. Dann kommt das Phänomen der Akkommodation zum Tragen. Das Transplantat passt sich sozusagen an seine Umgebung an und die Expression der Gene, die für die Blutgruppen-Glycosyltransferasen kodieren, werden herunterreguliert und daher auch die Blutgruppenantigenproduktion. Er ist aber auch der Meinung, dass dadurch auch die Aktivität der übrigen Blutgruppenantigene vermindert ist (Takahashi et al., 2005).

Eine weitere Überlegung betrifft Antikörper, die gegen die Blutgruppenantigenproduzierenden Enzyme, die sogenannten Blutgruppen-Glycosyltransferasen, gerichtet sind. Man geht von der modellhaften Vorstellung aus, dass ein Empfänger der Blutgruppe 0, der keinerlei Glycosyltransferasen besitzt, die A-oder B-Blutgruppenantigene produzieren, ein Transplantat der Blutgruppe A oder B bekommt. Dieses Organ besitzt dann Blutgruppe A- bzw. B-Glycosyltransferasen, welche in dem „Empfängerkörper“ der Blutgruppe 0 als fremd vom Immunsystem erkannt werden. Daher richten sich Antikörper gegen diese fremden Blutgruppen A- bzw. B-Glycosyltransferasen, welche daraufhin funktionsuntüchtig wären, wodurch auch die Produktion der entsprechenden Blutgruppenantigene abnehmen würde (Barbolla et al., 1988). Leider wurden diese Überlegungen wenig verfolgt, sodass die Literatur darüber sehr begrenzt ist (Genberg et al., 2008).

Ob diese Akkommodation nun nur positive Aspekte hat, bleibt zu bezweifeln, denn genau wie jedes Medikament mit Nebenwirkungen behaftet ist, kann es sich auch mit einem solchen Phänomen verhalten. Es mag zwar die akute Abstoßung verhindern, aber es stellt sich die wichtige Frage, wie es mit den Veränderungen über die Zeit aussieht. So wurde in einigen Studien gezeigt, dass Langzeitschäden durchaus denkbar sind (Lynch et al., 2010).

Beispielsweise war dies der Fall in einer Studie, in der Affennieren blutgruppeninkompatibel, jedoch innerhalb der gleichen Spezies transplantiert wurden. 22% der Organe zeigten dabei 50 Tage nach der Transplantation eine Glomerulopathie (Smith et al., 2008). Diese Aspekte müssen jedoch intensiver untersucht werden. So zum Beispiel, unter welchen Bedingungen diese negativen Aspekte aufgetreten sind, ob es einen Zusammenhang mit Vorerkrankungen gab oder zwischen welchen Blutgruppen die Organe inkompatibel transplantiert wurden.

### **1.5. „Acquired B“**

Wie bereits erwähnt ist die Ursache der Akkommodation bisher noch ein ungelöstes Rätsel. Eine weitere Idee dazu könnte auch das sogenannte „Acquired B“ sein.

Es gibt einige Fälle, in denen es beobachtet wurde, bisher aber nur bei Patienten der Blutgruppe A. Durch eine Erkrankung getriggert werden die Kohlenhydratstrukturen der Blutgruppenantigene so verändert, dass eine Transformation in eine andere Blutgruppe stattfindet. In den bisher veröffentlichten Fällen handelt es sich dabei um Patienten der Blutgruppe A<sub>1</sub>, die nun eine Blutgruppe B ausbildeten. Krankheitsbilder, die dabei vorwiegend eine Rolle spielten, waren Infektionen sowie auch Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, wie das Kolonkarzinom. Grundlegend ist dabei eine Infektion durch ein Bakterium, welches ein besonderes Enzym, die Deacetylase besitzt, welche nun die N-Acetyl-Gruppe des A-Blutgruppenantigens abspaltet, so dass nur noch ein Galactosamin-Rest übrig bleibt. Dieses ist strukturell der Galactose-Gruppe der B-Blutgruppenantigene ähnlich, man spricht von einem Blutgruppen B-ähnlichen Antigen (Gerbil et al., 1976).

Einer anderen Theorie zufolge können die Bakterien diese B-Substanz selbst bilden, die dann sekundär an die Erythrozyten angelagert wird (Riess et al., 1988). Ein Fallbericht wurde von einer Münchner Arbeitsgruppe 1988 publiziert. Ein 50-jähriger Mann, der wegen einer AML eine zytotoxische Therapie erhielt, entwickelte einen Lungenabszess. Vor dieser Infektion war bei dem Patienten die Blutgruppe A<sub>1</sub> nachweisbar. Während der Infektion reagierte das Serum des Patienten nun mit Blutgruppe B-Antikörpern, aufgrund des Phänomen des „acquired B“ Antigens. Mikrobiologisch ließ sich *Bacillus cereus* aus dem Abszess nachweisen. Nach entsprechender erfolgreicher antibiotischer Therapie war das „acquired B“-Antigen nach drei Wochen nicht mehr nachweisbar (Riess et al., 1988).

Eine Schweizer Arbeitsgruppe berichtet über eine blutgruppeninkompatible Herztransplantation. Ein Empfänger der Blutgruppe 0 erhielt ein Herz der Blutgruppe B. In bestimmten Abständen wurden Biopsien des Transplantats durchgeführt und das Vorkommen der Antigene untersucht. 14 bis 30 Monate nach der Transplantation wurden B- und H-

Blutgruppenantigene entdeckt und nach 36 Monaten war nur noch das H-Blutgruppenantigen vorhanden. Somit hatte eine komplette Konversion der Blutgruppe des Spenderorgans zu der des Empfängers stattgefunden. Nach 44 Monaten war jedoch wieder die ursprüngliche Blutgruppe des Empfängers nachweisbar. Theorien bezüglich der Ursachen für diese Veränderung und Rücktransformation wurden hier nicht erörtert (Koestner et al., 2004).

Aber auch eine andere Theorie wäre denkbar, nämlich die, dass sezernierte A- oder B-Substanzen, welche sich im Blut eines Individuums befinden, an die ursprünglich vorhandenen Erythrozyten anlagern und eine neue Blutgruppe ausbilden. Dieser Fall wurde in einem Bericht des „New England Journal of Medicine“ 1992 beschrieben. Darin wurde der Fall eines fünfjährigen Jungen, der eine blutgruppeninkompatible Lebertransplantation erhielt dargestellt. Er selbst hatte die Blutgruppe 0, das Empfängerorgan die Blutgruppe AB. Der Verlauf nach der Transplantation wurde 250 Tage lang beobachtet. In dieser Zeit veränderte sich seine Blutgruppe zu der des Spenderorgans. Man vermutete, dass die transplantierte Leber Blutgruppe A- und B-Substanzen sezernierte, welche von den Empfängererythrozyten adsorbiert wurden. Nach 160 Tagen war seine ursprüngliche Blutgruppe wieder nachweisbar. Innerhalb dieses Zeitraums traten außerdem Komplikationen, in Form eines subhepatischen Abszesses, einer Graft-versus-Host-Reaktion, einer hämolytische Anämie durch Autoantikörper und einer Panzytopenie auf. Auch diese Komplikationen könnten Einfluss auf die Entwicklung des „Blutgruppen-Switchings“ haben (Comenzo et al., 1992).

Nun verfolgt man diesen Gedanken auch anderweitig weiter, indem man Möglichkeiten sucht A- oder auch B-Blutgruppenantigene komplett von den Oberflächen von Erythrozyten zu entfernen.

In den 80er Jahren wurde in New York beispielsweise ein Enzym aus Kaffeebohnen extrahiert, welches die Fähigkeit besitzt B-Blutgruppenantigene von der Erythrozytenoberfläche zu entfernen. Auch in Kopenhagen sucht man nach einem Enzym mit diesen Eigenschaften, welches man ähnlich wie bei der Entdeckung und Herstellung des Penicillins einfach aus Bakterien oder eben Pilzen herstellen könnte. Die Arbeitsgruppe um Henrik Clausen wurde fündig in Form des Bakteriums *Bacteroides fragilis*, welches ebenfalls B-Blutgruppenantigene entfernen kann. Aus einem weiteren Bakterium, welches als *Elizabethkingia meningosepticum* bezeichnet wird, konnte ein Blutgruppenantigen-A-entfernendes Enzym gefunden werden (Hohmann et al., 2007).

Neben dem Fortschritt im Bereich der Transplantationsmedizin, wäre dies auch ein entscheidender Durchbruch für die Transfusionsmedizin. So könnte eine Art Universalblut

hergestellt werden. Aber auch in der Transplantationsmedizin wäre dies ein bahnbrechender Schritt, denn dadurch könnte die Überlebenswahrscheinlichkeit der Transplantate bzw. die Verträglichkeit erheblich verbessert werden.

## 2 Fragestellung

---

Im Rahmen dieser Promotion sollen Erkenntnisse über das Phänomen der Akkommodation bei blutgruppeninkompatiblen Nierentransplantationen bezüglich der Expression der Blutgruppenantigene auf Endothelzellen gewonnen werden.

Bereits in den 80er Jahren befassten sich einige Arbeitsgruppen mit der Transplantation von Nieren über die Blutgruppenbarriere hinweg. Dies betraf insbesondere Länder, in denen die postmortale Organspende beispielsweise aus kulturellen Gründen einen zu geringen Prozentsatz ausmachte. So eröffnet diese Form der Transplantation neue Möglichkeiten einer Vielzahl von Menschen mit terminaler Niereninsuffizienz zu helfen.

Im Rahmen der blutgruppeninkompatiblen Nierentransplantation tritt das Phänomen der Akkommodation auf. Dabei kommt es trotz gleichzeitiger Anwesenheit von Blutgruppenantigenen des Spenderorgans und Antikörpern gegen diese Antigene nicht zu einer eigentlich zu erwartenden Abstoßungsreaktion. Die Ursachen dieses Ereignisses sind bisher aber unzureichend untersucht.

In meiner Promotion befaße ich mich hauptsächlich mit der Komponente der Blutgruppenantigene, zu welchen bislang wenig Daten in der Literatur zu finden sind. Als zellkulturelles Modell habe ich humane umbilikale venöse Endothelzellen (HUVEC) gewählt, die in humanes Serum enthaltendem Medium über die bereits erwähnte kritische Phase von 14 Tagen kultiviert wurden. Dabei wurde einerseits humanes Serum, welches die gleiche Blutgruppe wie die HUVEC aufweist, und zum anderen humanes Serum einer fremden Blutgruppe verwendet.

Mittels Immunfluoreszenz wurden dann das Vorhandensein bzw. Fehlen der Blutgruppenantigene auf der Oberfläche der HUVEC und die Aktivität der Blutgruppen-Glycosyltransferasen nachgewiesen und eventuelle qualitative Veränderungen detektiert.

Des Weiteren sollen diese Blutgruppenantigene auch quantitativ untersucht werden anhand eines ELISA. Dieser detektiert die Aktivität der Blutgruppen-Glycosyltransferasen bzw. deren Veränderungen über einen Zeitraum von 14 Tagen und lässt damit indirekt Rückschlüsse auf die quantitativen Veränderungen der Blutgruppenantigene zu.

Ziel ist es, die Veränderungen der Menge der Blutgruppenantigene und die Aktivität der Blutgruppen-Glycosyltransferasen humaner Endothelzellen zu beobachten und über dieses Modell mögliche Erkenntnisse bezüglich der Ursachen für das Ereignis der Akkommodation ziehen zu können.

# 3 Material und Methoden

---

## 3.1. Materialien

### 3.1.1. Geräte

**Tabelle 1:** Verwendete Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
7500 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Absaugpumpe	HLC Biotech, Bovenden
Brutschrank	Binder GmbH, Tuttlingen
Eppendorf-Pipetten; 0,1-2,5µl; 2-20µl; 20-200µl; 100-1000µl	Eppendorf, Hamburg
Gefrierschrank; -20°C	Liebherr, Rostock
Gefrierschrank; -80°C	Kryotec, Hamburg
Immunfluoreszenz-Mikroskop Olympus IX81	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Kühlschrank; 4°C	Liebherr, Rostock
Mikrozentrifuge (Microcentrifuge 5415R)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Neubauer Zählkammer	Carl Roth, Cat. T729.1, Karlsruhe
Phasenkontrastmikroskop Nikon Diaphot	Nikon, Düsseldorf
Photometer (SpectraMax 190 Absorbance Microplate Reader)	Molecular Devices, Sunnyvale (USA)
Sicherheitswerkbank MSC-Advantage	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Tischzentrifuge EBA 20	Hettich, Tuttlingen
Waage Analytic AC 120S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad Type 1004	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

### 3.1.2. Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2:** Verwendete Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Firma</b>
96-well-Platte (Flat bottom), steril	Becton Dickinson Labware, Cat. 353072, Franklin Lakes (USA)
96-well Platte (Micro Amp ®Optical)	Applied Biosystems, Cat 4306737, Darmstadt
Abdeckfolie für Mikroplatten	Greiner bio-one, Cat. 676040, Frickenhausen
Chamber slides (Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide™ System)	Thermo Scientific, Cat. 154534, Waltham (USA)
Deckgläschen; 20 x 20mm	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Cat. 4740882, Emmendingen
Eppendorf-Tube; 2,0ml	Eppendorf, Cat. 0030 120.094, Hamburg
Falcon-Röhrchen; 15 ml, steril	Sarstedt, Cat. 62.554.502, Nümbrecht
Falcon-Röhrchen; 50 ml, steril	BD Falcon, Cat. 352070, Franklin Lakes (USA)
Glaspipetten; 5 ml, 10 ml und 25 ml	Sarstedt, Cat. 86.1253.001, Cat. 86.1254.001, Cat. 86.1685.001, Nümbrecht
Kryoröhrchen; 2ml	Greiner, Cat. 126263, Frickenhausen
Micro-Tube, 1,5ml	Sarstedt, Cat. 72.690.001, Nümbrecht
Objekträger (Polysine®slides)	Thermo Scientific, Cat. P4981, Waltham (USA)
Pasteurpipetten	VWR International GmbH, Cat. 612-1702, Darmstadt

Pipettenspitzen für 0,1-10µl Pipetten	VWR International GmbH, Cat. 613-0364, Darmstadt
Pipettenspitzen für 20-200µl Pipetten	Greiner bio-one, Cat. 739291, Frickenhausen
Pipettenspitzen für 100-1000µl Pipetten	Ratiolab, Cat. 2100610, Dreieich
Spritzen; 10ml, steril	BD Discardit™ II, Cat. 309110, Franklin Lakes (USA)
Spritzenfilter; 0,22µm, steril (Rotilabo®-Spritzenfilter)	Carl Roth, Cat. P666.1, Karlsruhe
Zellkultivierungsschalen; 100 x 20mm	Sarstedt, Cat. 83.1802, Newton (USA)
Zellkulturflaschen; 25 cm <sup>2</sup>	Corning, Cat. 430639, New York (USA)

### 3.1.3. Chemikalien

**Tabelle 3:** Verwendete Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Firma</b>
Aprotinin	Sigma, Cat. A1153, Missouri (USA)
BSA (Bovine Serum Albumin)	GE Healthcare, Cat. K41-001, Pasching (Österreich)
DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid)	Roche, Cat. 10236276001, Basel (Schweiz)
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure); 0,5 M	Merck, Cat. 1.08421.1000, Darmstadt
Ethanol	Th. Geyer GmbH, Cas 64-17-5, Renningen
Fluorescence Mounting Medium	Dako, Cat. S302380-2, California (USA)
Glycerin	Sigma, Cat. G7893, Missouri (USA)
H-Disaccharid (Blood Group H disaccharide)	Carbosynth Ltd, Cat. OB05907, Compton Berkshire (UK)

HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure); pH 7,5	Sigma, Cat. H3375, Missouri (USA)
Leupeptin	Sigma, Cat. L2884, Missouri (USA)
Natriumchlorid	Carl Roth, Cat. 3957.2, Karlsruhe
Natriumfluorid	Sigma, Cat. S1504, Missouri (USA)
Nukleasefreies Wasser	Ambion®, Cat. 4387936, (USA)
Paraformaldehyd	Merck, Cat. 1040051000, Darmstadt
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma, Cat. P7626, Missouri (USA)
TaqMan Mix	Applied Biosystems,
TaqMan Genotyping Master Mix	Applied Biosystems, Cat. 4371357, USA
Triton X-100	Sigma, Cat. T8532, Missouri (USA)
UDP-N-Acetylgalactosamin (Uridine 5'-diphospho-N-acetylgalactosamine disodium salt)	Sigma, Cat. U5252, Missouri (USA)
Ziege-Normalserum	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Cat. 005-000-121, Newmarket (UK)

### 3.1.4. Reagenzien Zellkultur

**Tabelle 4:** Verwendete Zellkulturreagenzien

Reagenz	Firma
Accutase (StemPro®Accutase®); 100 ml	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Cat. A11105-01, Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid); 10%	ApplieChem GmbH, Cat. A3672 0100, Darmstadt

ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement)	PromoCell, Cat. C-30160, Heidelberg
EGF (Endothelial Growth Factor)	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Cat. 50-9706, Darmstadt
FBS (Fetal Bovine Serum)	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Cat. 50-9704, Darmstadt
bFGF (Fibroblastenwachstumsfaktor)/ Heparin/ BSA (Bovine Serum Albumin)	Invitrogen, Life Technologie, GmbH, Cat. 50-9705, Darmstadt
Humanes Serum Blutgruppe A, B, 0 und AB	Transfusionsmedizin der Universität Greifswald
Medium 200	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Cat. M-200-500, Darmstadt

### 3.1.5. Antikörper

**Tabelle 5:** Verwendete Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Firma</b>
Blood Group A antigen [HE-193] antibody (Immunfluoreszenz)	GeneTex, Cat. GTX22521, Irvine (USA)
Blood group B antigen [HEB-29] antibody (Immunfluoreszenz)	GeneTex, Cat. GTX22524, Irvine (USA)
FITC-konjugierter Sekundärantikörper (Goat anti-mouse IgM (FITC)) (Immunfluoreszenz)	antibodies-online, Cat. ABIN102677, Aachen

### 3.1.6. Zellen

**Tabelle 6:** Verwendete Zellen

<b>Zellen</b>	<b>Firma</b>
Erythrozyten	Transfusionsmedizin der Universität Greifswald, Greifswald
HUVEC (Humane umbilikale venöse Endothelzellen)	Frauenklinik der Universität Greifswald, Greifswald

### 3.1.7. Kits

**Tabelle 7:** Verwendete Kits

<b>Kit und Inhalt</b>	<b>Firma</b>
ELISA Glycosyltransferase Kit	R&D Systems, Cat. EA001, Minneapolis (USA)
Coupling Phosphatase 1	R&D Systems, Cat. 895404, Minneapolis (USA)
Malachite Green Reagent A	R&D Systems, Cat. 895855, Minneapolis (USA)
Malachite Green Reagent B	R&D Systems, Cat. 895856, Minneapolis (USA)
MnCl <sub>2</sub> (Manganchlorid)	R&D Systems, Cat. 895407, Minneapolis (USA)
Phosphatase Buffer 1	R&D Systems, Cat. 895405, Minneapolis (USA)
Phosphate Standard	R&D Systems, Cat. 895408, Minneapolis (USA)
UDP (Uridindiphosphat)	R&D Systems, Cat. 895406, Minneapolis (USA)
Quick-gDNA™ MiniPrep	Zymo Research, Cat. D3025, Irvine (USA)
Collection Tubes	Zymo Research, Cat. C1001-500, Irvine (USA)
DNA Elution Buffer, 10ml	Zymo Research, Cat. D3004-4-10, Irvine (USA)
DNA Pre-Wash Buffer, 50ml	Zymo Research, Cat. D3004-5-50, Irvine (USA)
gDNA Wash Buffer, 100ml	Zymo Research, Cat. D3004-2-100, Irvine (USA)
Genomic Lysis Buffer, 100ml	Zymo Research, Cat. D3004-1-100, Irvine (USA)

Zymo-Spin™ Columns

Zymo Research, Cat. C1011-250,  
Irvine (USA)

### 3.1.8. Puffer

**Tabelle 8:** Verwendete Puffer

<b>Puffer inklusive Zusammensetzung</b>	<b>Firma</b>
<b>PBS (Phosphate Buffered Saline)</b>	
2,7mM Kaliumchlorid	Merck, Cat. 1049360500, Darmstadt
1,5mM Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Cat. 1051080500, Darmstadt
137mM Natriumchlorid	Carl Roth, Cat. 3957.2, Karlsruhe
8,1mM Natriumhydrogenphosphat	Merck, Cat. 1065860500, Darmstadt
<b>Lysis Puffer</b>	
Aprotinin	Sigma, Cat. A1153, Missouri (USA)
Leupeptin	Sigma, Cat. L2884, Missouri (USA)
2mM EDTA, pH 8,0	Merck, Cat. 1.08421.1000, Darmstadt
10 % Glycerin	Sigma, Cat. G7893, Missouri (USA)
50mM HEPES	Sigma, Cat. H3375, Missouri (USA)
150mM Natriumchlorid	Carl Roth, Cat. 3957.2, Karlsruhe
0,1M Natriumfluorid	Sigma, Cat. S1504, Missouri (USA)
0,1M PMSF	Sigma, Cat. P7626, Missouri (USA)
1 % Triton X-100	Sigma, Cat. T8532, Missouri (USA)

### 3.1.9. Software

**Tabelle 9:** Verwendete Software

<b>Software</b>	<b>Firma</b>
7500 Real-Time PCR System Software	Applied Biosystems, Darmstadt
cellSens Dimension	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Soft Max Pro 4.6	Molecular Devices, Sunnyvale (USA)

### 3.2. Methoden

#### 3.2.1. Auftauen, Kultivieren, Passagieren und Kryokonservieren der HUVEC

Die HUVEC, welche von dem Labor der Frauenklinik der Universität Greifswald bezogen wurden, wurden bis zur Nutzung in  $-172\text{ °C}$  kaltem flüssigen Stickstoff gelagert. Es erfolgte ein schnelles Auftauen der kryokonservierten Nabelschnurendothelzellen, indem diese zunächst für ca. ein bis zwei Minuten im  $37\text{ °C}$  Wasserbad aufgetaut wurden bis noch ein kleiner Eiskristall im Kryoröhrchen erkennbar war. Das Röhrchen wurde vor dem Überführen in die sterile Sicherheitswerkbank mit 70%igem Ethanol desinfiziert. In ein 15 ml Falcon-Röhrchen wurden 10 ml Medium 200, welches mit den entsprechenden Ergänzungsmitteln versetzt wurde, vorgelegt. Anschließend wurden die HUVEC in das Falcon-Röhrchen mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette überführt. Es erfolgte eine Zentrifugation für drei Minuten bei Raumtemperatur und mit 800 rpm. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in einer entsprechenden Menge Medium 200 resuspendiert. Die Zellen wurden auf eine Schale, die mit 5 bis 10 ml Medium 200 vorbereitet wurde, ausgesät. Danach wurden die HUVEC im Brutschrank bei  $37\text{ °C}$  mit 5%  $\text{CO}_2$  und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Eine Kontrolle der Adhärenz der Zellen erfolgte nach 24 Stunden unter dem Phasenkontrastmikroskop. Das Medium wurde nach weiteren 24 Stunden erstmals gewechselt.

Die HUVEC wurden nach dem Auftauen etwa fünf bis sieben Tage in Medium 200 kultiviert, bis sie eine Konfluenz von 80 % erreicht hatten. Dem Medium wurden einige Ergänzungsmittel in Form eines LSGS-Kits zugesetzt. Dieses beinhaltet fetales Kälberserum (FBS), einen Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF), Heparin, Rinderserumalbumin (BSA), einen endothelialen Wachstumsfaktor (EGF) und *Supplements* für das Wachstum endothelialer Zellen (ECGS). Vor der Zubereitung des Mediums wurde es auf  $37\text{ °C}$  im

Wasserbad vorgewärmt und die Bestandteile des LSGS-Kits aufgetaut. Das den Zellen zugesetzte Medium wurde alle 48 bis 72 Stunden unter sterilen Bedingungen gewechselt. Dazu wurden die Zellkulturschalen mit 70 %igem Ethanol desinfiziert und unter der Sicherheitswerkbank anschließend der Wechsel des Mediums vorgenommen. Zunächst wurde das alte Medium abgesaugt und im Anschluss wurde den HUVEC 10 ml frisches Medium 200 mit einer Pipette zugeführt. Die Zellen wurden dann weiter im Brutschrank bei 37°C mit 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Die HUVEC wurden vor der Blutgruppenbestimmung in Medium 200 mit den entsprechenden oben genannten Zusätzen und 2% FBS kultiviert. Nach Kenntnis der entsprechenden Blutgruppe wurde dann das FBS durch humanes Serum der entsprechenden Blutgruppe ersetzt.

Spenderserum wurde anonymisiert von der Transfusionsmedizin der Universität Greifswald in Form von Serumröhrchen mit bekannten Blutgruppen zur Verfügung gestellt. Diese wurden bei 6000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Unter der sterilen Sicherheitswerkbank wurde das Serum als Überstand vorsichtig abgenommen und in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Das gesamte Serum wurde mit Hilfe von 0,22µm-Spritzenfiltern steril filtriert und konnte anschließend für die Herstellung des blutgruppenspezifischen Mediums genutzt werden.

Die HUVEC wurden, nachdem sie eine Konfluenz von 80% erreicht hatten, auf neue Schalen umgesetzt. Dazu wurde zunächst das alte Medium abgesaugt und die adhärenen Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Mit 1 ml Accutase wurden die HUVEC vom Untergrund abgelöst. Das Enzym wurde dabei auf dem Boden der Schale gleichmäßig verteilt und etwa ein bis zwei Minuten einwirken gelassen. Die abgelösten Zellen zeigten unter dem Lichtmikroskop eine runde Form. Durch leichtes Beklopfen der Schalen wurden die restlichen Zellen vom Untergrund gelöst. Mit 10 ml Medium 200 wurde die Reaktion der Accutase beendet und durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren wurden noch bestehende adhärenente Zellen vom Boden der Schale abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei Raumtemperatur für drei Minuten mit 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in einer entsprechenden Menge Medium 200 resuspendiert. Danach wurden neue Schalen mit jeweils 10 ml Medium 200 vorbereitet und die Zellsuspension auf diese aufgeteilt. Die Zellkulturen wuchsen im Brutschrank bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit.

Um Zellen für spätere Zwecke noch nutzen zu können, wurde ein Teil von ihnen kryokonserviert. Dazu wurden sie wie beim Passagieren zunächst von ihrer Schale gelöst, um

anschließend in Medium 200 und 10% DMSO resuspendiert und in entsprechenden Kryoröhrchen aufgeteilt zu werden. Danach wurden sie zunächst für zwei Stunden bei -20°C und dann über Nacht bei -80°C im Gefrierschrank aufbewahrt. Am nächsten Tag konnten sie dann in flüssigen Stickstoff überführt und bis zum erneuten Gebrauch aufbewahrt werden.

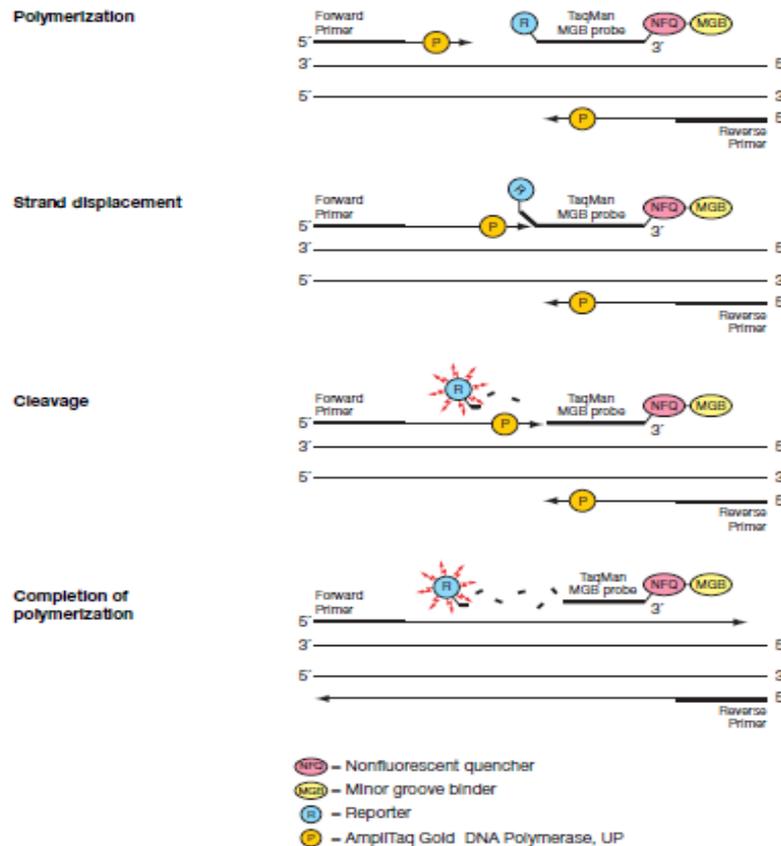
### **3.2.2. DNA-Isolation aus HUVEC und Blutgruppenbestimmung mittels TaqMan®**

Um die Blutgruppenantigene auf den HUVEC darstellen zu können, musste zuerst die Blutgruppe dieser Zellen ermittelt werden.

Zunächst wurde dafür die DNA aus den Zellen isoliert. Dafür nutzte ich ein Kit der Firma Zymo Research. Zunächst wurden die Zellen wie beim Passagieren von ihrem Untergrund gelöst. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert, wovon 10µl zur Ermittlung der Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer abgenommen wurden. Für die DNA-Isolation nutzte ich 500.000 Zellen. Dieses Zellpellet wurde nun mit 500µl *Genomic Lysis Puffer* versetzt. Durch vier bis sechs Sekunden langes Vortexen wurde es resuspendiert. Anschließend wurde es bei Raumtemperatur für fünf bis zehn Minuten belassen. Nun wurde ein neues 1ml Eppendorf-Gefäß mit einer *Zymo-Spin* Säule vorbereitet und das Pellet darin überführt. Nach Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 132.000 rpm für eine Minute wurde das Eppendorf-Gefäß verworfen und die *Zymo-Spin* Säule mit der enthaltenen DNA in ein neues Gefäß überführt und mit 200µl DNA Prä-Wasch-Puffer versetzt um dann erneut wie oben beschrieben zentrifugiert zu werden. Anschließend wurde 500µl g-DNA Wasch-Puffer zugefügt und erneut zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 50µl DNA Elutionspuffer versetzt. Nach einer Inkubationszeit von zwei bis fünf Minuten bei Raumtemperatur wurde abschließend noch einmal zentrifugiert, um die DNA zu lösen. Die DNA konnte nun entweder sofort genutzt oder zunächst bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt werden.

TaqMan® ist ein Verfahren, das zwei Methoden vereint, nämlich eine Polymerasekettenreaktion (PCR) und einen 5'-Nuclease-Assay. Dies ermöglichte nicht nur eine Amplifikation einer bestimmten Sequenz, sondern gleichzeitig auch den Nachweis dieses Produkts. Dabei wird das 5'-Exonukleasecharakteristikum der TaqMan®-Polymerase genutzt, indem eine DNA-Probe bei 90°C denaturiert wird, sodass ein Einzelstrang entsteht, der als Matrize verwendet werden kann. Dazugegeben werden dann zwei Sonden, die mit den Farbstoffen VIC und FAM am 5'-Ende und mit einem *Quencher* am 3'-Ende markiert waren sowie der *Primer*. *Quencher* sind dabei Moleküle, die Fluoreszenzsignale unterdrücken sollen. Sobald es zur Extension kommt, verdrängt die TaqMan®-Polymerase die komplementäre

Sonde und schneidet diese mit Hilfe ihrer 5'-Exonukleaseaktivität. Durch diese Sondenhydrolyse wird ein Sequenz-spezifisches Signal freigegeben, da nun der *Quencher* abgeschnitten wurde, was nur bei vorher hybridisierten Sonden der Fall ist. Dieses Signal ermöglichte nun die Zuordnung zum entsprechenden Genotyp (Abb. 4).



**Abb. 4** Schematisches Prinzip der Funktionsweise des TaqMan® zur Blutgruppenbestimmung (Applied Biosystems, 2010).

Als Kontrollen diente DNA von gesunden Blutspendern. Benötigt wurde eine 96-well Platte (*Micro Amp*) von Applied Biosystems. Pro *Well* wurden 1µl DNA, 0,25µl eines TaqMan®-Mix, welcher die Sonden und *Primer* enthält, 2,5µl TaqMan® Puffer (*TaqMan Genotyping Master Mix*) von Applied Biosystems, sowie 1,25µl DNase und RNase freies Wasser angesetzt. Es wurde ein Dreifach-Ansatz verwendet, d.h. einmal für Blutgruppe 0, für Blutgruppe B und für Blutgruppe A. Nach dem Bestücken der Platte wurde diese mit Hilfe von Klebefolie luftdicht verschlossen und kurz zentrifugiert. Dann wurde die Platte mit Hilfe eines PCR Systems von Applied Biosystems für 10 Minuten bei 95°C, danach 45mal für 15 Sekunden bei 95°C und abschließend bei 60°C für eine Minute bearbeitet. Anschließend konnte die Auswertung mit der 7500System SDS Software erfolgen.

Hauptsächlich nutzte ich HUVEC der Blutgruppe A<sub>1</sub>O.

### **3.2.3. Qualitative Bestimmung der Blutgruppenantigene und der Glycosyltransferaseaktivität auf HUVEC nach Inkubation in blutgruppenfremden und -eigenem Serum über einen Zeitraum von 14 Tagen**

Um das Phänomen der Akkommodation zu untersuchen, wurden die HUVEC über einen Zeitraum von 14 Tagen untersucht. Dazu musste zunächst eine entsprechende Anzahl von humanen venösen Endothelzellen einer Zelllinie gezüchtet werden. Wie bereits erwähnt habe ich mit HUVEC der Blutgruppe A<sub>1</sub>O gearbeitet. Sobald die Zellen eine Konfluenz von etwa 80% erreicht hatten, konnte der Versuch beginnen. Dabei wurden je zwei Schalen mit Medium 200 und humanem Serum der Blutgruppe A versetzt, weitere zwei Schalen mit humanem Serum der Blutgruppe B und weitere zwei mit humanem Serum der Blutgruppe O. Eine weitere Schale wurde gleich am Tag null untersucht, um einen Ausgangs- bzw. Vergleichswert zur Verfügung zu haben. Die nächste Untersuchung je einer Schale, die inkubiert wurde mit humanem Serum der Blutgruppe A, B und O, erfolgte am Tag sieben und die letzte Untersuchung der übrig gebliebenen Schalen am Tag 14. Während des Beobachtungszeitraums wurden die Zellen noch zusätzlich lichtmikroskopisch fotografiert. Es wurde ein täglicher Mediumwechsel vorgenommen. Die Untersuchungen gestalteten sich so, dass ein Teil der Zellen lysiert wurde, um die Glycosyltransferaseaktivität mittels ELISA messen zu können und die übrigen Zellen wurden für die Immunfluoreszenz-Mikroskopie auf *chamber slides* eingesät.

### **3.2.4. Immunfluoreszenz der Blutgruppenantigene der HUVEC**

Wie bereits erwähnt, wurden vordergründig Zellen der Blutgruppe A<sub>1</sub>O genutzt. Dementsprechend konzentrierte ich mich auf die Darstellung der Blutgruppe-A-Antigene auf der Oberfläche der HUVEC. Genutzt wurde dafür ein entsprechender A-Blutgruppenantigen-Antikörper der Firma GeneTex. Aber es wurde auch ein B-Blutgruppenantigen-Antikörper derselben Firma genutzt, um eine eventuelle Veränderung des A-Blutgruppenantigens zum B-Blutgruppenantigen zu detektieren.

Zunächst wurden die Zellen wie oben beschrieben von ihren Schalen gelöst und auf *chamber slides* überführt. Dabei wurden je zwei Felder für die Testung der A-Blutgruppenantigene, der B-Blutgruppenantigene und zwei Felder als Kontrollen verwendet. Nach dem Einsäen, wurden die *chamber slides* im Brutschrank bei 37°C, mit 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit über Nacht aufbewahrt. Am nächsten Tag konnte dann das Anwachsen der HUVEC auf den *chamber slides* lichtmikroskopisch kontrolliert werden.

Nun konnte die eigentliche Färbung beginnen, indem zuerst das Medium entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen wurden. Jetzt konnten die Zellen mit 4% Paraformaldehyd bei 4°C für 10 Minuten fixiert werden. Nach anschließendem dreimaligen Waschen mit PBS für je drei Minuten wurde mit 10% Ziege-Normalserum in 1% BSA/PBS über Nacht bei 4°C geblockt.

Nun konnten die Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:100 in 10% Ziege-Normalserum in 1% BSA/PBS hinzugefügt werden. Dabei wurde der A-Blutgruppenantigen-Antikörper für die ersten beiden Felder und der B-Blutgruppenantigen-Antikörper für die folgenden zwei Felder genutzt. Für die Kontrolle wurde noch einmal die Block-Lösung genutzt. Es wurde wieder über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag konnte nach Entfernung der Primärantikörper und dreimaligem Waschen mit PBS, der FITC-markierte Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:200 in 1:10000 verdünntem DAPI (in PBS) hinzugefügt werden. Die Proben inkubierten für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach erneutem dreimaligem Waschen in PBS wurden die Proben in *Fluorescent Mounting Medium* der Firma Dako eingedeckt und konnten nun mit einem Immunfluoreszenz-Mikroskop der Firma Olympus mikroskopiert werden.

### **3.2.5. Immunfluoreszenz der Blutgruppenantigene von Erythrozyten**

Um die Funktionalität der Blutgruppenantigen-Antikörper zu testen, wurden Erythrozyten bekannter Blutgruppen genutzt. Diese wurden aus den oben bereits erwähnten Seren gesunder Blutspender gewonnen. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand als Serum abgenommen und am Boden des Falcon-Röhrchens blieben die Erythrozyten in Form eines Sediments übrig. Diese wurden 1:1 mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt. 10µl davon wurden auf einem Objektträger ausgestrichen und trocknen gelassen. Anschließend wurde die Immunfluoreszenzfärbung inklusive Fixierung wie oben bei den HUVEC beschrieben durchgeführt.

### **3.2.6. Lyse der HUVEC und Blutgruppen-Glycosyltransferase-Aktivitäts-ELISA**

Um eine quantitative Aussage über die Blutgruppenantigene treffen zu können, untersuchte ich die Aktivität des Enzyms, welches für die Synthese der Blutgruppenantigene zuständig ist. Blutgruppenantigene sind Kohlenhydratstrukturen, die man an der Oberfläche der HUVEC findet. Ausgangssubstanz ist dabei das H-Blutgruppenantigen, bestehend aus N-Acetylglucosamin, D-Galactose und L-Fucose. Dies ist das Antigen der Blutgruppe 0. Durch Einwirken der N-Acetylgalactosaminyltransferase wird ein weiteres Kohlenhydratmolekül, nämlich das N-Acetylgalactosamin an das H-Grundgerüst angeknüpft und es entsteht das

Blutgruppe A-Antigen. Die Aktivität dieses Enzyms nutzte ich für die Experimente, denn würde die Aktivität dieses Enzyms abnehmen, so würde auch weniger A-Blutgruppenantigen produziert und an der Oberfläche der HUVEC exprimiert werden. So konnten wir also indirekt die Veränderung der Blutgruppenantigene nachweisen.

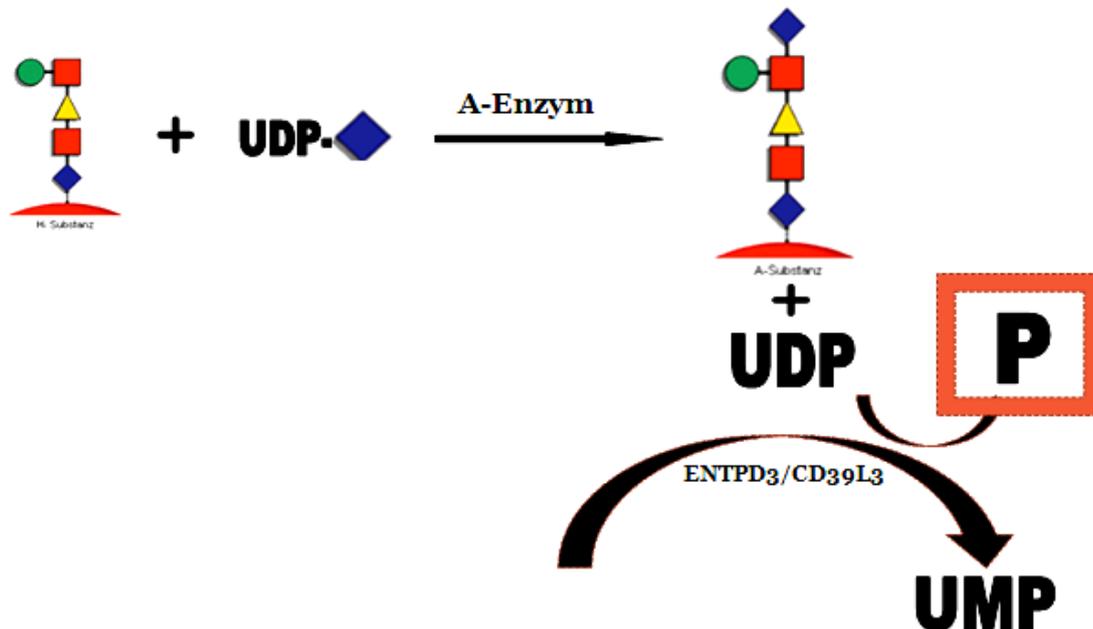
Zunächst musste aber ein Lysat der HUVEC hergestellt werden, um eine Probe zu gewinnen, die dieses Enzym enthielt.

Für die Herstellung des dafür benötigten *Lysis-Puffers* wurde zunächst eine Stocklösung hergestellt, bestehend aus 1M HEPES (pH 7,5), 5M Natriumchlorid, 10% Triton X-100, 50% Glycerin und 0,5M EDTA (pH 8,0). So erhielt man einen 2fachen *Lysis-Puffer*, der dann durch Hinzufügen von 1M Natriumfluorid, 0,1M PMSF, 1mg/ml Aprotinin und 1mg/ml Leupeptin kurz vor der Anwendung vervollständigt wurde und mit destilliertem Wasser auf einen 0,5fachen *Lysis-Puffer* verdünnt wurde. Dieser wurde möglichst arm an Phosphat gehalten, um Interferenzen mit dem nachfolgenden ELISA möglichst gering zu halten.

Die HUVEC wurden zunächst von ihren Schalen gelöst, wie oben beim Passagieren bereits beschrieben und anschließend gezählt. 1,5 Millionen Zellen wurden dann zunächst mit PBS gewaschen und mit 400µl des 0,5fachen Lysis-Puffers versetzt und unter mehrfachem Resuspendieren für 10 Minuten auf Eis belassen. Anschließend wurden die Proben bei 4°C mit 130000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand enthielt das Zelllysat und wurde bei -80°C aufbewahrt.

Nun konnte der Aktivitäts-ELISA erfolgen. In diesem ELISA reagieren die Ausgangssubstanzen, nämlich das H-Blutgruppenantigen und das für die entsprechende Blutgruppe notwendige anzuknüpfende Kohlenhydrat miteinander unter der Einwirkung des im Zelllysat enthaltenen Blutgruppenenzym, der Glycosyltransferase. Da ich mit HUVEC der Blutgruppe A gearbeitet habe, handelte es sich bei dem Kohlenhydrat um das N-Acetylgalactosamin und beim Enzym um die N-Acetylgalactosaminyltransferase. Darunter kam es zur Bildung des A-Blutgruppenantigens. Ein wichtiger Bestandteil ist, dass das Kohlenhydrat an ein Nucleosiddiphosphat gebunden war. Dies wurde nämlich unter der Bildung des Blutgruppenantigens abgespalten und durch eine spezielle Nucleotidase, die ENTPD3/CD93L3, gespalten in eine Nucleosidmonophosphat und Phosphat. Die Menge des gebildeten Phosphats korreliert dabei direkt mit der Menge des gebildeten A-Blutgruppenantigens und lässt daher Rückschlüsse auf die Aktivität des Blutgruppenenzym zu. Das Phosphat wurde dabei mit Hilfe von Farbstoffen nachgewiesen und photometrisch gemessen (Abb. 5). Für diese Versuche wurde als Grundlage ein ELISA-Kit der Firma R&D

Systems zum Nachweis der Blutgruppen-Glycosyltransferase-Aktivität genutzt. Es wurde dann von uns speziell für den Nachweis der N-Actelygalactosaminyltransferase modifiziert.



**Abb. 5** Prinzip des Glycosyltransferase-Aktivität-ELISA der Firma R&D Systems, modifiziert zum Nachweis der Blutgruppe A-Transferase. ENTPD3/CD39L3 = Nukleotidase.

Benötigt wurde eine 96-well-Platte (*Flat bottom*). Pro well wurden 10µl 1mM H-Disachharid, 10µl 3mM UDP-N-Acteylgalactosamin und 5µl der *Coupling-Phosphatase 1* verwendet. Alle Reagenzien wurden vorher entsprechend ihrer Konzentration in 1fach *Assay-Puffer*, bestehend aus Phosphatase Puffer 1, Manganchlorid und destilliertem Wasser, verdünnt. Es wurde dabei für jede zu untersuchende Probe ein 5fach-Ansatz angefertigt. Nachdem nun die Substrate vorbereitet waren, konnte die Probe in Form des Zelllysats hinzugefügt werden. Dieses wurde 1:1 mit dem 1fach *Assay-Puffer* gemischt, sodass nun 25 µl pro well pipettiert werden konnten. Als Negativkontrolle wurde anstelle des Zelllysates 25 µl des *Assay-Puffers* hinzugefügt. Als weitere Kontrollen diente ein 3fach Ansatz, der pro well 50µl des *Assay-Puffers* enthielt und eine weitere, die ebenso als 3fach Ansatz eine 1:1 Mischung des *Assay-Puffers* mit dem *Lysis-Puffer* enthielt. Eine weitere Kontrolle stellte ein Zelllysate aus HUVEC der Blutgruppe 0 dar. Hier wurde wiederum ein 5fach Ansatz angelegt. Darüber hinaus gab es noch eine Kontrolle der *Coupling Phosphatase 1*, bestehend aus 20µl *Assay-Puffer*, 5µl der *Coupling-Phosphatase 1* und 25µl 0,1mM UDP pro well.

Nun konnte der Ansatz für die Phosphatstandardkurve pipettiert werden. Zunächst wurden 40µl 1mM Phosphat Standard mit 360µl 1fach *Assay-Puffer* gemischt. Nun konnte eine Verdünnungsreihe erstellt werden, indem 200µl der Mischung mit 200µl 1fach *Assay-Puffer*

gemischt wurden. Dies wurde weitere dreimal fortgeführt. Die letzten *wells* enthielten dann nur den 1fach *Assay-Puffer* als Nullstandard. Von diesen Gemischen wurden je 50µl pro *well* benötigt.

Nachdem nun der Ansatz pipettiert war, konnte die Inkubationszeit bei 37°C für 2,5 Stunden beginnen, wofür die Platte versiegelt wurde.

Anschließend sollte das gebildete A-Blutgruppenantigen mittels der Farbreaktion des Phosphats photometrisch nachgewiesen werden. Dafür wurde pro *well* 30µl *Malachite Green Reagent A* hinzugefügt und die Platte leicht beklopft um alles zu mischen. Es folgten 100µl destilliertes Wasser pro *well* und anschließend 30 µl *Malachite Green Reagent B* pro *well*. Auch hier wurde die Platte im Anschluss wieder vorsichtig beklopft. Makroskopisch zeigte sich nun eine Grünfärbung der *wells* in unterschiedlichen Farbnuancen (Wellenlängen) entsprechend dem Vorhandensein des A-Blutgruppenantigens. Die Platte wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur belassen um eine Stabilisierung der Farbentwicklung zu bewirken. Danach konnte die photometrische Messung der Proben bei 620nm erfolgen.

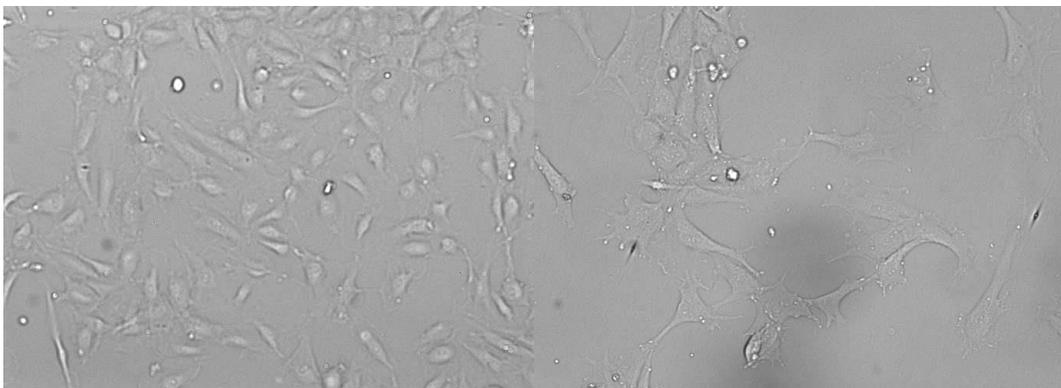
## 4 Ergebnisse

---

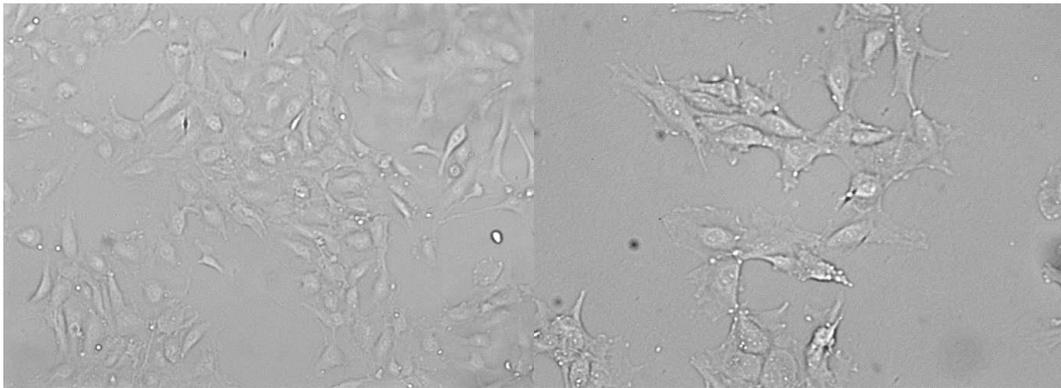
Zur Untersuchung des Phänomens der Akkommodation wurden als Zellmodell humane venöse Nabelschnurendothelzellen ausgewählt. Bei diesen wurde die Blutgruppe bestimmt, indem zunächst deren DNA isoliert wurde und anschließend die Blutgruppe mittels eines TaqMan® ermittelt wurde. Wir untersuchten HUVEC der Blutgruppe A<sub>1</sub>O. Diese wurden für 14 Tage in humanem Serum der Blutgruppe A, B und 0 inkubiert. Nach null, sieben und 14 Tagen erfolgte die Untersuchung der Expression und Aktivität der Blutgruppenantigene bzw. der -Glycosyltransferasen mittels Immunfluoreszenz und ELISA. Auf den nachfolgenden Seiten sind die Ergebnisse dieser Versuche näher dargestellt.

### 4.1. Vorversuche zur Inkubation der HUVEC in humanem Serum

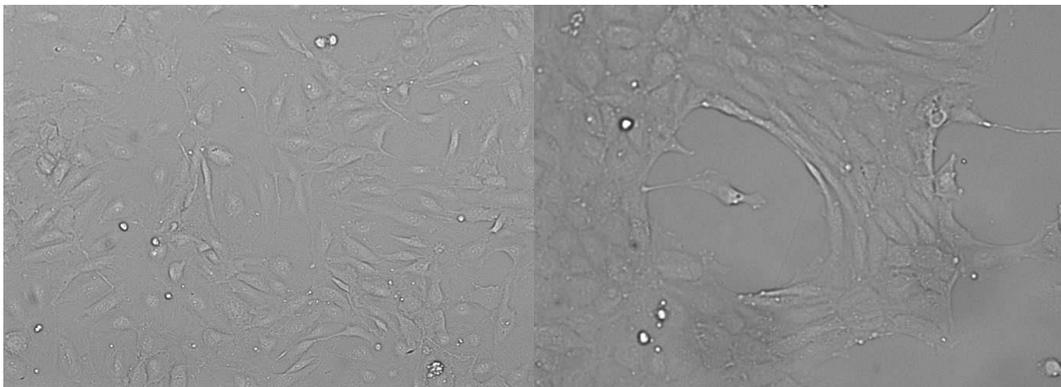
Da die HUVEC in humanem Serum inkubiert werden sollten, musste zunächst getestet werden, ob und in welcher Konzentration dies möglich ist. Das normalerweise zur Anzucht der HUVEC verwendete Medium enthielt 2% FBS. Um die Verträglichkeit des humanen Serums an den HUVEC der Blutgruppe A zu testen, wurde eine Vergleichsschale mit dem Zusatz von 2% FBS, eine Probeschale mit 2% humanem Serum der Blutgruppe A und eine weitere mit 1% FBS und 1% humanem Serum der Blutgruppe A über 14 Tage versetzt, beobachtet und fotografisch dokumentiert. Zwischen den drei Gruppen war kein wesentlicher Unterschied in Wachstum und Konfluenz sichtbar. Morphologisch waren die in humanem Serum kultivierten Zellen etwas größer und ließen sich schneller vom Boden der Zellkulturflaschen lösen als die, die in FBS kultiviert wurden. Nach den 14 Tagen ergaben sich größere Lücken, d.h. es sind mehr Zellen gestorben, als nachgewachsen. Dies war aber in allen drei Gruppen zu beobachten (Abb. 6A, 6B und 6C).



**Abb. 6A** HUVEC nach Zusatz von 2% FBS zum Medium an Tag null (links, Vergrößerung 100fach) und Tag 14 (rechts, Vergrößerung 200fach).



**Abb. 6B** HUVEC nach Zusatz von 2% humanem Serum der Blutgruppe A zum Medium an Tag null (links, Vergrößerung 100fach) und Tag 14 (rechts, Vergrößerung 200fach).

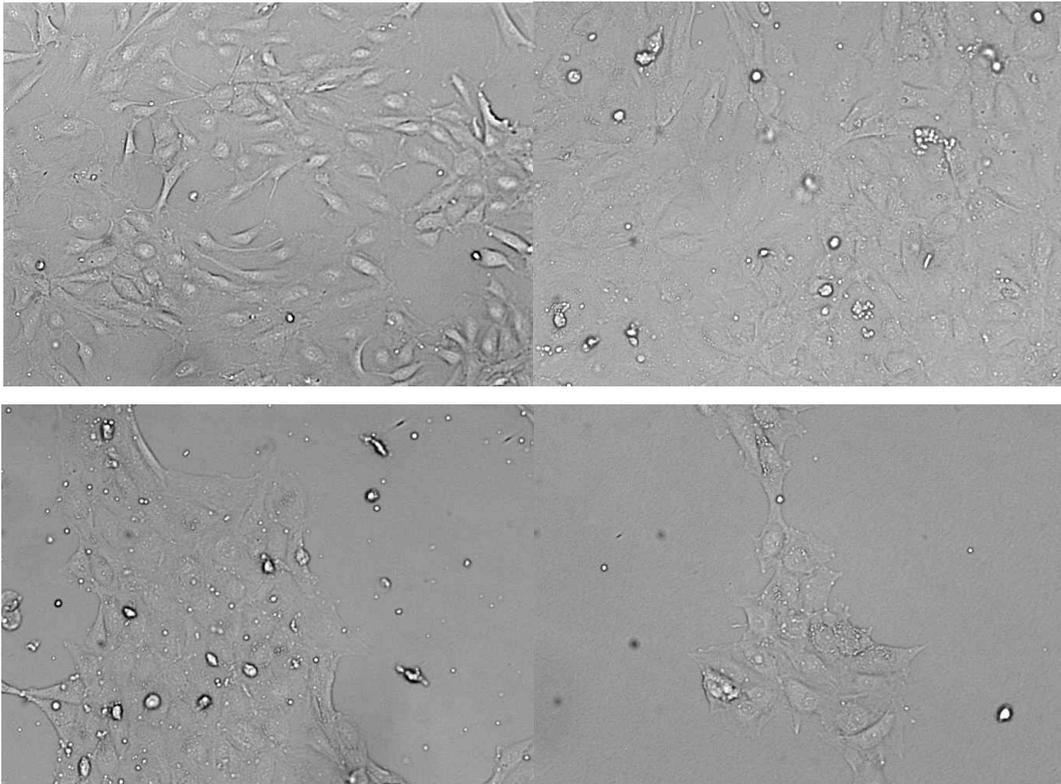


**Abb. 6C** HUVEC nach Zusatz von 1% FBS und 1% humanem Serum der Blutgruppe A zum Medium an Tag null (links, Vergrößerung 100fach) und Tag 14 (rechts, Vergrößerung 200fach).

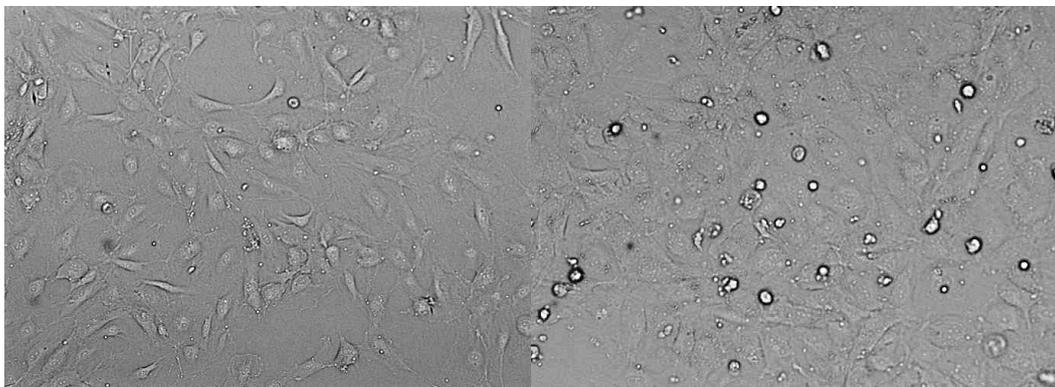
#### **4.2. Qualitative Bestimmung der Blutgruppenantigene und -Glycosyltransferaseaktivität auf HUVEC nach Inkubation in blutgruppenfremden und -eigenem Serum über einen Zeitraum von 14 Tagen**

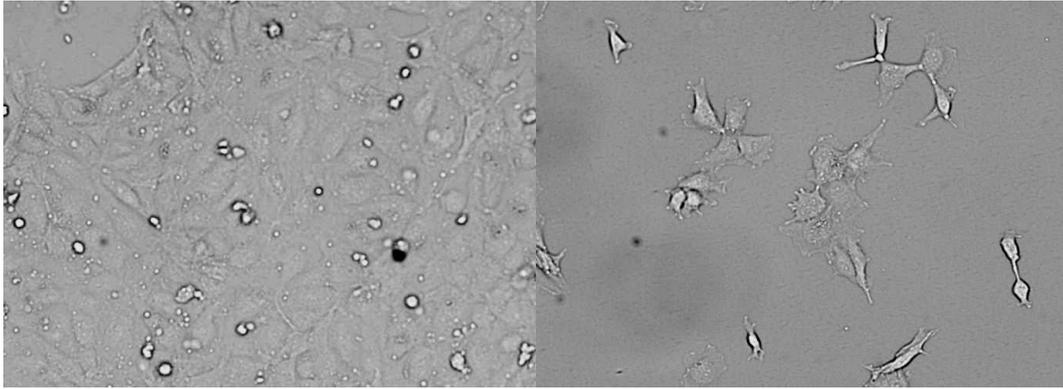
Das Phänomen der Akkommodation sollte untersucht werden. Dafür wurden modellhaft humane venöse Endothelzellen der Blutgruppe A<sub>1</sub>0 genutzt. Insgesamt wurden drei Zelllinien HUVEC der Blutgruppe A<sub>1</sub>0 zu unterschiedlichen Zeitpunkten über jeweils 14 Tage untersucht und die bereits genannten Versuche durchgeführt. Diese wuchsen bis zu einer Konfluenz von 80 % und wurden dann in Gruppen aufgeteilt und in humanem Serum der Blutgruppe A, B und 0 für 14 Tage belassen. Dabei erfolgte ein täglicher Mediumwechsel. An Tag null wurde eine Schale HUVEC lysiert. Diese dienten als Referenzgruppe. An Tag sieben und 14 wurde wiederum je eine Schale HUVEC, die jeweils in humanem Serum der Blutgruppe A, B und 0 inkubiert wurden, lysiert. Auf einer Schale wuchsen etwa 2 bis 2,5

Millionen Zellen. 1,5 Millionen davon wurden lysiert und für den ELISA genutzt und die restlichen Zellen für die Immunfluoreszenzfärbung genutzt. Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz und des ELISA sind nachfolgend aufgeführt. Desweiteren wurden die Schalen alle zwei Tage fotografiert um die Konfluenz zu kontrollieren. Von Tag eins bis etwa Tag neun blieb die Konfluenz von etwa 80% bei allen Gruppen und allen drei Zelllinien nahezu konstant. Ab Tag neun bis Tag 14 nahm die Konfluenz etwas ab. Am Ende blieben trotzdem noch etwa 2 bis 2,5 Millionen HUVEC pro Schale übrig (Abb.7A, 7B und 7C).

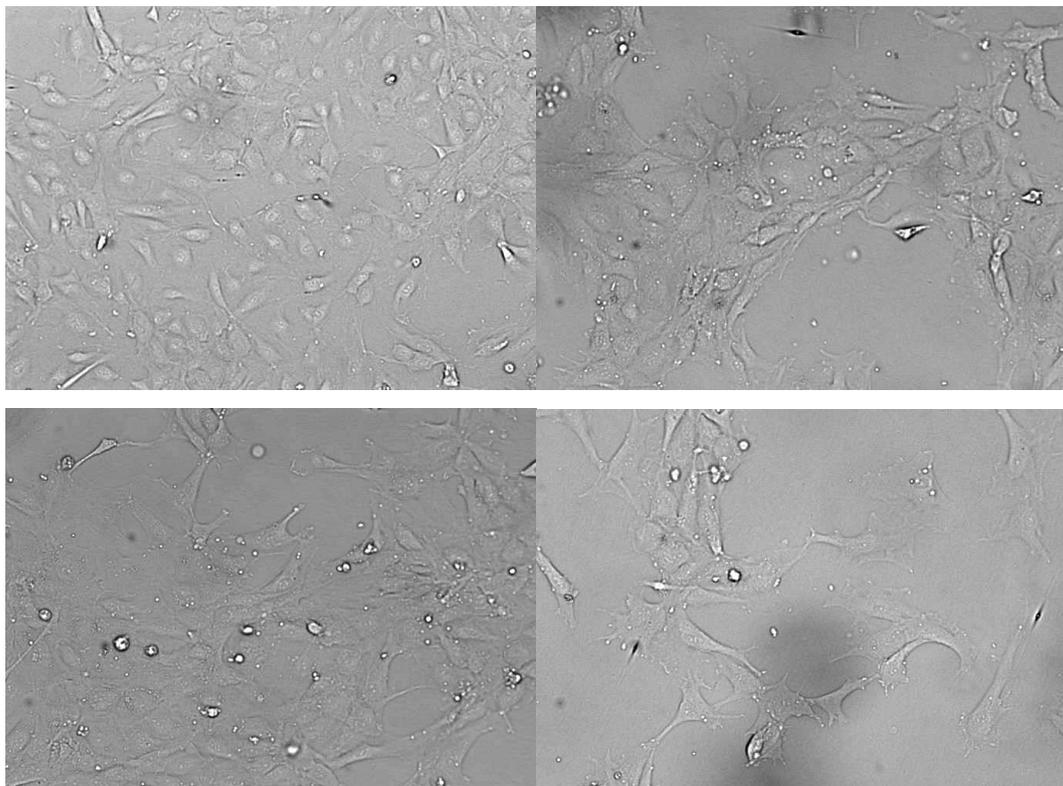


**Abb. 7A** Lichtmikroskopische Aufnahme der HUVEC, inkubiert in humanem Serum der Blutgruppe A an Tag null, sieben, neun und 14 (Vergrößerung 100fach).





**Abb. 7B** Lichtmikroskopische Aufnahme der HUVEC, inkubiert in humanem Serum der Blutgruppe B an Tag null, sieben, neun und 14 (Vergrößerung 100fach).



**Abb. 7C** Lichtmikroskopische Aufnahme der HUVEC, inkubiert in humanem Serum der Blutgruppe 0 an Tag null, sieben, neun und 14 (Vergrößerung 100fach).

#### **4.3. Immunfluoreszenz der HUVEC und der Erythrozyten**

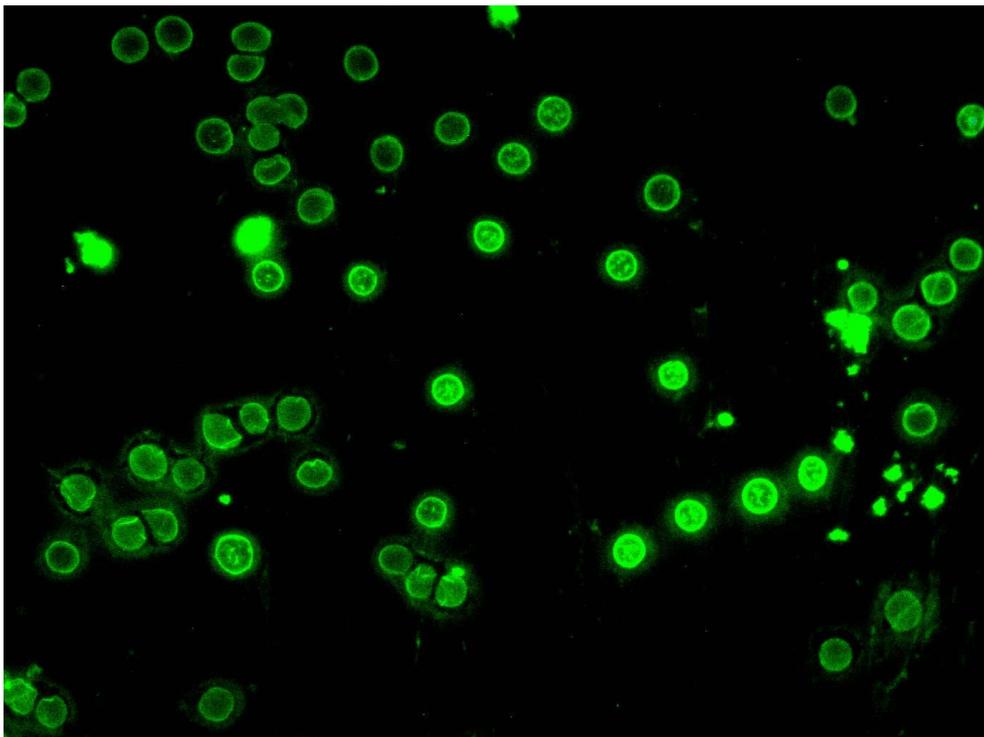
Die Blutgruppenantigene wurden mit Hilfe der Immunfluoreszenz dargestellt. Dabei wurden Antikörper gegen Blutgruppenantigen A und B verwendet. Der Blutgruppenantigen B-Antikörper wurde eingesetzt um eine eventuelle Veränderung des A-Blutgruppenantigen zum B-Blutgruppenantigen zu erfassen wie es beispielsweise beim Phänomen des „acquired B“ beschrieben wurde und auch hier theoretisch möglich wäre. Untersucht wurden Erythrozyten der Blutgruppe A und B und HUVEC der Blutgruppe A. Die Erythrozyten dienten einerseits

als Vergleichsobjekte der Stärke des Signals des A-Blutgruppenantigens auf den HUVEC zu den Erythrozyten und andererseits um die Funktionalität der Blutgruppenantigen-Antikörper zu überprüfen.

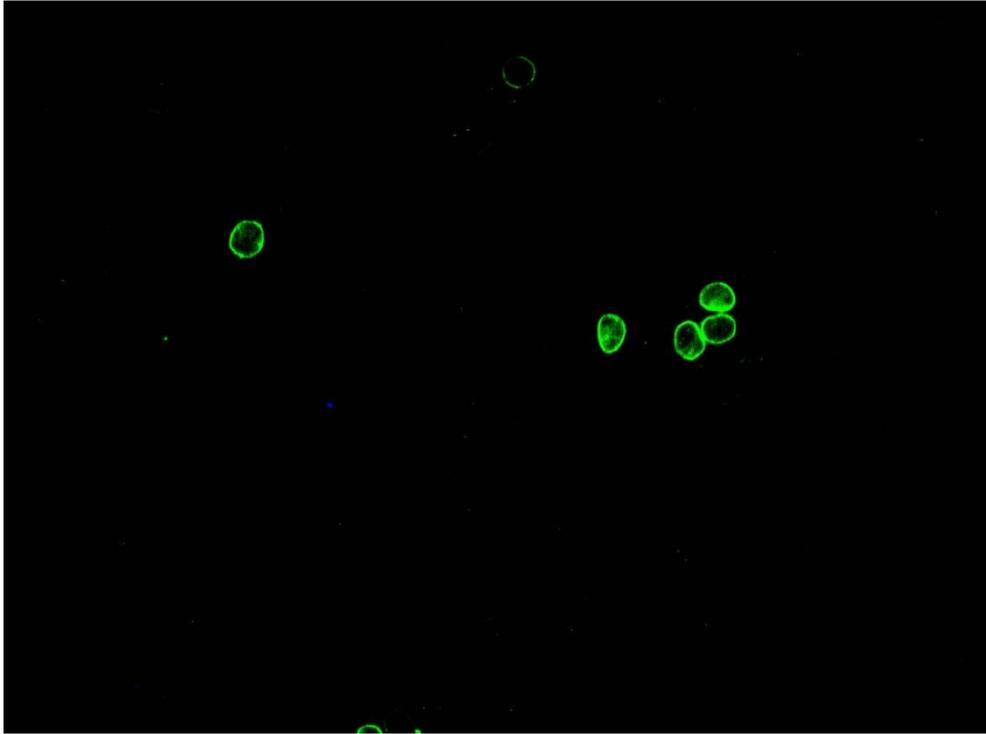
#### 4.3.1. Immunfluoreszenz der Erythrozyten

Die Erythrozyten wurden aus Vollblut gewonnen und auf Objektträgern ausgestrichen und konnten nun analog der Immunfluoreszenz-Färbung der HUVEC gefärbt werden. Als Negativkontrolle dienten Erythrozyten der Blutgruppe 0, die sowohl beim A-Blutgruppenantigen-Antikörper, als auch beim B-Blutgruppenantigen-Antikörper kein Signal zeigten. Als Sekundärantikörper wurde ein FITC-konjugierter Ziege-anti-Maus-Antikörper der Klasse IgM verwendet. Da die Erythrozyten kernlos sind, konnte auf eine Färbung des Kerns mittels DAPI verzichtet werden.

Die Erythrozyten der Blutgruppe A und B zeigten dabei eine regelmäßige Anfärbung der Zelloberfläche und damit die Expression der Blutgruppenantigene A bzw. B (Abb. 8A und 8B).



**Abb. 8A** Immunfluoreszenzfärbung der Erythrozyten Blutgruppe A mittels A-Blutgruppenantigen-Antikörper und FITC-markiertem Sekundärantikörper (Vergrößerung 400fach).



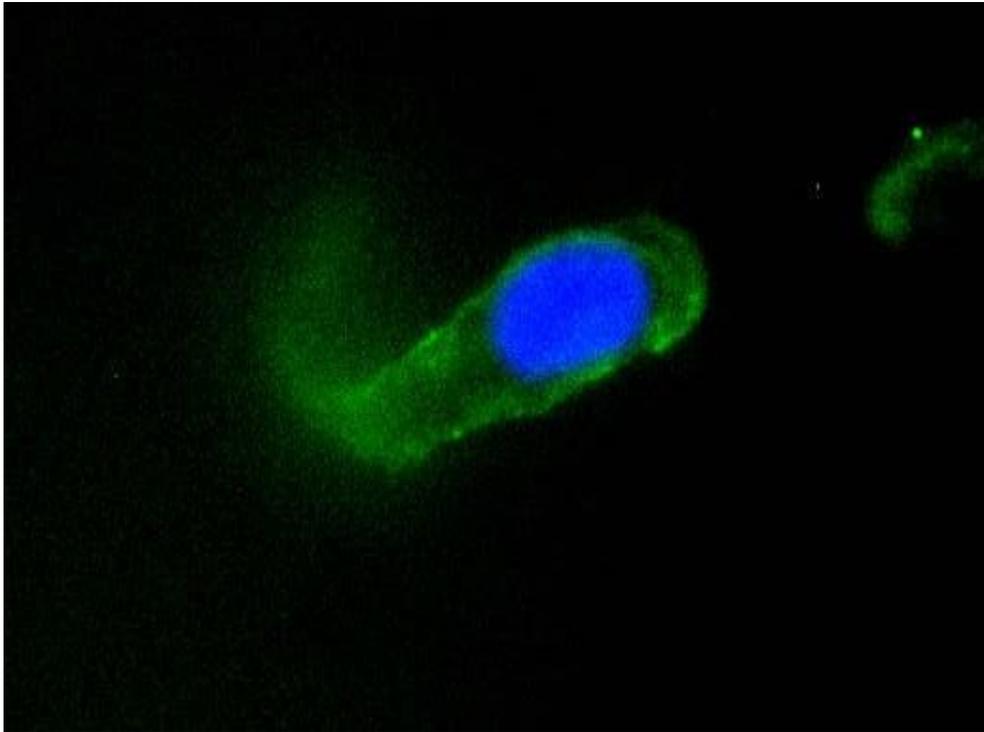
**Abb. 8B** Immunfluoreszenzfärbung der Erythrozyten Blutgruppe B mittels B-Blutgruppenantigen-Antikörper und FITC-markiertem Sekundärantikörper (Vergrößerung 400fach).

#### 4.3.2. Immunfluoreszenz der HUVEC

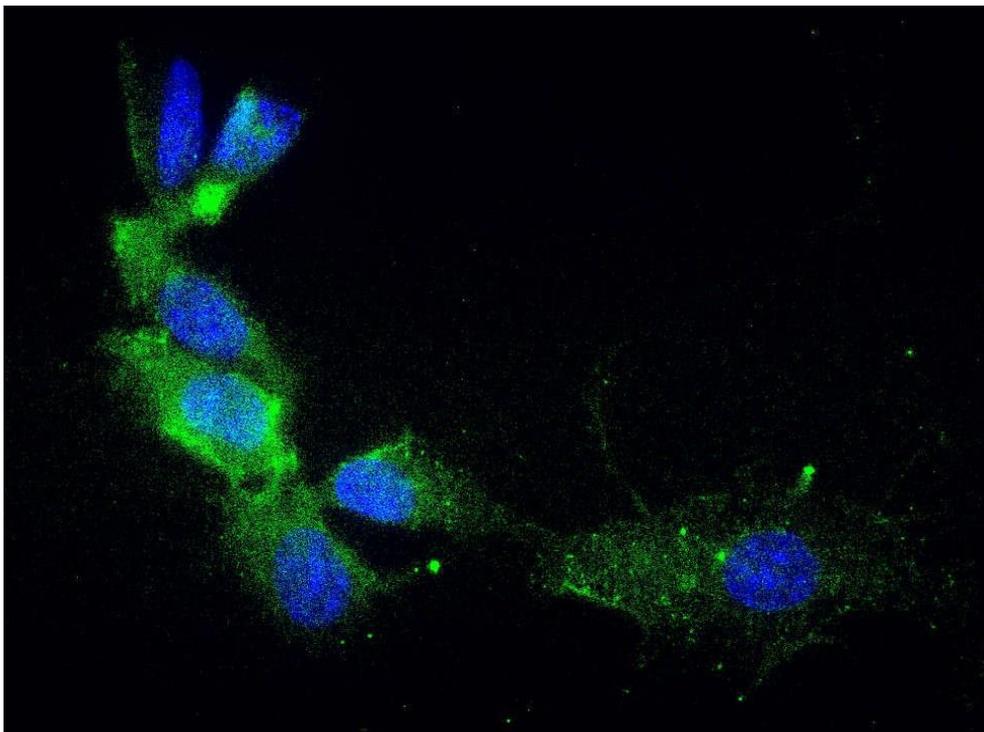
Nachdem die Blutgruppe der HUVEC festgestellt wurde, konnte das Vorhandensein der entsprechenden Blutgruppenantigene auf der Zelloberfläche untersucht werden. Da Zellen der Blutgruppe A<sub>1</sub>O verwendet wurden, sollte das A-Blutgruppenantigen dargestellt werden. Besonders wichtig war dieser Versuch für die Untersuchung der HUVEC über 14 Tage nach Inkubation in blutgruppenfremdem humanem Serum bezüglich des Vorhandenseins bzw. der Veränderung der entsprechenden Blutgruppenantigene.

Zunächst wurden die HUVEC der Blutgruppe A mit einem A-Blutgruppenantigen-Antikörper untersucht. Als Negativkontrollen dienten einerseits die Färbung von HUVEC der Blutgruppe 0 und andererseits die Färbung ohne Verwendung des A-Blutgruppenantigen-Antikörpers, jedoch unter Verwendung des FITC-markierten Sekundärantikörpers. Ebenfalls wurde die Reaktion der HUVEC mit dem B-Blutgruppenantigen-Antikörper untersucht. Die Reaktion der Blutgruppenantigene der HUVEC mit dem A-Blutgruppenantigen-Antikörper zeigte sich kräftig vergleichbar mit denen der Erythrozyten der Blutgruppe A. Unter Verwendung des B-Blutgruppenantigen-Antikörpers zeigte sich keine Reaktion, sodass lediglich die mit DAPI

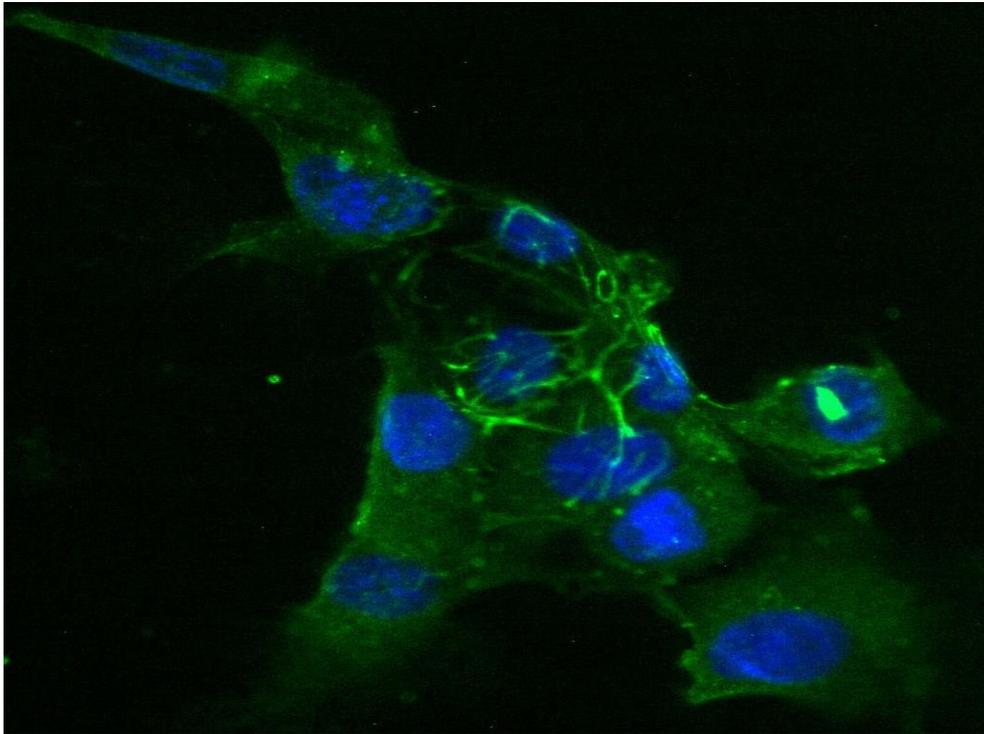
gefärbten Kerne abgebildet wurden. Ebenso war bei der Negativkontrolle kein FITC-Signal erkennbar (Abb. 9A-E).



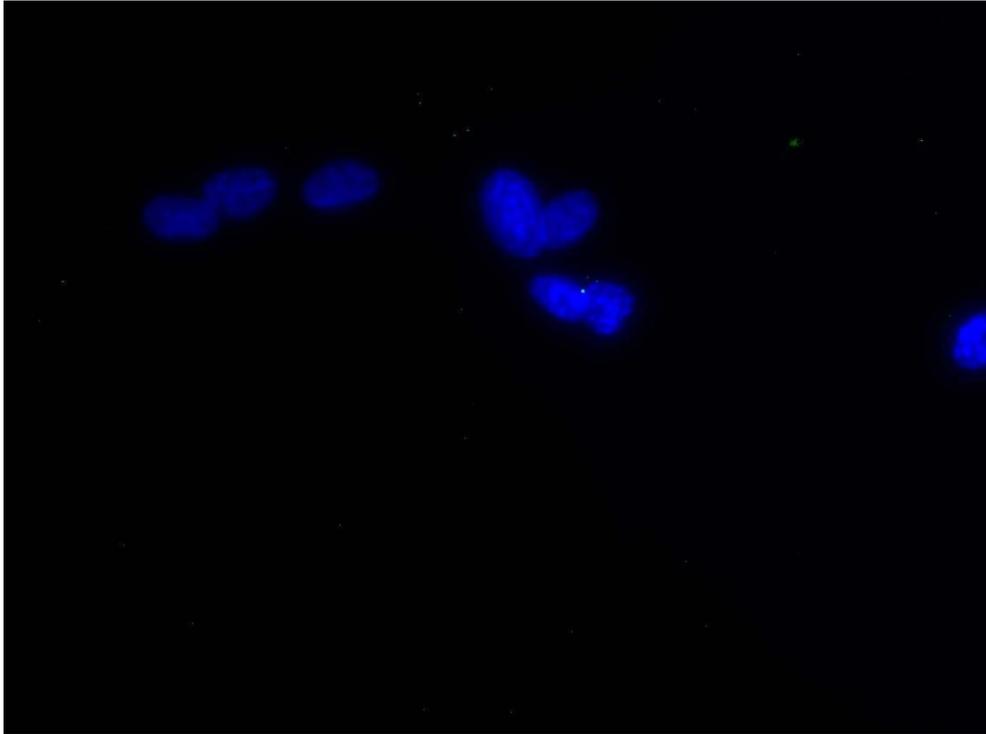
**Abb. 9A** Immunfluoreszenzfärbung HUVEC Passage sieben der Blutgruppe A mit A-Blutgruppenantigen-Antikörper, FITC-markiertem Sekundärantikörper und Kernfärbung mit DAPI (Vergrößerung 400fach).



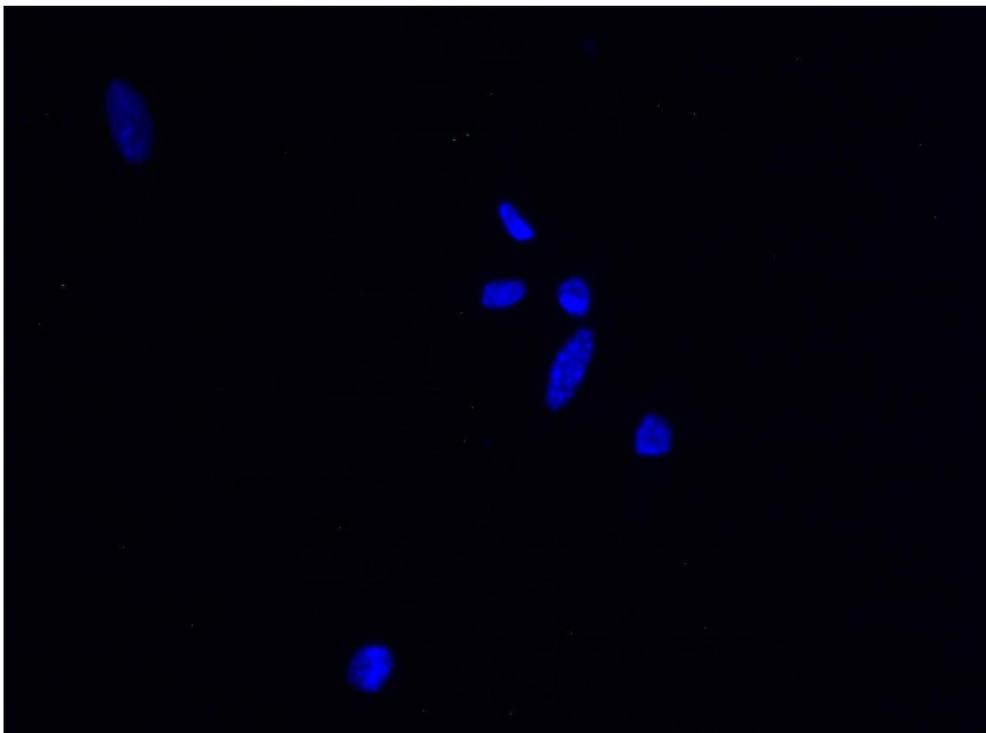
**Abb. 9B** Immunfluoreszenzfärbung HUVEC Passage neun der Blutgruppe A mit A-Blutgruppenantigen-Antikörper, FITC-markiertem Sekundärantikörper und Kernfärbung mit DAPI (Vergrößerung 400fach).



**Abb. 9C** Immunfluoreszenzfärbung HUVEC Passage 11 der Blutgruppe A mit A-Blutgruppenantigen-Antikörper, FITC-markiertem Sekundärantikörper und Kernfärbung mit DAPI (Vergrößerung 400fach).



**Abb. 9D** Immunfluoreszenzfärbung HUVEC Passage 11 der Blutgruppe A mit B-Blutgruppenantigen-Antikörper, FITC-markiertem Sekundärantikörper und Kernfärbung mit DAPI (Vergrößerung 400fach).



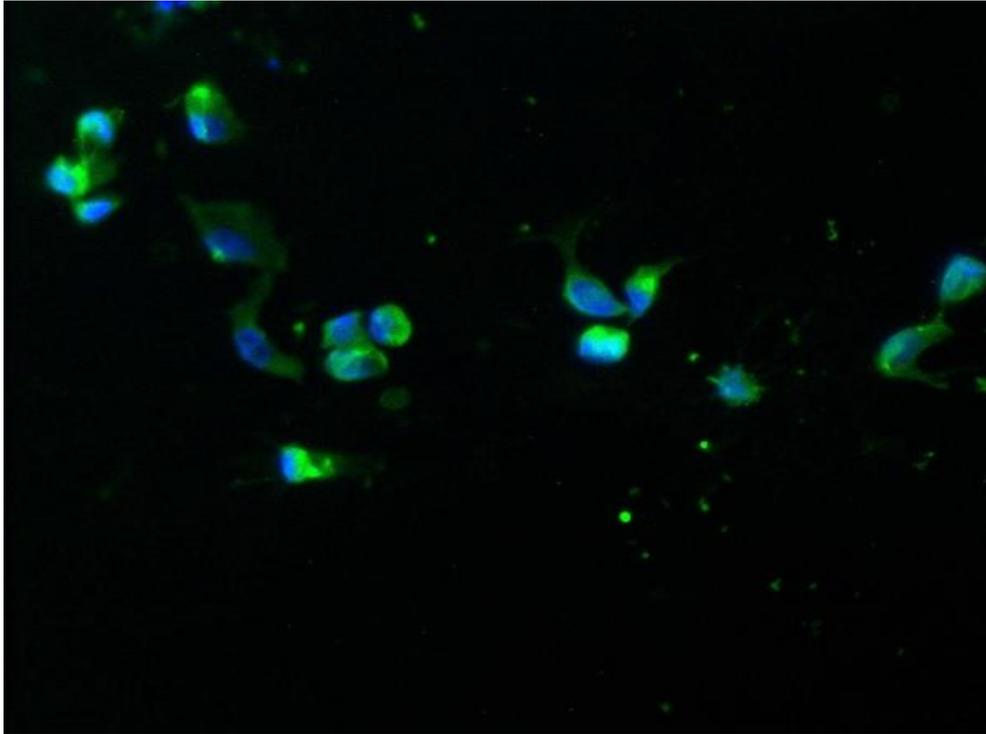
**Abb. 9E** Immunfluoreszenzfärbung Negativkontrolle HUVEC Passage acht der Blutgruppe A mit FITC-markiertem Sekundärantikörper und DAPI ohne Blutgruppenantigen-Antikörper (Vergrößerung 200fach).

#### **4.3.3. Immunfluoreszenz der HUVEC nach Inkubation in blutgruppenfremden und -eigenem Serum über einen Zeitraum von 14 Tagen**

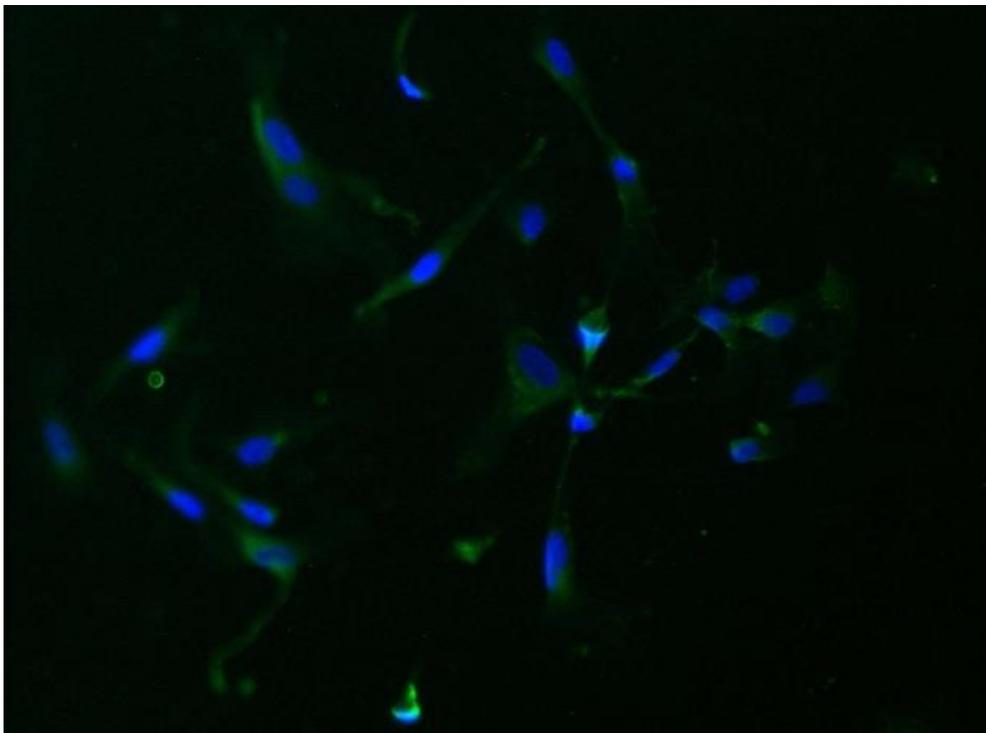
Wie bereits erwähnt, wurden die HUVEC der Blutgruppe A<sub>1</sub>O über 14 Tage auch mit Hilfe der Immunfluoreszenz auf das Vorhandensein bzw. Veränderungen der A-Blutgruppenantigene auf der Zelloberfläche untersucht. Für alle drei Zelllinien ergaben sich ähnliche Bilder, sodass hier nur beispielhaft die Bilder einer der drei Zelllinien dargestellt wurden.

An Tag 0 zeigt sich ein kräftiges Signal der A-Blutgruppenantigene auf der Zelloberfläche nach Färbung mit einem A-Blutgruppenantigen-Antikörper und einem FITC-konjugierten Ziege-anti-Maus-Antikörper. Die Zellkerne wurden jeweils mit DAPI sichtbar gemacht. An Tag sieben und 14 konnten die A-Blutgruppenantigene ebenfalls angefärbt werden, zeigten jedoch ein etwas schwächeres Signal. Damit ergab sich ein Vorhandensein des A-Blutgruppenantigens auf der Oberfläche der HUVEC über den gesamten Zeitraum der 14 Tage. Das Signal wurde zwar etwas schwächer, aber ein bedeutender Unterschied gegenüber Tag null konnte nicht festgestellt werden (Abb. 10A, 10B und 10E). Als Negativkontrolle wurden die HUVEC ohne den A-Blutgruppenantigen-Antikörper mit DAPI und dem FITC-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Dabei ergab sich kein Signal an der Zelloberfläche, sodass lediglich die mit DAPI gefärbten Zellkerne abgebildet werden konnten (Abb. 10H).

Desweiteren wurden die HUVEC mit dem B-Blutgruppenantigen-Antikörper, DAPI und dem FITC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt um eine eventuelle Veränderung der A-Blutgruppenantigene, vor allem unter Inkubation der HUVEC der Blutgruppe A in humanem Serum der Blutgruppe B und 0, zu detektieren. Hier konnte aber kein Signal gezeigt werden, sodass man davon ausgehen kann, dass sich die Blutgruppenantigene nicht qualitativ verändert haben, sondern allenfalls quantitativ abgenommen haben (Abb. 10C, 10D, 10F und 10G).

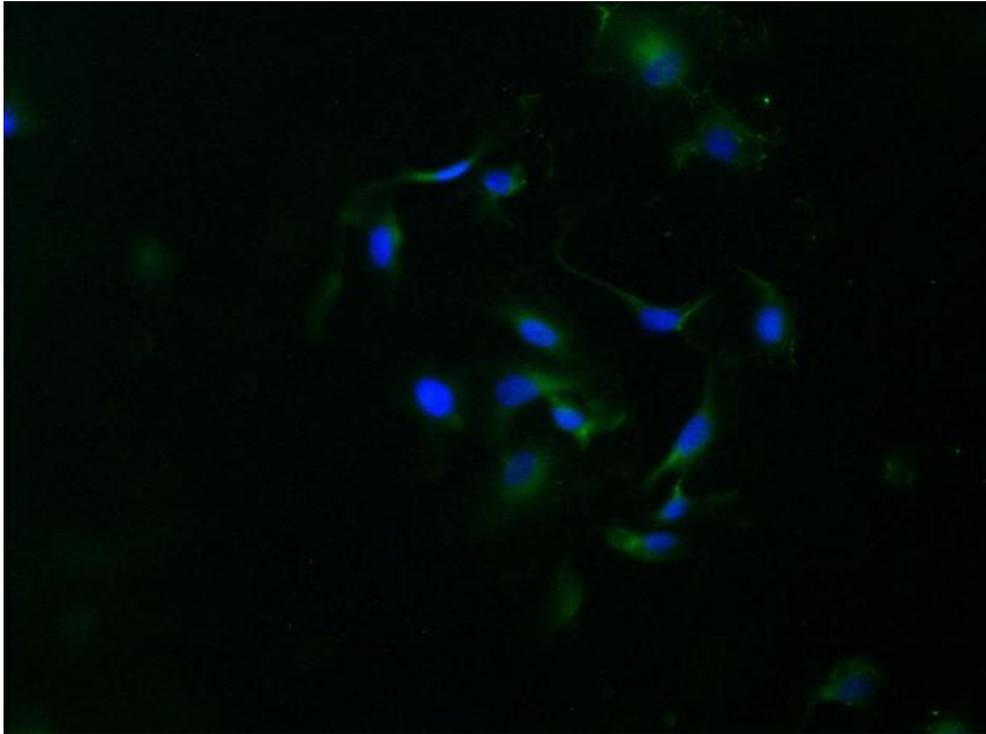


**Abb. 10A** Immunfluoreszenzfärbung der HUVEC Blutgruppe A<sub>1</sub>O an Tag null mittels A-Blutgruppenantigen-Antikörper, FITC-konjugiertem Sekundärantikörper und DAPI (Vergrößerung 200fach).

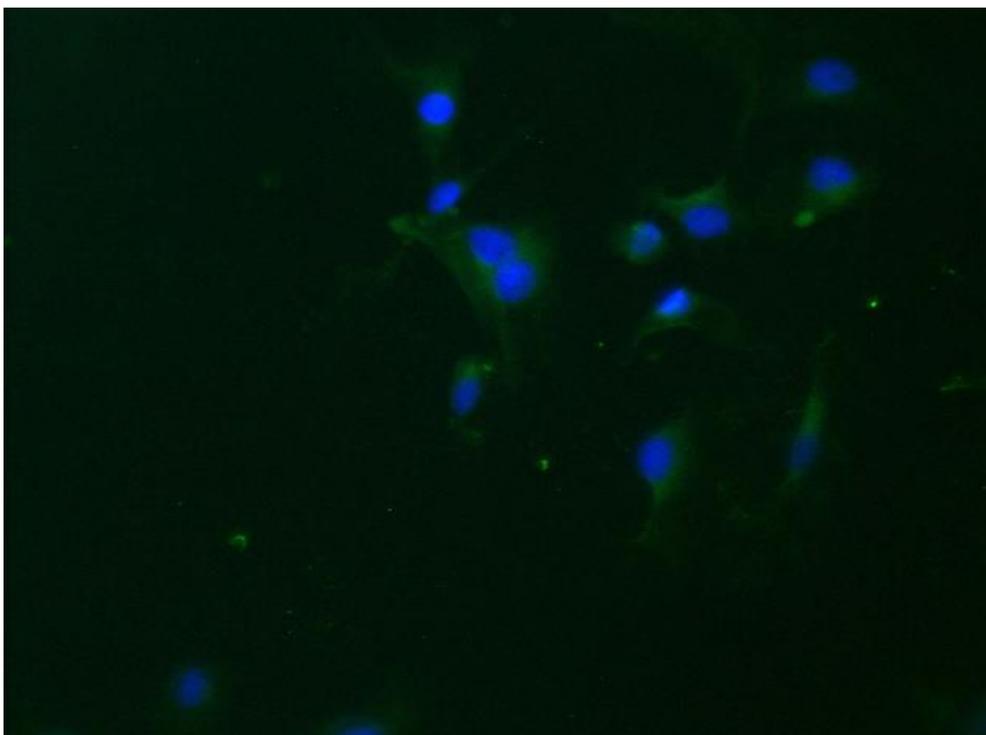


**Abb. 10B** Immunfluoreszenzfärbung der HUVEC Blutgruppe A<sub>1</sub>O nach Inkubation in humanem Serum der Blutgruppe A an Tag sieben mittels A-

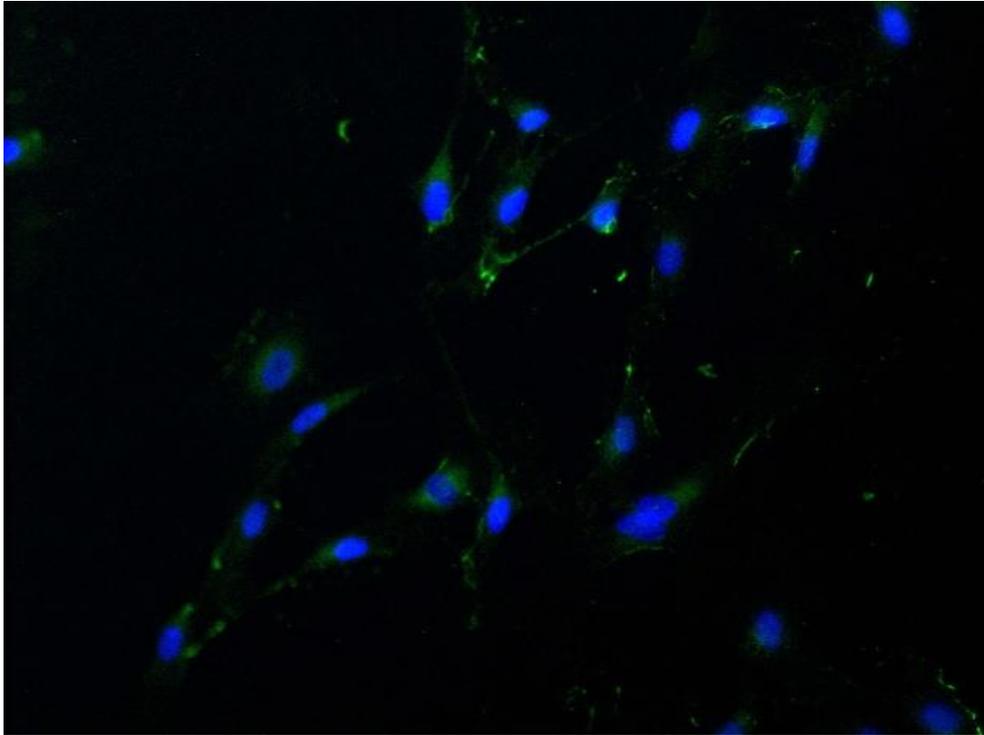
Blutgruppenantigen-Antikörper, FITC-konjugiertem Sekundärantikörper und DAPI (Vergrößerung 200fach).



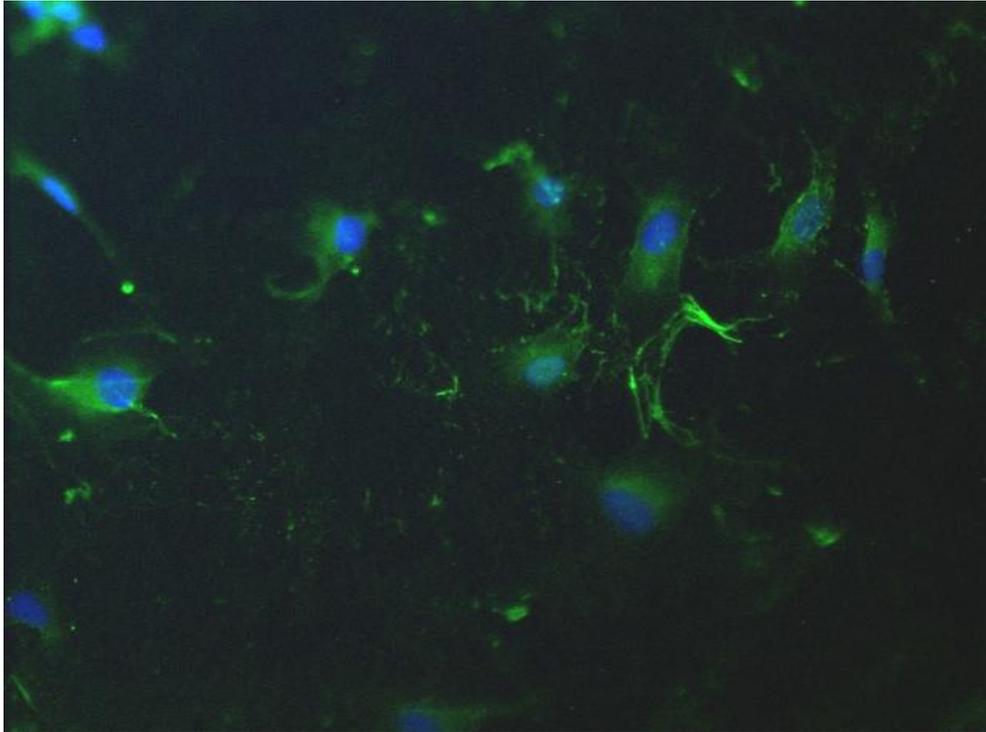
**Abb. 10C** Immunfluoreszenzfärbung der HUVEC Blutgruppe A<sub>1</sub>O nach Inkubation in humanem Serum der Blutgruppe B an Tag sieben mittels A-Blutgruppenantigen-Antikörper, FITC-konjugiertem Sekundärantikörper und DAPI (Vergrößerung 200fach).



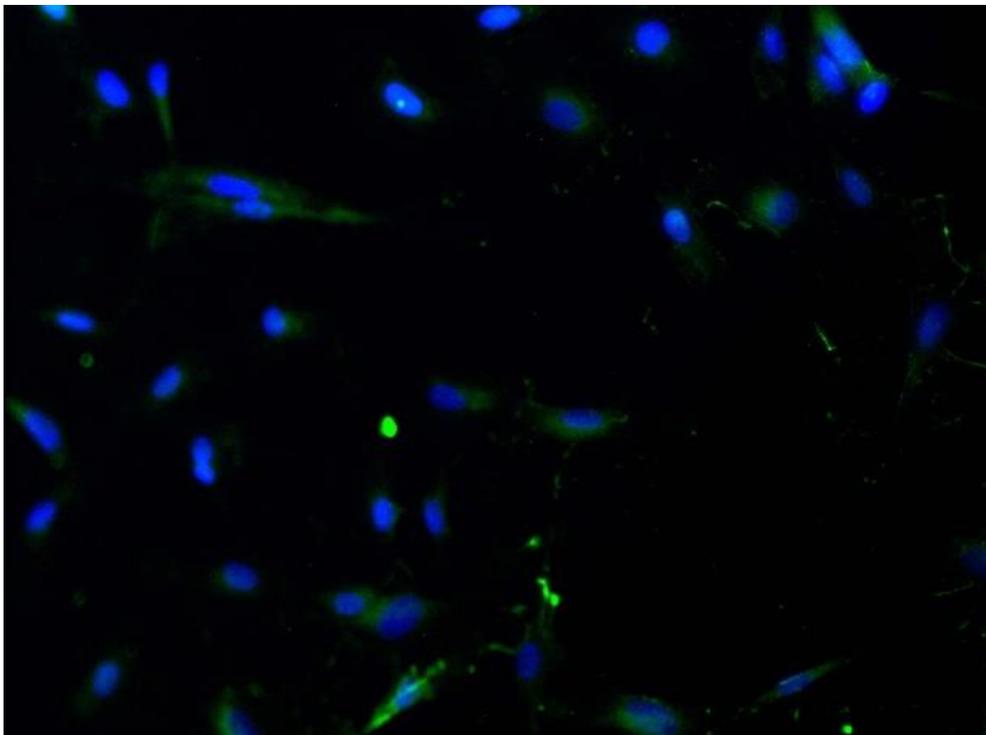
**Abb. 10D** Immunfluoreszenzfärbung der HUVEC Blutgruppe A<sub>1</sub>O nach Inkubation in humanem Serum der Blutgruppe 0 an Tag sieben mittels A-Blutgruppenantigen-Antikörper, FITC-konjugiertem Sekundärantikörper und DAPI (Vergrößerung 200fach).



**Abb. 10E** Immunfluoreszenzfärbung der HUVEC Blutgruppe A<sub>1</sub>O nach Inkubation in humanem Serum der Blutgruppe A an Tag 14 mittels A-Blutgruppenantigen-Antikörper, FITC-konjugiertem Sekundärantikörper und DAPI (Vergrößerung 200fach).

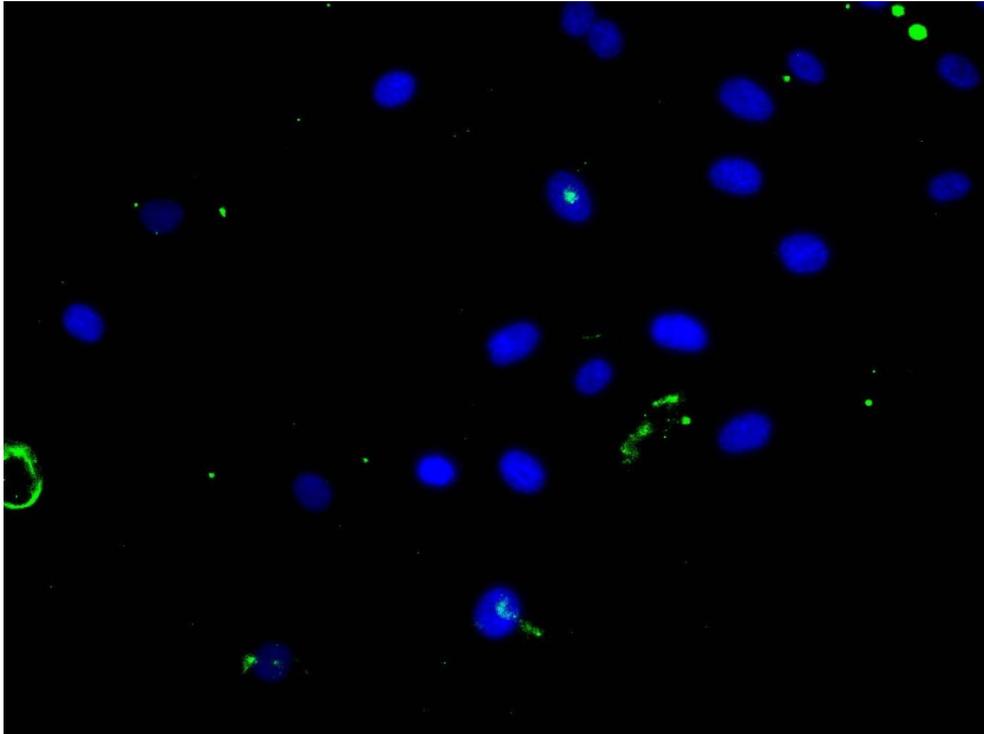


**Abb. 10F** Immunfluoreszenzfärbung der HUVEC Blutgruppe A<sub>10</sub> nach Inkubation in humanem Serum der Blutgruppe B an Tag 14 mittels A-Blutgruppenantigen-Antikörper, FITC-konjugiertem Sekundärantikörper und DAPI (Vergrößerung 200fach).



**Abb. 10G** Immunfluoreszenzfärbung der HUVEC Blutgruppe A<sub>10</sub> nach Inkubation in humanem Serum der Blutgruppe 0 an Tag 14 mittels A-Blutgruppenantigen-

Antikörper, FITC-konjugiertem Sekundärantikörper und DAPI (Vergrößerung 200fach).



**Abb. 10H** Immunfluoreszenzfärbung der Negativkontrolle der HUVEC Blutgruppe A<sub>1</sub>O mittels FITC-konjugiertem Sekundärantikörper und DAPI (Vergrößerung 200fach).

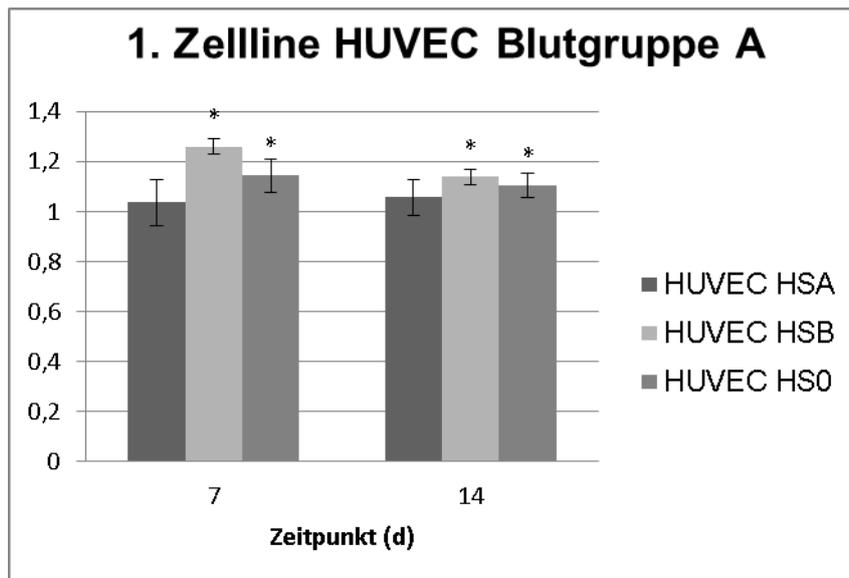
#### **4.4. ELISA zur Bestimmung der Blutgruppen-Glycosyltransferase-Aktivität**

Da eine Hypothese zur Erklärung des Phänomens der Akkommodation lautet, dass sich die Qualität bzw. Quantität der Blutgruppenantigene ändert, sollte ein Weg gefunden werden dies nachzuweisen. Als Grundlage diente ein Glycosyltransferase-Aktivitäts Kit der Firma R&D Systems. Da es aber eine Vielzahl von diesen Enzymen gibt, musste der ELISA zunächst spezialisiert werden auf die Blutgruppentransferasen. Da mit der Blutgruppe A gearbeitet wurde, handelte es sich um die N-Acetylgalactosaminyltransferase. Mit Hilfe dieses Versuchs sollten indirekt Rückschlüsse auf die Menge der vorhandenen Blutgruppenantigene gezogen werden können. Würde die Aktivität der A-Blutgruppen-Transferase am Ende der 14 Tage vermindert sein, so würde dies auch bedeuten, dass weniger A-Blutgruppenantigene produziert werden würden.

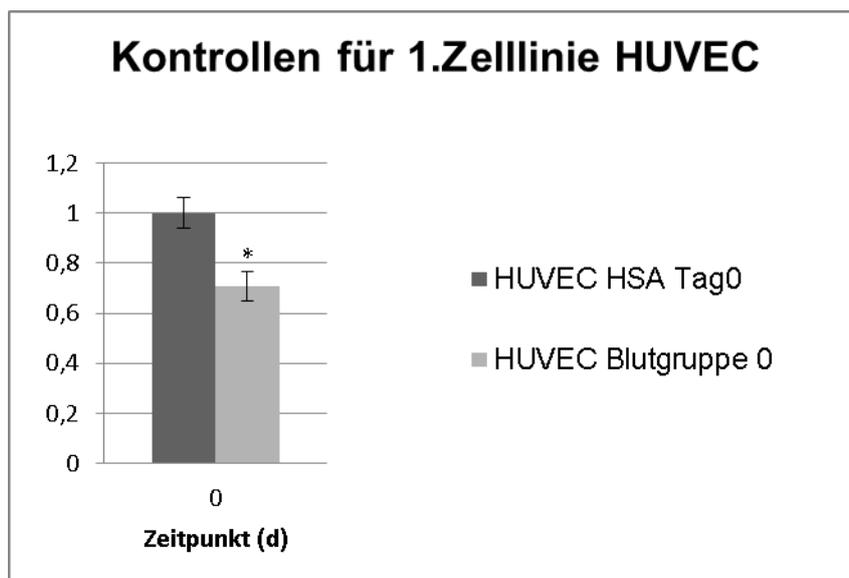
Es ergaben sich dabei relative Werte, denn Voraussetzung für die Erfassung absoluter Werte wäre gewesen, dass eine definierte Menge der N-Acetylgalactosaminyltransferase zur Verfügung gestanden hätte. Es war aber weder möglich diese käuflich zu erwerben noch diese

selbst herzustellen. Daher wurde die Methode gewählt, die ermittelten Werte in Bezug zu einem Referenzwert zu setzen und somit ergaben sich relative Ergebnisse. Es wurden bei allen Versuchen humane venöse Endothelzellen der Blutgruppe A<sub>1</sub>0 verwendet. Als Referenzgruppe dienten HUVEC am Tag null. Am Tag sieben und 14 wurde dann ein ELISA durchgeführt, um die Veränderung der Blutgruppen-Glycosyltransferase-Aktivität nach Inkubation der HUVEC in blutgruppenfremdem Serum der Blutgruppe B und 0 zu erfassen. Als Positivkontrolle wurde eine Schale HUVEC jeweils am Tag sieben und 14 in humanem Serum der Blutgruppe A inkubiert. Als Negativkontrolle dienten HUVEC der Blutgruppe 0. Die ermittelten Werte der HUVEC der Blutgruppe A am Tag null wurden als Referenzgruppe mit dem Wert 100% gleichgesetzt. Die ermittelten Werte der HUVEC am Tag sieben und 14 wurden dann zu diesem Referenzwert in Beziehung gesetzt. Anschließend wurden die ermittelten Werte für jede Zelllinie in jeweils einem Säulendiagramm zusammengefasst. Ein weiteres Diagramm erhält die Positiv- und Negativkontrolle. Um die Signifikanz der Versuche zu ermitteln, wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney Test gewählt. Als signifikant galten Werte unter der Bedingung  $p < 0,05$ .

Bei der 1. Zelllinie der humanen venösen Endothelzellen der Blutgruppe A<sub>1</sub>0 blieben die Positivkontrollen, also die HUVEC, die in humanem Serum der Blutgruppe A inkubiert wurden, nahezu konstant. Nach sieben Tagen erhielt man einen Wert von 103,5% ( $p = 0,413$ , nicht signifikant) und nach 14 Tagen von 105,7% ( $p = 0,286$ , nicht signifikant). Für die Inkubation in humanem Serum der Blutgruppe B zeigte sich am Tag sieben zunächst eine Zunahme um 25,9% gegenüber dem Referenzwert ( $p = 0,016$ , signifikant), am Tag 14 nur noch ein Wert von 113,8% ( $p = 0,016$ , signifikant) und wiederum eine Abnahme von etwa der Hälfte der Zunahme gegenüber dem Wert von Tag sieben. In humanem Serum der Blutgruppe 0 ergab sich ebenfalls zunächst eine Zunahme am Tag sieben gegenüber dem Ausgangswert mit 114,4% ( $p = 0,032$ , signifikant) und am Tag 14 wieder eine Abnahme gegenüber Tag sieben mit einem Wert von 110,4% ( $p = 0,032$ , signifikant). Die HUVEC der Blutgruppe 0 dienten als Negativkontrolle und ergaben einen Wert von 70,9% ( $p = 0,016$ , signifikant). Insgesamt scheint also die Aktivität der N-Acetylgalactosaminyltransferase bei dieser Zelllinie zunächst zuzunehmen und nach Tag sieben dann allmählich abzunehmen. Jedoch lag keiner der Werte für die Inkubation in blutgruppenfremdem Serum unter dem Referenzwert. Eine Tendenz zur Abnahme war jedoch erkennbar, aber nicht eindeutig zu beweisen.



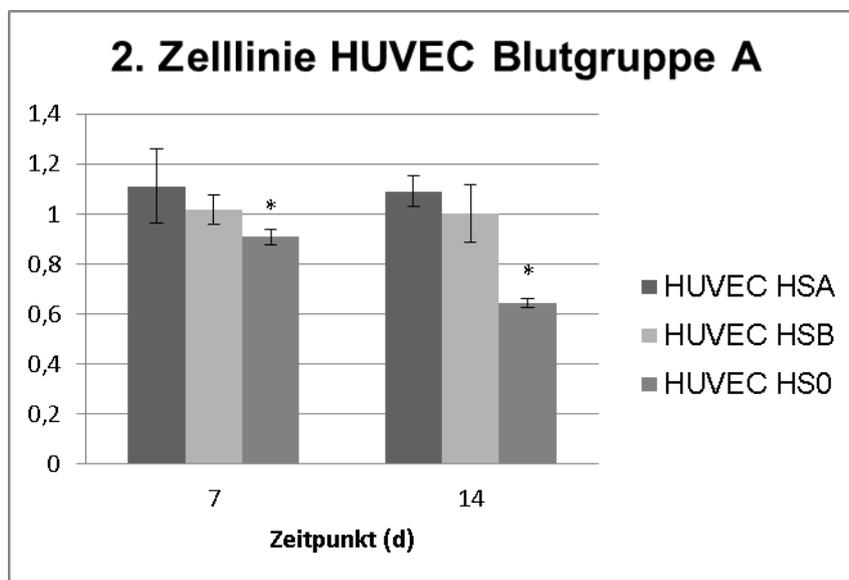
**Abb. 11A** Veränderung der  $\alpha$ 1,3N-Acetylgalactosaminyltransferase-Aktivität der 1. Zelllinie der HUVEC der Blutgruppe A<sub>1</sub>0 in humanem Serum der Blutgruppe A, B und 0 an Tag sieben und 14 (HS= humanes Serum, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).



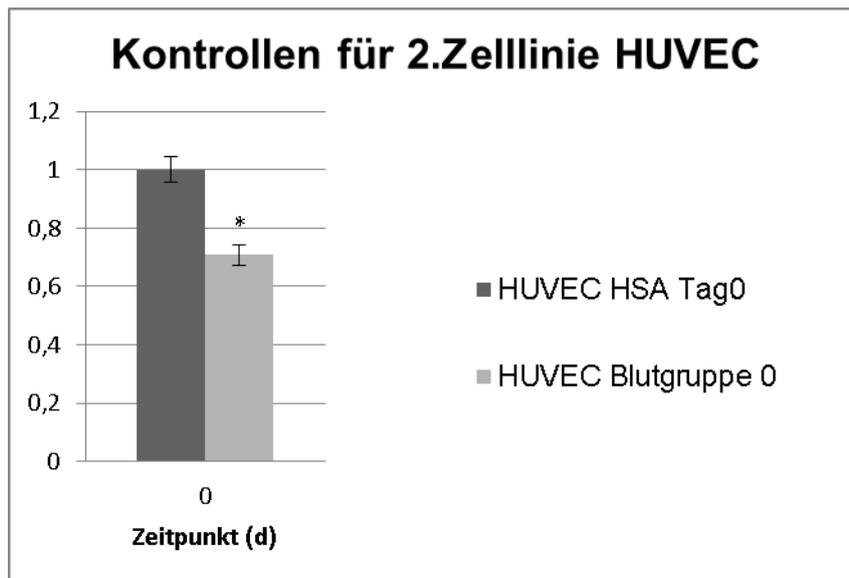
**Abb. 11B** Referenzgruppe für die Veränderung der  $\alpha$ 1,3N-Acetylgalactosaminyltransferase-Aktivität der 1. Zelllinie der HUVEC der Blutgruppe A<sub>1</sub>0. Positivkontrolle = HUVEC in humanem Serum der Blutgruppe A an Tag 0. Negativkontrolle = HUVEC der Blutgruppe 0 (HS= humanes Serum, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

Die 2. Zelllinie der HUVEC Blutgruppe A<sub>1</sub>0 zeigte ebenfalls nahezu konstante Werte für die Inkubation in humanem Serum der Blutgruppe A mit einem Wert von 111,1% ( $p = 0,343$ , nicht signifikant) an Tag sieben und 109,1% ( $p = 0,114$ , nicht signifikant) an Tag 14. Für die

Inkubation in humanem Serum der Blutgruppe B zeigte sich ein fast stagnierender Wert gegenüber der Referenzgruppe von 101,8% ( $p = 0,886$ , nicht signifikant) an Tag sieben und 100,1% ( $p = 1,0$ , nicht signifikant) an Tag 14. Die HUVEC, die in humanem Serum der Blutgruppe 0 inkubiert wurden, zeigten eine signifikante Abnahme gegenüber dem Referenzwert von 90,7% ( $p = 0,029$ , signifikant) an Tag sieben, also eine Abnahme von 9,3% und von 64,5% ( $p = 0,029$ , signifikant) an Tag 14. Für die Negativkontrolle, also die HUVEC der Blutgruppe 0 ergab sich ein Wert von 70,9% ( $p = 0,029$ , signifikant). Damit zeigte sich insgesamt eine Stagnation der A-Blutgruppen-Transferase-Aktivität für die Inkubation in humanem Serum der Blutgruppe B und eine signifikante Abnahme der Aktivität für die Inkubation in humanem Serum der Blutgruppe 0.

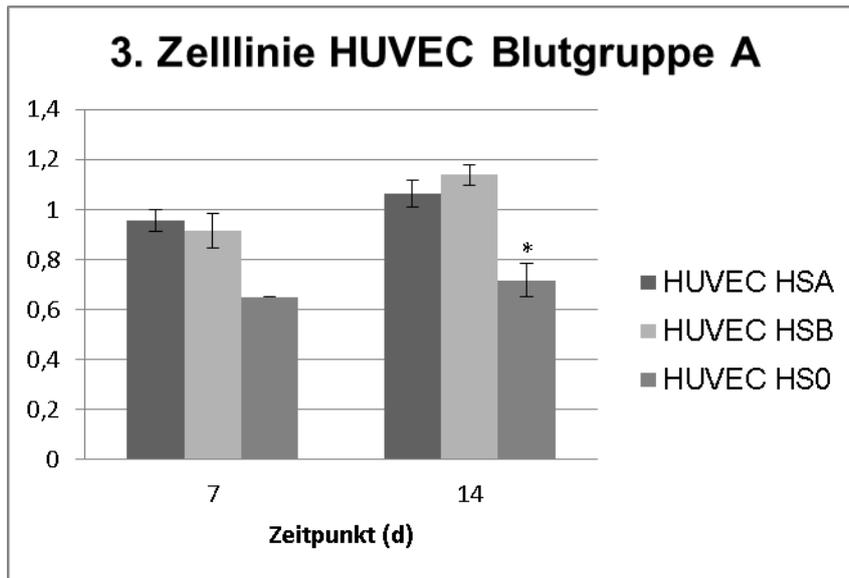


**Abb. 12A** Veränderung der  $\alpha$ 1,3N-Acetylgalactosaminyltransferase-Aktivität der 2. Zelllinie der HUVEC der Blutgruppe A<sub>1</sub>0 in humanem Serum der Blutgruppe A, B und 0 an Tag sieben und 14 (HS= humanes Serum, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

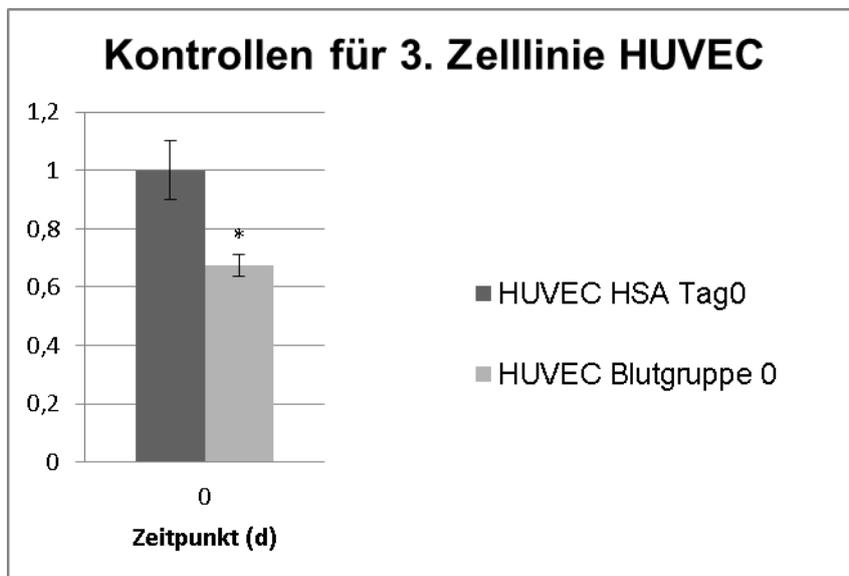


**Abb. 12B** Referenzgruppe für die Veränderung der  $\alpha$ 1,3N-Acetylgalactosaminyltransferase-Aktivität der 2. Zelllinie der HUVEC der Blutgruppe A<sub>1</sub>0. Positivkontrolle = HUVEC in humanem Serum der Blutgruppe A an Tag null. Negativkontrolle = HUVEC der Blutgruppe 0 (HS= humanes Serum, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

Auch die 3. Zelllinie der HUVEC Blutgruppe A<sub>1</sub>0 zeigte für die Behandlung mit humanem Serum der Blutgruppe A an Tag sieben mit 95,4% ( $p = 0,629$ , nicht signifikant) und an Tag 14 mit 106,3% ( $p = 0,413$ , nicht signifikant) nahezu Werte um den Referenzbereich von 100%. Für die Inkubation in humanem Serum der Blutgruppe B zeigte sich an Tag sieben ein Wert von 91,6% ( $p = 0,4$ , nicht signifikant) und an Tag 14 von 113,9% ( $p = 0,133$ , nicht signifikant). Die Behandlung mit humanem Serum der Blutgruppe 0 ergab eine deutliche Abnahme gegenüber dem Referenzwert von 65% ( $p = 0,133$ , nicht signifikant) an Tag sieben und 71,7% ( $p = 0,029$ , signifikant) an Tag 14. Die Negativkontrolle ergab einen Wert von 67,3% ( $p = 0,029$ , signifikant). Auch bei dieser Zelllinie zeigte sich also eine deutliche Abnahme der Glycosyltransferase-Aktivität über die 14 Tage für die Behandlung mit humanem Serum der Blutgruppe 0. Für Blutgruppe B ergaben sich keine nennenswerten Veränderungen.



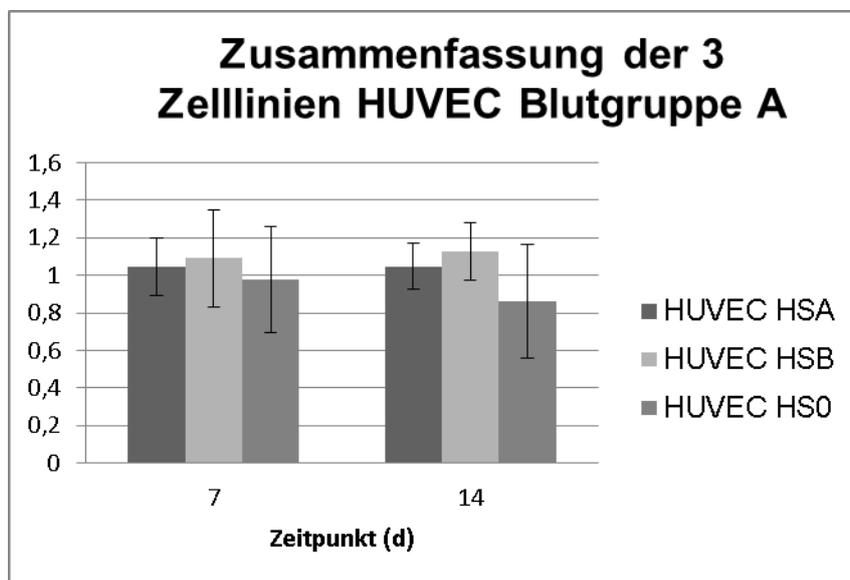
**Abb. 13A** Veränderung der  $\alpha$ 1,3N-Acetylgalactosaminyltransferase-Aktivität der 3. Zelllinie der HUVEC der Blutgruppe A<sub>1</sub>0 in humanem Serum der Blutgruppe A, B und 0 an Tag sieben und 14 (HS= humanes Serum, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01).



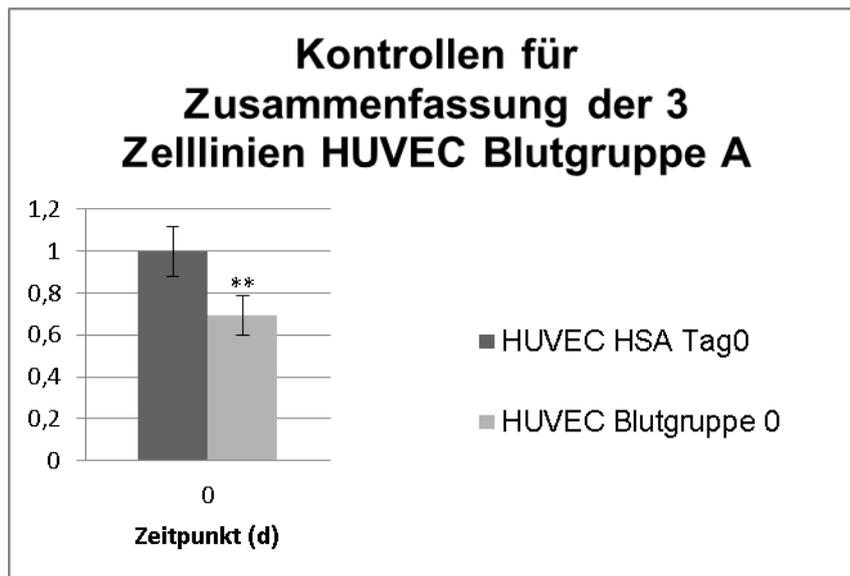
**Abb. 13B** Referenzgruppe für die Veränderung der  $\alpha$ 1,3N-Acetylgalactosaminyltransferase-Aktivität der 3. Zelllinie der HUVEC der Blutgruppe A<sub>1</sub>0. Positivkontrolle = HUVEC in humanem Serum der Blutgruppe A an Tag null. Negativkontrolle = HUVEC der Blutgruppe 0 (HS= humanes Serum, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01).

Abschließend wurden die Ergebnisse der drei Zelllinien HUVEC Blutgruppe A als unverbundene Stichproben in einem Säulendiagramm zusammengefasst. Die Ergebnisse für

die Inkubation in humanem Serum der Blutgruppe A zeigen sich konstant mit einem 7-Tages-Wert von 104,4% ( $p = 0,487$ , nicht signifikant) und einem 14-Tages-Wert von 104,8% ( $p = 0,463$ , nicht signifikant). Auch für die Behandlung mit humanem Serum der Blutgruppe B ergaben sich keine deutlichen Veränderungen mit 109,2% ( $p = 0,602$ , nicht signifikant) am 7. Tag und 112,8% ( $p = 0,076$ , nicht signifikant) am 14. Tag. Für Blutgruppe 0 lässt sich eine etwas deutlichere Veränderung eruieren. So betrug der Wert an Tag sieben 97,9% ( $p = 0,687$ , nicht signifikant) und 86% ( $p = 0,282$ , nicht signifikant). Die Negativkontrolle lag bei 69,2% ( $p < 0,001$ , signifikant). Es lässt sich also insgesamt für Blutgruppe B keine wesentliche Veränderung über den Zeitraum von 14 Tagen ermitteln, aber für Blutgruppe 0 ist durchaus eine Tendenz zur Abnahme der  $\alpha 1,3N$ -Acetylgalactosaminyltransferase-Aktivität erkennbar.



**Abb. 14A** Veränderung der  $\alpha 1,3N$ -Acetylgalactosaminyltransferase-Aktivität der drei Zelllinien der HUVEC der Blutgruppe A<sub>1</sub>0 in humanem Serum der Blutgruppe A, B und 0 an Tag sieben und 14 (HS= humanes Serum, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).



**Abb. 14B** Referenzgruppe für die Veränderung der  $\alpha$ 1,3N-Acetylgalactosaminyltransferase-Aktivität der drei Zelllinien der HUVEC der Blutgruppe A<sub>1</sub>0. Positivkontrolle = HUVEC in humanem Serum der Blutgruppe A an Tag null. Negativkontrolle = HUVEC der Blutgruppe 0 (HS= humanes Serum, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

## 5 Diskussion

---

### 5.1. Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

Die hier modellhaft verwendeten humanen venösen Endothelzellen HUVEC behielten auch bei Inkubation in blutgruppenfremdem Serum ihren originären Gewebetyp bei – in unserem Fall die Expression des Blutgruppe A-Antigens. Wir konnten allerdings die Aktivität der Blutgruppe-A-Antigen-Transferase (N-Acetylgalactosaminyltransferase) durch Exposition der Endothelzellen in blutgruppenfremdem Serum der Gruppe B und 0 modulieren. Bei Inkubation von HUVEC der Blutgruppe A in Serum der Blutgruppe 0 konnten wir bei zwei von drei verwendeten HUVEC-Zelllinien eine Verminderung der N-Acetylgalactosaminyltransferase-Aktivität nach sieben und 14 Tagen Inkubationsdauer feststellen. Dies bedeutet, dass über einen längeren Zeitraum gesehen, die Produktion des A-Antigens möglicherweise abnimmt, wenn die entsprechende Glycosyltransferase in ihrer Aktivität gehemmt wird.

### 5.2. Inkubation der humanen venösen Endothelzellen in humanem Serum

Die Ursache des Phänomens der Akkommodation ist noch weitgehend unbekannt. Um das Ereignis einer Nierentransplantation in Bezug auf die Akkommodation modellhaft darzustellen, wurden in dieser Arbeit humane venöse Endothelzellen gewählt, welche in humanem Serum inkubiert wurden. Normalerweise enthält das Medium, welches für die Ernährung und das Wachstum der HUVEC genutzt wird 2% fetales Kälberserum (FBS). Dieses wurde hier jedoch durch humanes Serum ersetzt. Um die Verträglichkeit dieses neuen Mediums zu verifizieren, wurden HUVEC der Blutgruppe A in drei Gruppen eingeteilt basierend auf verschiedenen Konzentrationen des Zusatzes an humanem Serum und für 14 Tage mittels Mikroskop hinsichtlich des Wachstums untersucht. Eine Kontrollgruppe wurde wie es herkömmlicherweise üblich ist mit 2 % FBS, eine andere Gruppe mit einer 1:1 Mischung aus FBS und humanem Serum der Blutgruppe A und eine letzte Gruppe mit 2% humanem Serum der Blutgruppe A versetzt. Hier ergaben sich keine Unterschiede bezüglich der Konfluenz bzw. des Wachstums im Allgemeinen.

Eine andere Arbeitsgruppe aus Baden-Württemberg und Hessen untersuchte die Inkubation von mesenchymalen Stammzellen in humanem Serum der Blutgruppe AB. Sie benutzten dabei gepooltes humanes Serum, wie es auch in der vorliegenden Arbeit der Fall war. Auch diese Arbeitsgruppe filtrierte das Serum noch einmal mit Filter einer Porengröße von 0,2µm.

Als Vergleichsgruppe diene ihnen ebenfalls eine Gruppe, die in fetalem Kälberserum kultiviert wurde. Auch hier ergaben sich morphologische Unterschiede, sodass die Zellen der humanen Serum-Gruppe kleiner und spindelförmiger als die Vergleichsgruppe waren. Die Zellen, die in humanem Serum kultiviert wurden zeigten außerdem ein dichteres Wachstumsmuster und eine geringere Adhärenz und ließen sich somit leichter vom Flaschenboden lösen (Kocaoemer et al., 2007). Auch die in dieser Arbeit verwendeten HUVEC zeigten eine geringere Adhärenz, waren jedoch morphologisch etwas größer als die in FBS-kultivierten HUVEC. Des Weiteren erfassten die Arbeitsgruppen aus Baden-Württemberg und Hessen eine höhere Expansionsrate der humanen Serum-Gruppe gegenüber der FBS-Gruppe. Außerdem wurde die Expression bestimmter Oberflächenmarker der mesenchymalen Zellen untersucht. Im Gesamten konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Expression der untersuchten Oberflächenmarker bei Inkubation in humanem Serum im Vergleich zur Inkubation in FBS gezeigt werden (Kocaoemer et al., 2007).

Auch wir konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Wachstums und des Überlebens zwischen HUVEC kultiviert in humanem Serum im Vergleich zu FBS eruieren. Lediglich die Adhärenz und Morphologie unterschied sich leicht zwischen beiden Gruppen in der Hinsicht, dass die in humanem Serum kultivierten Zellen leichter vom Untergrund lösbar und etwas größer waren.

Dieses Ergebnis entspricht unseren Erwartungen, denn die Zellen stammen aus humanem Gewebe und die Kultivierung in humanem Serum spiegelt damit ihre natürliche Umgebung besser wider.

Nachdem diese Vorversuche abgeschlossen waren, konnten die Hauptversuche beginnen.

### **5.3. 14-Tages-Versuche**

Im Rahmen der 14-Tages-Versuche sollte die Situation 14 Tage nach erfolgter blutgruppeninkompatibler Nierentransplantation modellhaft dargestellt werden. Die HUVEC stellen dabei die Endothelzellen des blutgruppeninkompatiblen Transplantats und das Medium, welches humanes Serum enthält, das Serum des Empfängers mit den darin enthaltenen Blutgruppenantikörpern dar. Da festgestellt wurde, dass das Phänomen der Akkommodation nach etwa 14 Tagen eintritt, wurden die HUVEC für 14 Tage in blutgruppenfremdem Serum unter täglichem Mediumwechsel inkubiert. Nach unserem Kenntnisstand der aktuellen Literatur wurde ein derartiger Versuch bisher noch nicht unternommen, um nach den Ursachen der Akkommodation zu suchen. In der Literatur sind

einige Theorien dazu aufgestellt worden. So vermutet man als Ursache eine Veränderung der Blutgruppenantigene, der Blutgruppenantikörper oder des Transplantats selbst. Wir beschäftigten uns dabei vorrangig mit der Theorie der Blutgruppenantigene. Wir vermuteten, dass sich entweder die Menge der Blutgruppenantigene vermindert oder auch, wenn sich die Menge der Blutgruppenantigene auf der Zelloberfläche nicht ändern sollte, jedoch trotzdem ein Funktionsverlust dieser Antigene auftritt. Daher führten wir eine Immunfluoreszenz-Untersuchung der HUVEC durch, um eine zunächst qualitative Aussage über die Menge der Blutgruppenantigenexpression zu erhalten. Dies ließ jedoch noch keine Aussage über die Funktion der Blutgruppenantigene zu. Außerdem ist es auch möglich, dass sich die Menge der Blutgruppenantigene innerhalb der ersten 14 Tage nicht wesentlich ändert, aber durch eine Verminderung der Blutgruppen-Glycosyltransferasen kein neues Blutgruppenantigen nachproduziert wird. Das bedeutet, die Blutgruppenantigenmenge würde zunächst konstant bleiben und erst über einen längeren Zeitraum vermindert werden.

Die HUVEC wurden nun in dem blutgruppenfremden Serum über die 14 Tage inkubiert und dabei täglich lichtmikroskopisch hinsichtlich der Konfluenz beobachtet und fotografiert. Dabei zeigte sich eine Konstanz der Zelldichte über neun Tage. Anschließend nahm die Konfluenz bis zu Tag 14 ab. Am Ende blieben jedoch noch etwa 2 bis 2,5 Millionen HUVEC pro Zellkulturschale übrig, die für die Experimente ausreichend waren. Diese Abnahme der Konfluenz ab Tag neun bedeutet, dass das Gleichgewicht zwischen Wachstum und Verlust der Zellen sich in Richtung Zellverlust verschoben hat. Dies war aber in allen Gruppen, einschließlich der Kontrollgruppe zu beobachten entsprechend dem Alterungsprozess der primären Zellkultur. Normalerweise würde man die Zellen beim Erreichen einer Konfluenz von 80% splitten und passagieren. Hier wurden die Zellen aber über 14 Tage ohne Passagieren unter täglichem Mediumwechsel belassen. Dies stellt eine physiologische Belastungssituation für die Zellen dar.

#### **5.4. Immunfluoreszenzfärbung der Blutgruppenantigene der HUVEC**

Wir wollten nun die Veränderung der Blutgruppenantigene auf der Zelloberfläche der HUVEC untersuchen.

Zunächst musste die Funktionalität des verwendeten Blutgruppenantigen-Antikörpers getestet werden. Dazu wurde die Immunfluoreszenzfärbung der Blutgruppenantigene auf der Zelloberfläche der HUVEC verglichen mit derjenigen der Blutgruppenantigene auf der Oberfläche von Erythrozyten. Denn Blutgruppenantigene sind nicht nur auf der Oberfläche

von Erythrozyten exprimiert, sondern kommen auf einer Vielzahl von Zellen und Geweben des menschlichen Körpers vor. Daher werden diese auch als „Histo-Blutgruppen-Antigene“ bezeichnet (Ulfvin et al., 1993). Diese können noch einmal in zwei Gruppen unterteilt werden, nämlich den „ABO-Blutgruppenantigenen“, die auf Erythrozyten vorhanden sind, und den „ABO-Histoblutgruppenantigenen“, die von Gefäßendothelzellen getragen werden. Takahashi et al. sind sogar der Meinung, dass diese beiden Gruppen sich auch funktionell unterscheiden. So sollen die im Serum natürlich vorkommenden Anti-A- bzw. Anti-B-Blutgruppenantikörper eine höhere Affinität zu den Blutgruppenantigenen, die auf der Erythrozytenoberfläche exprimiert werden, haben als zu denjenigen auf der Oberfläche vaskulärer Endothelzellen (Takahashi et al., 2013). Wäre dies der Fall, so liegt auch in dieser Aussage eine mögliche Begründung für die Erklärung der Akkommodation. Denn wenn die Antikörper eine geringere Affinität haben zu diesem Gefäßendothel, so würde eine Abstoßungsreaktion nicht von solcher Stärke getragen werden wie dies bei der Reaktion mit fremden Erythrozyten zu erwarten wäre. In den ersten zwei Wochen nach der Transplantation werden die Patienten noch zusätzlich mit hochdosierten Immunsuppressiva therapiert, um eine mögliche Blutgruppenantigen-Antikörper-Reaktion zu unterdrücken. Wenn in dieser Zeit nun weitere Veränderungen der Blutgruppenantigene stattfinden würden, z.B. in ihrer Struktur, Funktionalität oder Quantität, würde dies bedeuten, dass eine Blutgruppenantigen-Antikörper Interaktion nur noch schwach vorkäme und so wäre dies eine mögliche Erklärung für das Phänomen der Akkommodation. Des Weiteren unterscheidet man sogenannte „Sekretoren“ und „Nicht-Sekretoren“ von Blutgruppenantigenen. „Sekretoren“ besitzen die Fähigkeit Blutgruppenantigenen in körpereigene Flüssigkeiten zu sezernieren bzw. eben dies auch nicht tun. Die Gene, die diesen Sekretorstatus codieren, sind auf Chromosom 19 lokalisiert und codieren für die Fucosyltransferase 2, ein Enzym, welches die Reaktion zur Produktion eines löslichen Blutgruppe-H-Antigens durch die Bindung von Fucose an die Galactose des Vorläufermoleküls auf der Erythrozytenmembran katalysiert. Das Blutgruppe-H-Antigen wird anschließend in Körperflüssigkeiten ausgeschieden. Etwa 80% der europäischen Bevölkerung sind „Sekretoren“. Die koreanische Forschungsgruppe um Kim et al. beschäftigte sich mit dem neutralisierenden Effekt dieser löslichen Blutgruppenantigene, die durch Spendernieren von „Sekretoren“ produziert wurden. Die Reduktion der Titer der Blutgruppenantikörper war zwischen den Spendernieren von „Sekretoren“ und „Nicht-Sekretoren“ nicht signifikant. Die Gruppe vermutet dennoch einen Einfluss der löslichen

Blutgruppenantigene im Zeitraum der Initiierung der Akkommodation. Interessanterweise zeigte sich eine besonders rasche Reduktion der Blutgruppenantikörper vom Immunglobulin M-Typ bei den „Nicht-Sekretoren“. Ursächlich dafür wird vermutet, dass hier der adsorptive Effekt der löslichen Blutgruppenantigene fehlt. Weniger Blutgruppenantigene bedeutet weniger Blutgruppenantikörper und dementsprechend ein geringerer Titer dieser Antikörper. Jedoch war die Reduktion der Blutgruppenantikörper-Titer vom Typ Immunglobulin G nicht signifikant. Hier vermutet man die Ursache in den molekularen Strukturunterschieden zwischen Immunglobulin G und M. Prinzipiell vermutete die Gruppe eine Schutzfunktion der löslichen Blutgruppenantigene. Diese sollten das Transplantat aktivieren im Widerstand gegen den humoralen Schaden. Dementsprechend hätten „Nicht-Sekretoren“ ein höheres Risiko für eine Antikörper-vermittelte Abstoßung. Daher wurde geschlussfolgert, dass der Sekretorstatus in der Frühphase der Akkommodation einen Einfluss haben könnte (Kim et al., 2016). Auch wenn diese Studie keine statistische Signifikanz erreicht hat, zeigt sie dennoch, dass Akkommodation kein starrer Vorgang zu sein scheint, sondern vielmehr ein dynamischer Prozess, der durch multiple äußere Faktoren beeinflusst und eben auch initiiert wird.

Blutgruppenantigene werden auf vaskulären Endothelzellen, im Sammelrohr und in distalen Tubuli exprimiert. Die Expression dieser Blutgruppenantigene in menschlichen Geweben ist abhängig von der Blutgruppe und dem Sekretorstatus. Wasserlösliche Blutgruppenantigene werden nur in Epithelzellen des Sammelrohrs und im Kelchsystem von „Sekretoren“ exprimiert (Kim et al., 2016).

Aufgrund dieser Literaturangaben wurden in der vorliegenden Arbeit humane venöse Endothelzellen genutzt. Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte sowohl bei der Anfärbung der Blutgruppenantigene der HUVEC, als auch bei der der Erythrozyten ein gleichmäßiges kräftiges Signal. Qualitativ wiesen die Erythrozyten ein etwas kräftigeres Signal als die HUVEC auf, vermutlich aufgrund der höheren Zahl an Blutgruppenantigenen auf der Erythrozyten-Oberfläche bei geringerer Zellgröße. Bei Blutgruppe A<sub>1</sub> sind dies etwa eine Million Blutgruppenantigene pro Erythrozyt, bei Blutgruppe A<sub>2</sub> etwa 330.000 und für Blutgruppe B etwa 600.000 (Takahashi et al., 2005). Bei Neugeborenen werden weniger Blutgruppenantigene auf Erythrozyten exprimiert, nämlich etwa 25-50% der bei Erwachsenen exprimierten (Yamamoto et al., 2004). Man kann demnach davon ausgehen, dass die Blutgruppenantigenexpression bei Neugeborenen auf anderen Blutgruppenantigen-exprimierenden Zellen und Geweben ebenso eine geringere Anzahl von Blutgruppenantigenen

aufweist. Die HUVEC entstammen der Nabelschnurvene Neugeborener, sodass man schlussfolgern kann, dass diese Zellen auch aus diesem Grund eine geringere Anzahl an Blutgruppenantigenen exprimieren im Vergleich zu Erythrozyten von Erwachsenen.

Im Rahmen des 14-Tages-Versuchs wurden die HUVEC nun in blutgruppenfremdem Serum kultiviert. Verwendet wurden HUVEC der Blutgruppe A<sub>1</sub>O. Das Blutgruppe-A-Antigen ließ sich über den gesamten Zeitraum nachweisen. Eine Abnahme der Stärke des Fluoreszenzsignals war im qualitativen Versuchsaufbau der Immunfluoreszenz entgegen unserer Hypothese nicht objektivierbar. Wir hatten auch postuliert, dass eine morphologische Konversion des Blutgruppenantigens A in das Blutgruppenantigen des blutgruppenfremden Serums, in dem die HUVEC über die 14 Tage inkubiert wurden, möglich sei. Diese Theorie konnten wir nicht bestätigen, denn unter der Inkubation in humanem Serum der Blutgruppe B konnte mit Hilfe eines Blutgruppenantigen-B-Antikörpers kein Fluoreszenzsignal detektiert werden und unter Inkubation in humanem Serum der Blutgruppe O konnte kein Verschwinden des Blutgruppe-A-Antigens festgestellt werden. Dazu kann man jedoch ergänzen, dass bei der Inkubation in humanem Serum der Blutgruppe O kein Blutgruppe-H-Antigen-Antikörper verwendet wurde, um das möglicherweise doch vorhandene Blutgruppe-H-Antigen zu detektieren.

In der Arbeitsgruppe um Ulfvin et al. wurde die Expression von Blutgruppenantigenen in ABO-inkompatiblen Nieren untersucht. Dabei untersuchten sie Nieren von Spendern der Blutgruppe A<sub>2</sub>. Diese Blutgruppe wurde in den Anfängen der blutgruppeninkompatiblen Nierentransplantation bevorzugt genutzt, da die exprimierte Antigenmenge der Blutgruppe A<sub>2</sub> geringer ist als die der Blutgruppe A<sub>1</sub>, damit also ein geringeres immunologisches Potential vorlag. Darin wurde unter anderem der Fall beschrieben, dass beide Nieren desselben humanen Spenders in zwei unterschiedliche Empfänger, beide mit Blutgruppe O, transplantiert wurden. Eine Niere musste an Tag fünf nach der Transplantation wegen akuter Abstoßung entfernt und die andere Niere an Tag 12, ebenfalls wegen akuter Rejektion. Obwohl die Nieren vom gleichen Spender stammten und in zwei unterschiedliche Empfänger der gleichen Blutgruppe transplantiert wurden, zeigte die länger transplantierte Niere eine geringere Blutgruppenantigenexpression nach Entfernung des abgestoßenen Organs als die kürzer transplantierte Niere. Nachgewiesen wurde die Blutgruppenantigenexpression mittels Dünnschichtchromatographie und anschließender Autoradiographie mittels Inkubation mit einem Blutgruppenantigen-Antikörper. Von der Arbeitsgruppe wurde nun diskutiert, ob

möglicherweise die Destruktion der Blutgruppenantigene durch das Immunsystem des Empfängers ursächlich sein könnte. Denn schließlich befand sich eine Niere nur fünf Tage im Körper des Empfängers, währenddessen die andere Niere doppelt so lange, nämlich 12 Tage einem fremden Immunsystem ausgesetzt war. Eine andere Vermutung war, dass auch das Vorkommen von Blutgruppen-Glycosyltransferase-Inhibitoren ein Grund sein könnte. Die Autoren mutmaßten, dass dies eventuell ein natürlicher Antikörper sein könnte, der im Empfänger produziert wurde. Dieser Antikörper würde dann möglicherweise die Aktivität der N-Acetylgalactosaminyltransferase derartig supprimieren, dass eben weniger Blutgruppenantigen-A produziert und dementsprechend auch weniger auf der Zelloberfläche exprimiert werden kann. Dementsprechend hat die Arbeitsgruppe die Seren der Patienten vier bis fünf Wochen nach der Transplantation auf das Vorhandensein solcher Inhibitoren untersucht, konnten jedoch keinen solchen finden (Ufvin et al., 1993). Jedoch könnte man den Zeitraum der Untersuchung auf das Vorhandensein solcher Antikörper als etwas spät erachten, denn die Nieren wurden bereits ein bzw. zwei Wochen nach der Transplantation entfernt und die Untersuchung auf Antikörper gegen die Blutgruppen-Glycosyltransferase erfolgte erst nach vier bis fünf Wochen. Ob zu diesem Zeitpunkt noch ausreichend Antikörper im Blut der Empfänger nachweisbar waren, ist eher fraglich, da die B-Lymphozyten nach Entfernung des Transplantats die Produktion eines solchen Antikörpers einstellen und die bereits sezernierte Menge dieses Antikörpers vermutlich auch zeitnah vom Immunsystem des Empfängers beseitigt wird, da sie dann keine wirkliche Funktion mehr haben. Natürlich spiegeln diese Daten nur die Situation in abgestoßenen Organen wider, was jedoch bei dem Phänomen der Akkommodation nicht der Fall ist. Aber dieses Beispiel zeigt dennoch, dass die Blutgruppenantigene durch das Immunsystem moduliert werden können und daher die in dieser Arbeit geäußerte Theorie in gewisser Weise unterstützen.

Nosaka et al. untersuchten die Blutgruppe-A-Antigen-Expression in Gefäßendothelzellen von 30 Biopsien in pathologisch veränderter Haut. Gefunden wurde hier im Gegensatz zu dem Ergebnis der französischen Gruppe eine vermehrte Expression von Blutgruppe-A-Antigenen in entzündlich veränderten Hautarealen im Vergleich zu gesunder Haut. Die Ursache dafür wurde vermutet in einer vermehrten Stimulation der Endothelzellen in pathologisch veränderten Arealen durch Zytokine. Diese Zytokine würden dann die Expression von proinflammatorischen Genen induzieren, ebenso wie die Expression von Blutgruppenantigenen (Nosaka et al., 2008). Nun unterscheiden sich die Ergebnisse der

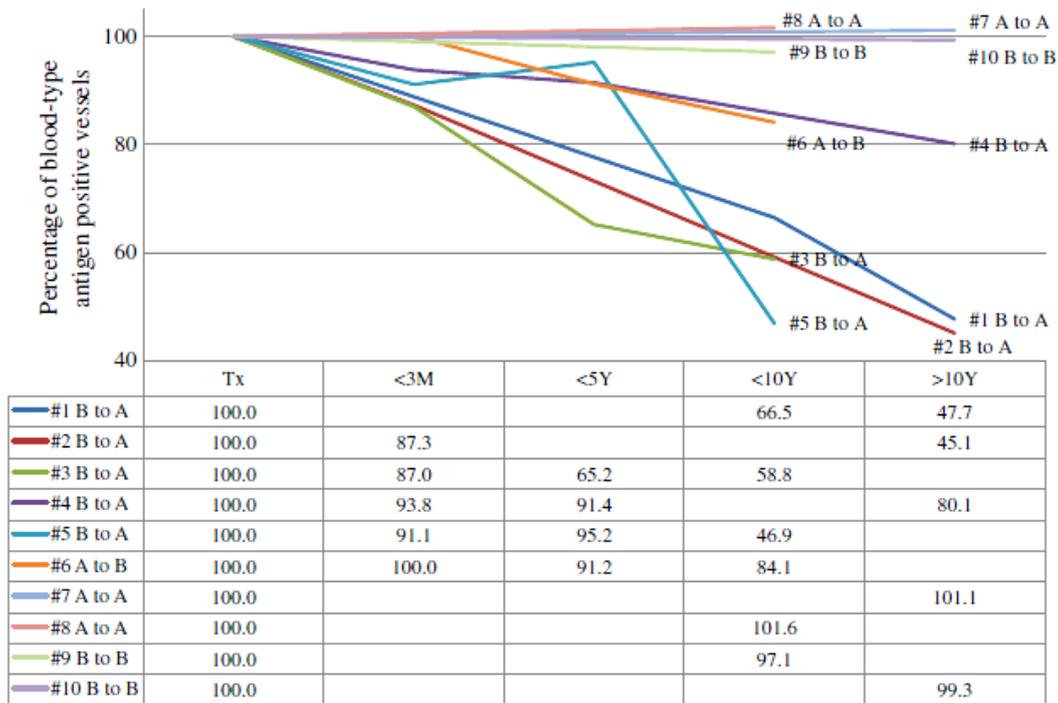
französischen Arbeitsgruppe um Bariéty et al. und die der Gruppe um Nosaka et al. in den Gewebeproben. Einmal handelte es sich um Gewebe von Nieren und einmal um Hautgewebe. Möglicherweise erfolgt die Regulation der Gene in diesen beiden Geweben auf unterschiedliche Art und Weise.

Auch im Bereich der Karzinogenese und chronischen Inflammation wurden weitere derartige Phänomene der Veränderung der Blutgruppenantigene beschrieben. So ist beispielsweise bekannt, dass Menschen mit Blutgruppe 0 ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Duodenalulkus haben oder auch, dass Blutgruppe A ein Risikofaktor für das Auftreten eines Magenkarzinoms ist (Yamamoto et al., 2004). Die Greifswalder Arbeitsgruppe Weiss et al. fand eine Assoziation zwischen dem Vorhandensein der Blutgruppe B und dem Auftreten einer chronischen Pankreatitis (Weiss et al., 2016).

Aber auch Veränderungen der Blutgruppenantigene wurden bei Karzinompatienten beobachtet. So hat die Arbeitsgruppe um Masamune et al. (1958) einen Verlust der Blutgruppenantigene in den Karzinomzellen beim Magenkarzinom feststellen können. Ebenso wie der Verlust der Blutgruppenantigene wurde auch die Veränderung des Blutgruppenantigens in einen anderen Blutgruppentyp beobachtet, beispielsweise im Rahmen von Magenkarzinomen und Kolonkarzinomen (Häkkinen et al., 1970 und Denk et al., 1974). Man vermutete in diesem Rahmen sogar die Expression einer blutgruppenfremden Transferase durch das eigene Blutgruppen-Gen durch einen nicht weiter bekannten Mechanismus (Yamamoto et al., 2004). Ob ein solcher Mechanismus tatsächlich vorkommt, ist jedoch noch weiteren Studien vorbehalten. Die Frage, die sich dabei auch stellt, ist, welcher Vorteil sich aus einer solchen Veränderung des Blutgruppenantigens für den Tumor ergeben würde und ob dies tatsächlich auf Genebene stattfindet. Für die Tumorzellen wäre es doch eigentlich ein geringerer Aufwand Substanzen, in diesem Falle also den Blutgruppen-Transferasen ähnliche Enzyme, zu produzieren, die die Produktion der Blutgruppenantigene verändern. Dies würde dann eher einer Art Zufall der Natur entsprechen, denn es würde sich dann nicht um die „echten“ Blutgruppentransferasen handeln. Natürlich ist es auch durchaus denkbar, dass eine Veränderung viel tiefgreifender, also auf Genebene stattfindet. Dies wäre auch für das Phänomen der Akkommodation denkbar. Durch einen gewissen Stimulus, wie die Ischämiezeit während der Transplantation, würde beispielsweise die Produktion der Blutgruppentransferasen des Transplantats vermindert werden und dadurch weniger Blutgruppenantigene produziert werden bzw. zunächst keine weiteren Blutgruppenantigene

nachproduziert werden. Dadurch könnte möglicherweise auch die Funktionalität der Transplantat-Blutgruppenantigene nachlassen und eine Blutgruppenantigen-Antikörper-Interaktion würde möglicherweise nicht mehr vorkommen oder nur noch in abgeschwächter, nicht weiter relevanter, Form. Genau das beschreibt der Begriff Akkommodation, eine fehlende Abstoßungsreaktion trotz des Vorhandenseins von Blutgruppenantigenen und zugehörigen Blutgruppenantikörpern. Möglicherweise sind also die Mechanismen, die zu einer Veränderung bzw. einem Verlust der Blutgruppenantigene im Rahmen der Karzinogenese führen in gewisser Art und Weise miteinander verwandt.

Eine japanische Arbeitsgruppe untersuchte die Blutgruppenantigenexpression bei blutgruppeninkompatiblen Nierentransplantationen über einen längeren Zeitraum. Sie nutzten dabei Biopsien, die über einen Zeitraum von 10 Jahren nach der Transplantation durchgeführt wurden. Sechs Empfänger der Blutgruppe B erhielten ein Organ der Blutgruppe A<sub>1</sub> und 13 Empfänger der Blutgruppe A<sub>1</sub> erhielten eine Niere der Blutgruppe B. Als Kontrollgruppe dienten Biopsien blutgruppenkompatibler Nierentransplantationen. Die Blutgruppenantigene wurden dabei immunhistochemisch mit Hilfe von Blutgruppenantigen-Antikörpern nachgewiesen. Um die Blutgruppenantigene nun auch quantifizieren zu können, stellten die Autoren eine einfache Formel auf, die den Quotienten aus Blutgruppenantigen-positiven Blutgefäßen und Blutgefäßen im Allgemeinen bildet. Die Blutgefäße wurden detektiert durch einen CD34-Antikörper, da CD34 einen Marker für Endothelzellen darstellt. Die Expression sowohl der Blutgruppe-A-Antigene als auch der Blutgruppe-B-Antigene nahm dabei über die Zeit ab. Innerhalb der ersten drei Monate ergab sich eine Expression von 91,8%, nach fünf Jahren von 85,8% und nach 10 Jahren von 64,1%. Die Arbeitsgruppe räumte allerdings auch ein, dass andere Arbeitsgruppen, die eine ähnliche Methode nutzten, keine Veränderung der Antigenexpression registriert haben. Ein Patient wies sogar eine Veränderung des Blutgruppenantigens des Transplantats 2582 Tage nach der Transplantation in seinen eigenen Blutgruppentyp auf. Das Transplantat dieses Patienten wurde allerdings abgestoßen (Tanabe et al., 2011).



**Abb. 15** Veränderung der Blutgruppenantigenexpression während einer Langzeitbeobachtung in ausgewählten Patienten. Bei allen ABO-inkompatiblen Patienten wurde eine Abnahme der Blutgruppenantigen-positiven Gefäße beobachtet. Bei allen blutgruppenkompatiblen Patienten wurde die Blutgruppenantigenexpression in nahezu allen Endothelzellen identifiziert (Tanabe et al., 2011).

Die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe sind der in meiner Arbeit untersuchten Theorie am ähnlichsten. Dieses Ergebnis würde die These, dass die Blutgruppenantigenmenge über die Zeit kontinuierlich abnimmt am ehesten unterstützen und als ein Mechanismus, der das Phänomen der Akkommodation erklären könnte, dienen. Andererseits muss man feststellen, dass der Untersuchungszeitpunkt der ersten Biopsie recht spät gewählt wurde, denn Akkommodation soll sich laut Literaturangaben innerhalb von 14 Tagen etablieren. Hier wurden erste Biopsien aber erst nach vier Wochen entnommen. In meiner Arbeit wurde deshalb nur der Zeitraum von 14 Tagen beobachtet anhand des Modells der HUVEC, inkubiert in blutgruppenfremden humanem Serum. Aber wir haben die HUVEC nicht über diesen Zeitraum hinaus weiter beobachtet. Die Arbeitsgruppe von Tanabe et al. stellte fest, dass nach drei Monaten noch 91,3% der Blutgruppenantigene exprimiert sind. Die Immunfluoreszenz, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurde, erlaubt nur semiquantitative Aussagen. Man hätte also den Beobachtungszeitraum etwas länger wählen können. Dagegen

spricht jedoch, dass bereits nach 14 Tagen ein deutlich erkennbares Absterben der kultivierten HUVEC auftrat. Die Frage ist aber, ob es sich wirklich nur um eine Reduktion der Blutgruppenantigenmenge handelt, die das Auftreten der Akkommodation erklären kann. Denn eine Abnahme von nur 9% innerhalb von drei Monaten und vermutlich noch viel weniger innerhalb von 14 Tagen, kann nicht wirklich ausreichend sein, um eine Blutgruppenantigen-Antikörper-Reaktion derart zu vermindern, dass eben keine Abstoßung auftritt. Daher müssen noch andere Mechanismen involviert sein in den Prozess zur Entwicklung der Akkommodation. Möglicherweise ändert sich eben nicht nur die Blutgruppenantigenmenge, sondern auch die Funktion dieser Antigene. Vielleicht sind es auch nur minimale molekulare Veränderungen innerhalb der Blutgruppenantigene, die dazu führen, dass die Blutgruppenantikörper nur noch schwach an die entsprechenden Antigene binden können und infolge dieses Funktionsverlustes wird auch die Menge der Blutgruppenantigene über einen längeren Zeitraum hinweg reduziert.

#### **5.5. Bedeutung der Blutgruppen-Glycosyltransferasen im Kontext der Akkommodation**

Um die Untersuchungen der Immunfluoreszenz quantitativ untermauern zu können, wurde ein ELISA genutzt, der eine indirekte Aussage über die Menge der Blutgruppenantigene zulässt - indirekt deshalb, weil dieser ELISA die Aktivität der Blutgruppentransferase misst und damit eine Aussage zulässt über die Menge an Blutgruppenantigenen, die noch produziert werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde speziell die Blutgruppe-A-Antigen-Transferase untersucht. Eine geringere Aktivität der Blutgruppe-A-Transferase bedeutet, dass weniger Blutgruppe-A-Antigen produziert werden müsste. Das verwendete Glycosyltransferase-Aktivitäts-Kit wurde von der Firma R&D Systems entwickelt. Es handelt sich dabei jedoch um ein unspezifisches Kit, denn es sind etwa 90 Glycosyltransferase-Familien bekannt. Durch Verwendung spezifischer Substrate kann dieses Kit jedoch die Aktivitäten spezieller Glycosyltransferasen darstellen. Bisher wurden zur Untersuchung der Aktivität bestimmter Blutgruppen-Glycosyltransferasen Methoden mit radioaktiv-markierten Kohlenhydraten genutzt. Dies war recht aufwendig, sodass dieses neue Kit eine elegante und schnelle Methode zur Aktivitätsmessung darstellt. Ein weiterer Vorteil war die hohe Spezifität der verwendeten *Coupling Phosphatase*, sodass die Menge des detektierten Phosphats als direkt proportional zur Menge der produzierten Antigene angenommen werden konnte (Wu et al., 2010). Allerdings wurden in dieser Arbeit lediglich relative Werte der Aktivität ermittelt, da die Möglichkeit zur eigenständigen Isolation einer Blutgruppentransferase nicht bestand und eine

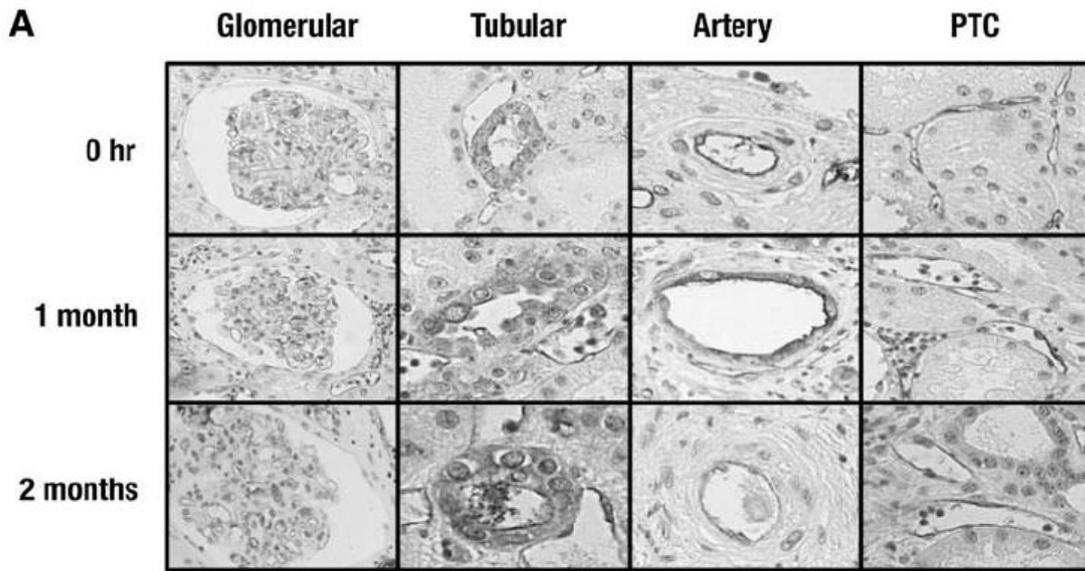
solche auch nicht kommerziell verfügbar war. Es fehlte also eine absolute Kontrolle in Form einer rein isolierten Blutgruppe-A-Transferase, welche als Bezugswert genutzt werden konnte. Aber dennoch war diese relative Methode zur Ermittlung einer Aussage bezüglich der Aktivitätsänderung der Blutgruppentransferase über 14 Tage ausreichend. Eine signifikante Abnahme der Blutgruppe-A-Transferase-Aktivität konnte nicht dargestellt werden. Lediglich bei der Inkubation in humanem Serum der Blutgruppe 0 war eine Tendenz zur Abnahme der Aktivität dieses Enzyms zu erkennen. Hätte man den Beobachtungszeitraum etwas länger gewählt, hätte man diese Tendenz möglicherweise bestätigen können. Bei der Inkubation in humanem Serum der Blutgruppe B war an Tag sieben und 14 eine nahezu konstant gebliebene Aktivität zu erkennen. Lediglich bei der Untersuchung der 1. Zelllinie HUVEC ergab sich nach sieben Tagen eine Zunahme der Aktivität und nach 14 Tagen eine Tendenz zur Abnahme der Aktivität der Blutgruppe-A-Transferase. Eine Erklärung dafür hätte man beispielsweise darin sehen können, dass durch die neue Umgebung des Transplantats im Körper (hier modellhaft HUVEC) mit Blutgruppe B, als Gegenregulationsmechanismus des Transplantats (HUVEC) zunächst die Blutgruppe-A-Transferaseaktivität hochreguliert wird, um dann über die Zeit dennoch abzunehmen, da das Glycosyltransferasensystem des Empfängers (hier modellhaft: Serum der fremden Blutgruppe) sich durchsetzt. Einen solchen Verlauf konnten wir jedoch nur in einer von drei verwendeten Zelllinie finden. Dieser Mechanismus wäre auch für die Inkubation in humanem Serum der Blutgruppe 0 denkbar gewesen, war aber so auch wieder nur in der 1. Zelllinie nachweisbar. Die anderen beiden Zelllinien reagierten nicht in dieser Art und Weise. So zeigte sich in der 2. Zelllinie bei der Inkubation in den blutgruppeninkompatiblen Seren eine kontinuierliche Abnahme der Blutgruppen-Transferaseaktivität. Nun ist es aber auch denkbar, dass nicht nur die Blutgruppen-Transferasen selbst an diesem Prozess beteiligt sind, sondern eventuell auch andere bisher unbekannte Mechanismen. Dies könnten Mechanismen in der Regulation der Expression der Blutgruppentransferasen sein. Einige Gene könnten dabei so konzipiert sein, dass sie auf die Inkubation in fremdem Serum mit einer zunächst vermehrten Expression der Blutgruppen-Transferasen reagieren um den Einfluss dieser blutgruppenfremden Substanz zu vermindern. Auf der anderen Seite könnte es dann wiederum solche Gene geben, die sofort supprimiert werden unter dem Einfluss eines blutgruppenfremden Serums und daher sofort weniger Blutgruppen-Transferasen produzieren. Aber dies sind nur Theorien, die ggf. durch die Untersuchung weiterer HUVEC-Zelllinien verfolgt und verifiziert werden könnten. Die

HUVEC wurden, nachdem ihre Blutgruppen per TaqMan® bestimmt wurden, zunächst in flüssigem Stickstoff gelagert. Dabei wurden die drei untersuchten Zelllinien zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht. Zuerst genutzt wurde die 1. Zelllinie, die nur ein paar Wochen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurde, währenddessen die 3. Zelllinie mehrere Monate dort aufbewahrt wurde. Es ist also nicht ganz auszuschließen, dass die Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff einen negativen Einfluss auf die Expression der Blutgruppen-Glycosyltransferasen und die Blutgruppenantigenproduktion hat. Dies könnte also eine mögliche Fehlerquelle im Rahmen dieser Experimente sein. Um diesen Fehler zu vermeiden, müsste man versuchen, die Zellen direkt nach der Isolation aus humanen Nabelschnurvenen und Bestimmung der Blutgruppe weiter zu kultivieren und damit die Messungen unabhängig von der Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff durchführen. Über die Beeinflussbarkeit der Expression der Blutgruppen-Glycosyltransferasen und der Blutgruppenantigenproduktion durch Lagerung in flüssigem Stickstoff gibt es bisher keine Untersuchungen in der Literatur.

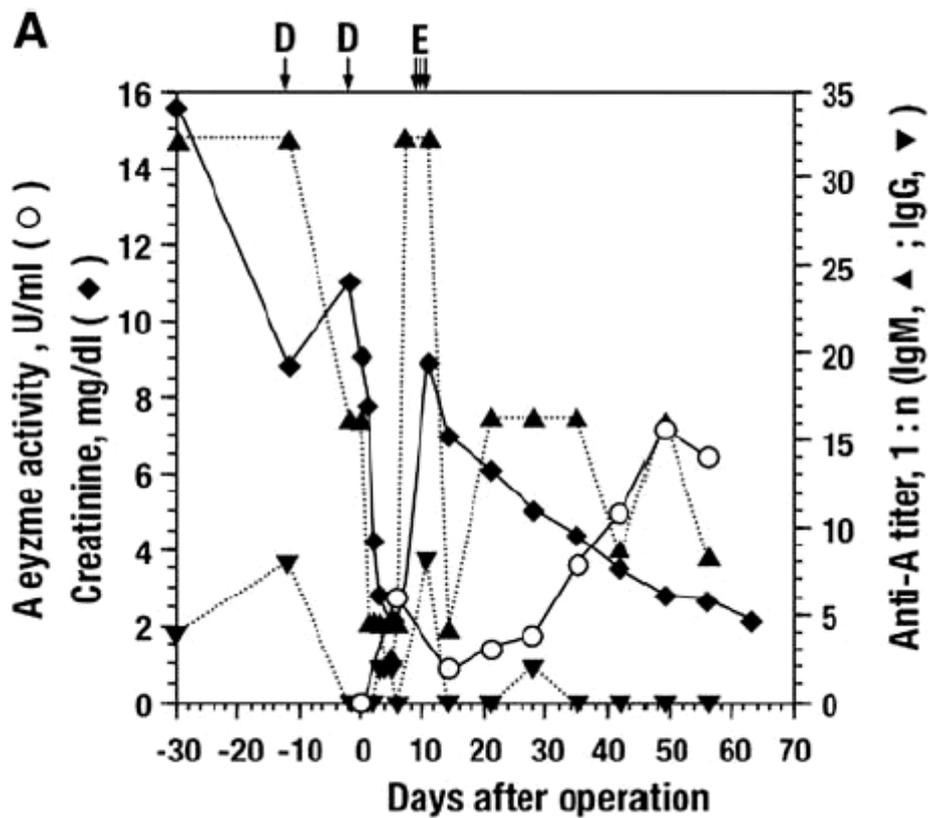
Mit der Untersuchung der Glycosyltransferase-Aktivität haben sich nach unserer Kenntnis noch nicht viele Arbeitsgruppen beschäftigt. Die Arbeitsgruppe um Yoshida et al. (1980) beschäftigte sich beispielsweise mit der Blutgruppentransferaseaktivität nach Knochenmarktransplantationen. Behandelt wurden hierbei Patienten mit akuter Leukämie oder aplastischer Anämie. Ihr Knochenmark wurde komplett durch das Knochenmark eines blutgruppeninkompatiblen Spenders ersetzt. Hier wurde eine Methode verwendet, die radioaktiv-markierte Kohlenhydrate verwendet und eine alternative Methode, bei der Erythrozyten der Blutgruppe 0 mit dem Enzym und dem Nukleotid-gebundenen Kohlenhydrat inkubiert wurden und das dabei produzierte Blutgruppenantigen anschließend mittels entsprechender Antikörper nachgewiesen wurde. Das Resultat war eine Veränderung der Blutgruppe des Empfängers zur Blutgruppe des Spenders. Diese Veränderung war komplett abgeschlossen nach 100-120 Tagen und hielt darüber hinaus an. Da hier aber das komplette Knochenmark transplantiert wurde, welches ja den Großteil der Zellen enthält, die die Blutgruppe charakterisieren, war demgegenüber die von den restlichen Geweben des Empfängers produzierte Blutgruppen-Transferase quantitativ unterlegen (Yoshida et al., 1980). Nun handelt es sich natürlich bei dem Knochenmark um das „Hauptorgan“ des blutbildenden Systems, sodass es nicht verwunderlich ist, dass sich die Blutgruppe des Empfängers bei diesem Übermaß an Spenderblutgruppentransferasen verändert hat. Die Niere

ist dem gegenüber nur ein kleines Organ, das ebenfalls Blutgruppenantigene exprimiert und Blutgruppentransferasen produziert. Die Niere ist eines der am besten durchbluteten Organe des menschlichen Körpers. Sie erhält 20% des Herzzeitvolumens (Schmidt et al., 2007). Wenn man nun also davon ausgeht, dass die frisch transplantierte Niere einem solchen Blutfluss ausgesetzt ist, könnte man davon ausgehen, dass auch hier die Blutgruppentransferasen des Empfängers die Überhand gewinnen und die Blutgruppen-Transferase des Spenders supprimieren. Daher wäre zwar hier genau das Gegenteil wie bei der Knochenmarktransplantation der Fall, nämlich die Konversion der Blutgruppe des Transplantats in die Blutgruppe des Empfängers, währenddessen bei Knochenmarktransplantationen das Transplantat die künftige Blutgruppe bestimmt.

Die japanische Arbeitsgruppe um Tasaki et al. (2010) untersuchte die Blutgruppentransferase-Aktivität bei Patienten, die eine blutgruppeninkompatible Nierentransplantation erhielten. Dabei wurde die Blutgruppen-Transferaseaktivität des Transplantats in den Seren und den transplantierten Organen untersucht. Genutzt wurde dabei ein von der Arbeitsgruppe entwickelter ELISA. Ebenso wurde das Vorhandensein von Blutgruppenantigenen in Biopsien dieser Nieren untersucht. Die Aktivität der Blutgruppen-Transferasen wurde dabei eine Woche nach der Transplantation bestimmt. Die Enzymaktivität war dabei sehr niedrig im Vergleich mit einer blutgruppenkompatiblen Kontrollgruppe. Die Enzymaktivität war in den blutgruppenkompatiblen Organen zehn bis 30mal höher als in den blutgruppeninkompatiblen Nieren. Biopsien, die zum Zeitpunkt der Transplantation, sowie ein und zwei Monate danach durchgeführt wurden, zeigten keine immunhistochemisch nachweisbaren Veränderungen der Blutgruppenantigene. Als Beispiel soll aus diesem Artikel ein Fall (Fall 1) aufgegriffen werden. Hier erhielt ein Empfänger der Blutgruppe B ein Spenderorgan der Blutgruppe A<sub>1</sub>O. Dieser Patient unterlag des Weiteren einer akuten Abstoßungsreaktion. Immunhistochemisch konnte das Blutgruppe-A-Antigen über den gesamten Beobachtungszeitraum von zwei Monaten nachgewiesen werden. Bei der Detektion der Enzymaktivitäten verhielt es sich so, dass innerhalb von zehn Tagen nach der Transplantation die Aktivität der Blutgruppe-A-Transferase zunächst anstieg und dann zwischen Tag zehn und 20 abnahm um anschließend erneut anzusteigen. Dieses Ergebnis ähnelt dem der 1. Zelllinie der HUVEC in dieser Arbeit. Allerdings fand hier eine akute Antikörper-gesteuerte Abstoßungsreaktion statt, sodass vermutet wird, dass die Blutgruppentransferasen durch diese Antikörper supprimiert wurden.

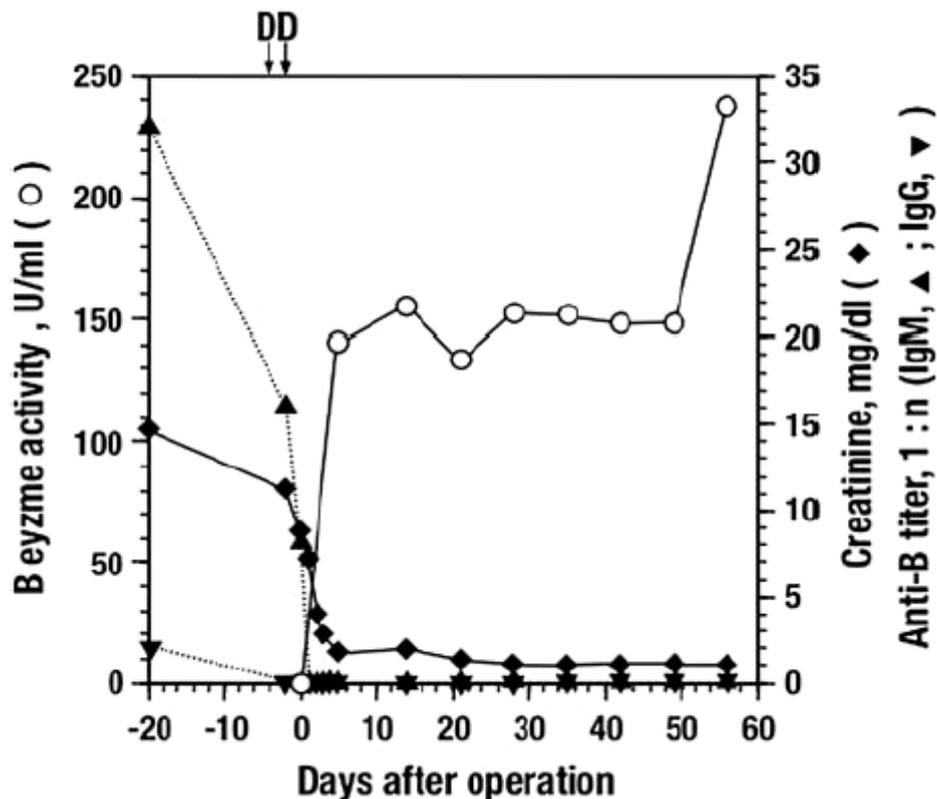


**Abb. 16** Fall 1: Immunhistochemie der Blutgruppe-A-Antigene im Transplantat mit Anti-Blutgruppe-A-Antikörpern nach blutgruppeninkompatibler Nierentransplantation. Die Gewebe wurde präpariert zum Zeitpunkt null und nach ein und zwei Monaten (Tasaki et al., 2010).



**Abb. 17** Fall 1: Antikörpertiter, Serumkreatinin und Blutgruppe-A-Enzym-Aktivität bei einem Patienten mit blutgruppeninkompatibler Nierentransplantation (A<sub>1</sub>O auf B) und akuter Abstoßungsreaktion (Tasaki et al., 2010).

In einem anderen Fall (Fall 2), in dem sich keine akute Abstoßungsreaktion ereignete, fand sich eine etwas andere Situation. Dieser Patient hatte Blutgruppe A<sub>1</sub>O und erhielt ein Transplantat der Blutgruppe B. Die Blutgruppe-B-Enzymaktivität stieg von Tag null zu Tag zehn deutlich an und blieb dann über Tag 20 hinaus auf einem konstanten Level. Daher wurde angenommen, dass bei blutgruppeninkompatiblen Nierentransplantationen, welche ohne Komplikationen verlaufen, die Blutgruppenantigenproduktion unverändert bleibt (Tasaki et al., 2010).



**Abb. 18** Fall 2: Antikörpertiter, Serumkreatinin und Blutgruppe-B-Enzym-Aktivität bei einem Patienten mit blutgruppeninkompatibler Nierentransplantation ohne Komplikationen im Verlauf (Tasaki et al., 2010).

Die Autoren dieses Artikels wiesen aber auch auf frühere Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen hin, die das Vorkommen eines Blutgruppen-Glycosyltransferase-Inhibitors einräumen. In einem Fall konnten sie auch keine Blutgruppen-Transferaseaktivität des Transplantats 14 Jahre nach der Transplantation feststellen. Daher hielten sie es für möglich,

dass in diesem Falle ein Inhibitor der Blutgruppen-Transferase durchaus die Ursache für dieses Ereignis gewesen sein könnte. Sie inkubierten daraufhin die Seren gesunder Probanden mit dem Serum dieses Patienten und stellten fest, dass deren Blutgruppen-Transferaseaktivität durch die Zugabe des Patientenserums aus dem Fall unterdrückt wurde. Die genauen Daten dazu wurden jedoch nicht weiter aufgeführt (Tasaki et al., 2010).

Aufgrund dieser Daten schlussfolgerte die japanische Arbeitsgruppe, dass der Einfluss des Immunsystems auf den Empfänger keinen regulierenden Einfluss auf die Blutgruppenantigene ausübt. Dennoch zeigte das Transplantat im Vergleich zu den Transplantaten bei blutgruppenkompatibler Nierentransplantation viel niedrigere Blutgruppenantigen-Aktivitätswerte. Die Ursache darin erklärten die Autoren mit einer Verdünnung der vom Transplantat sezernierten Blutgruppen-Transferasen im blutgruppenfremden Blut. In diesem Artikel wurde jedoch auch nur von 22 blutgruppeninkompatiblen Transplantationen berichtet, sodass eine endgültige Aussage auch mit diesen Daten noch nicht möglich ist. Es muss auch weiterhin untersucht werden, welcher Natur das Vorkommen der Blutgruppen-Glycosyltransferase-Inhibitoren ist und unter welchen Bedingungen sich solche Antikörper formieren. Jedoch scheint das Vorhandensein eines solchen Inhibitors nicht unbedingt eine Bedingung oder ein Vorteil für das Transplantatüberleben zu sein. Welche Wertigkeit ein solcher Inhibitor also hat, muss noch weiter untersucht werden. Würde es einen Vorteil bedeuten, wäre dies aber eine elegante Methode, die durchaus auch Einzug in den Klinikalltag erlangen könnte. Man könnte Patienten, die eine solche blutgruppeninkompatible Nierentransplantation erhalten sollen mit einem solchen industriell hergestellten Antikörper behandeln und würde dementsprechend eine mögliche Abstoßungsreaktion unwahrscheinlicher machen. Bislang sind dies nur Theorien, die sich zwar in der Zukunft bewahrheiten könnten, aber dennoch weiterer Forschungsarbeit bedürfen.

#### **5.6. Die Rolle des Antigenchimärismus bei der blutgruppeninkompatiblen Nierentransplantation**

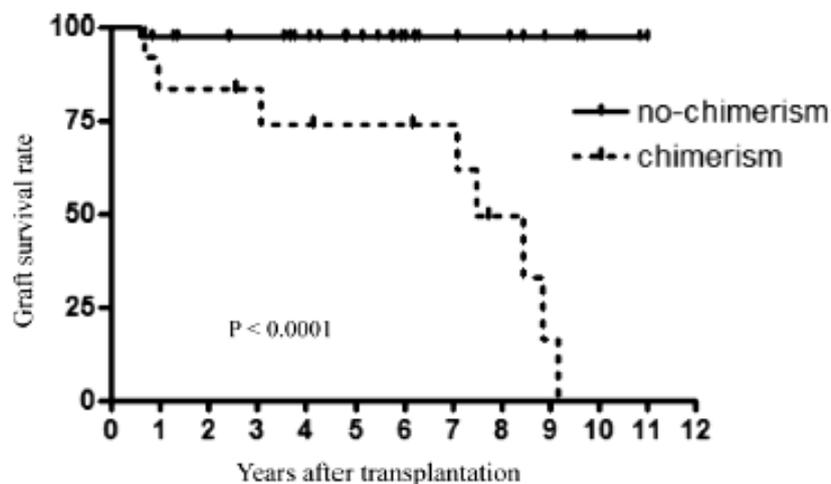
Bei dem Begriff Blutchimärismus handelt es sich um das Vorkommen zweier unterschiedlicher Blutgruppen bei einem Menschen durch den Austausch von erythropoetischen Stammzellen zwischen zweieiigen Zwillingen über Gefäßanastomosen der gemeinsamen Plazenta (Dörner et al., 2004). Nun fragt man sich, was dieser Begriff mit der blutgruppeninkompatiblen Transplantation gemein hat. Der Inhalt der Definition dieses Begriffes wurde in der Literatur von einigen Autoren im Zusammenhang mit der ABO-

inkompatiblen Organtransplantation in entsprechend abgewandelter Form beschrieben. Zum einen kann dies bedeuten, dass die Blutgruppe des Empfängers sich in die Blutgruppe des Transplantats umwandelt, wie bei Knochenmarktransplantationen bereits beschrieben wurde oder aber auch, dass die Blutgruppe des Transplantats die Blutgruppe des Empfängers annimmt. Ein ähnlicher aber vorübergehender Vorgang wurde bei Sepsispatienten beschrieben und dort als „acquired B“ bezeichnet. Auf Grundlage dieser Literaturangaben hielten wir es ebenfalls für möglich, dass sich die Blutgruppenantigene der verwendeten HUVEC unter dem Einfluss des blutgruppenfremden Serums in Richtung der Blutgruppe dieses blutgruppeninkompatiblen Serums umwandeln und damit das Phänomen der Akkommodation erklärt werden kann. Denn wenn sich die Blutgruppenantigene des Transplantats in Richtung der Blutgruppenantigene des Empfängers umwandeln, resultiert daraus folglich eine verminderte Blutgruppenantigen-Antikörper-Reaktion, obwohl dies eine Abweichung von der eigentlichen Definition des Begriffes der Akkommodation bedeuten würde. Denn bei der Akkommodation heißt es, dass trotz des Vorhandenseins konkurrierender Blutgruppenantigene und -antikörper zu keiner Abstoßungsreaktion kommt. Aber es wäre auch denkbar, dass zunächst nur ein Teil der vorhandenen Blutgruppenantigene sich in die Blutgruppenantigene des Empfängers umwandelt und damit eine verminderte Blutgruppenantigen-Antikörper-Reaktion erklärbar wäre. In dieser Arbeit konnte ein solcher Effekt aber nicht nachgewiesen werden. Dafür wurde die Immunfluoreszenzfärbung genutzt. Die HUVEC der Blutgruppe A<sub>1</sub>O, die in humanem Serum der Blutgruppe B inkubiert wurden, wurden nach sieben und 14 Tagen mittels Anti-Blutgruppe-B-Antikörper gefärbt. Hier ergab sich jedoch kein Signal. Bei der Inkubation der HUVEC in humanem Serum der Blutgruppe O wurde jedoch nicht auf den direkten Nachweis der Blutgruppe-H-Antigene mittels Anti-Blutgruppe-H-Antikörper zurückgegriffen, sondern es wurde davon ausgegangen, dass wenn es zu einem Ersatz der Blutgruppe-A-Antigene durch Blutgruppe-H-Antigene kommt, eine Signalabschwächung bzw. der Verlust des Signals unter der Färbung mit dem Anti-Blutgruppe-A-Antikörper resultieren müsste. Natürlich lässt sich dann nicht feststellen, ob möglicherweise ein Teil der Blutgruppenantigene bereits durch Blutgruppe-H-Antigene ersetzt wurde.

Die Arbeitsgruppe um Tanabe et al. (2012) befasste sich mit dem Thema des sogenannten Endothelchimärismus nach blutgruppeninkompatibler Nierentransplantation. Dort wurde dieser Sachverhalt definiert als ein gleichzeitiges Vorkommen von vom Empfänger

stammenden Endothelzellen im Spenderorgan. In diesem Artikel wird auch erwähnt, dass dieser Chimärismus auch im Rahmen anderer Transplantationen untersucht wurde, wie beispielsweise von Leber, Lunge und Herz. Als Ursache dafür wurde von Medawar et al. in den 60er Jahren vermutet, dass die Anpassung eines Transplantats an den Empfänger durch den Ersatz der Transplantat-Endothelzellen durch Zellen des Empfängers bewirkt werden könnte und sich dadurch die Blutgruppenantigenmenge reduzieren könnte (Medawar et al., 1965 und Tanabe et al., 2012). An dieser Stelle wäre auch die Verbindung zum Aufkommen der Akkommodation einzuordnen, denn die reduzierte Blutgruppenantigenzahl korreliert ebenso mit einer verminderten Blutgruppenantigen-Antikörper-Reaktion. Im Artikel dieser Arbeitsgruppe wird das Resultat aus der immunhistochemischen Färbung der Blutgruppenantigene dargestellt von 49 blutgruppeninkompatiblen Nierentransplantationen über einen Zeitraum von einem Monat bis 226 Monate nach der Transplantation. 12 dieser 49 Patienten wiesen den Endothelchimärismus auf. Wiederum acht dieser 12 Transplantate wurden in der Folgezeit abgestoßen. Die Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass dieser Chimärismus in Organen, die einer akuten oder chronischen Abstoßungsreaktion unterlagen, signifikant mehr vorkam. Ebenso kam in den Transplantaten, die den Endothelchimärismus aufwiesen eine signifikant höhere Rate an Glomerulonephritis, interstitieller Fibrose und Tubulusatrophie vor. Das Transplantatüberleben im Allgemeinen war unter der Entwicklung eines Chimärismus signifikant geringer mit 83,3% nach drei Jahren im Vergleich zu solchen Organen, die einen solchen nicht entwickeln, mit 97,1%. Nach acht Jahren sind diese Unterschiede noch viel eindrucksvoller mit nur 46,3% in der Chimärismus-Gruppe und 97,1% in der Vergleichsgruppe. Hier wird auch eine Assoziation zwischen der Verwendung von Calcineurin-Inhibitoren und der Entwicklung des Endothelchimärismus vermutet. Hierbei wird vermutet, dass im Rahmen einer toxischen Wirkung der Calcineurin-Inhibitoren eine Vasokonstriktion der afferenten Arteriolen verursacht wird. Außerdem inhibieren die Calcineurin-Inhibitoren die Stickstoffmonoxid-Synthese und damit auch die durch Stickstoffmonoxid-vermittelte Vasodilatation. Sie vermuten, dass dieser Mechanismus zur Ausbildung des Chimärismus führen könnte. Ein weiterer darin verwickelter Mechanismus könnten auch zirkulierende Endothel-Progenitorzellen sein, die vom Empfänger stammen und die geschädigten Spenderzellen ersetzen. Diese These wird auch unterstützt durch das hauptsächliche Vorkommen des Endothelchimärismus in beschädigten Transplantaten. Aufgrund dieser Resultate müsste man annehmen, dass das Auftreten des

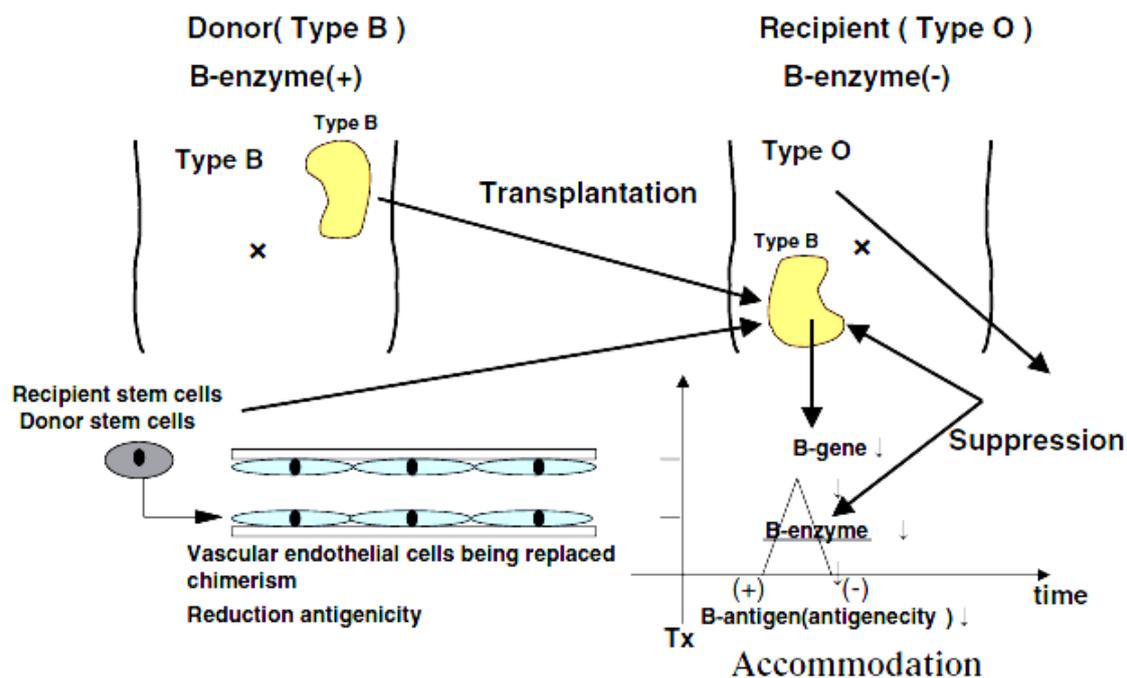
Endothelchimärismus mit einem negativen Ausgang für das Transplantat verbunden ist. Eine andere Gruppe um van Poelgeest et al. wiederum konnte einen solchen negativen Einfluss des Endothelchimärismus auf das Überleben des Transplantats nicht nachweisen (van Poelgeest et al., 2005 und Tanabe et al., 2012). Im Rahmen der Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Tanabe et al. (2012) müsste man also schlussfolgern, dass ein solcher Endothelchimärismus eher weniger zu den Ursachen der Akkommodation gehört. Denn Akkommodation wird in der Literatur nicht mit dem Vorkommen eines verminderten Transplantatüberlebens gesehen.



**Abb. 19** Transplantatüberleben beim Auftreten von Chimärismus (Tanabe et al., 2012).

Auch in den bereits vorgestellten Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Tanabe et al. ein Jahr zuvor (2011) wurde ein Fall dieses Chimärismus beschrieben. Auch hier wurde die These beschrieben, dass es zu einem Ersatz geschädigter Endothelzellen und damit auch Spenderblutgruppenantigene durch Stammzellen des Empfängers kommt, die sich dort zu Endothelzellen differenzieren und Empfängerblutgruppenantigene exprimieren. Begünstigt wird diese Entwicklung auch durch eine akute Antikörper-vermittelte Abstoßungsreaktion, die die Endothelzellen schädigt und damit den Weg für die Ausbildung des Chimärismus ebnet (Tanabe et al., 2011).

In früheren Arbeiten wurde dieses Phänomen nicht als ein negatives Ereignis bewertet, sondern als eine mögliche Ursache bei der Entwicklung der Akkommodation angenommen. Man ging davon aus, wenn das Transplantat die Blutgruppe des Empfängers annehmen würde, könnten keine Komplikationen auftreten (Takahashi et al., 2005).

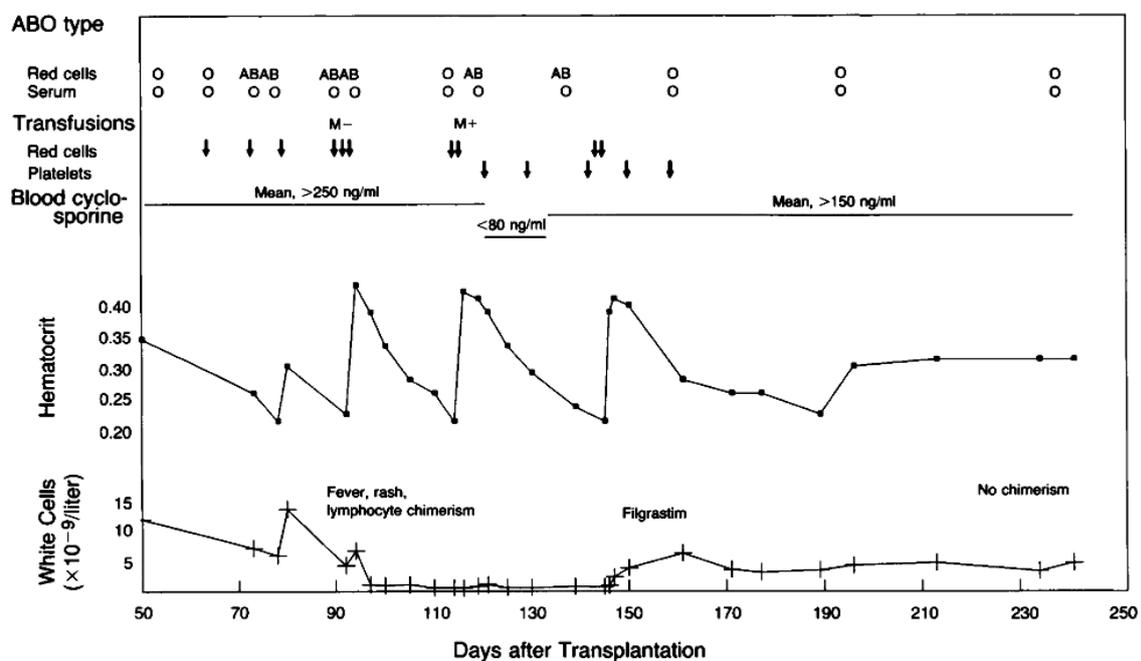


**Abb. 20** ABO-inkompatible Nierentransplantation eines Blutgruppe-B-Spenders in einen Empfänger der Blutgruppe 0 (Takahashi et al., 2005).

Koestner et al. (2004) beobachteten eine Veränderung der Blutgruppenantigene im Rahmen einer blutgruppeninkompatiblen Herztransplantation. Ein 19-jähriger herzkranker Mann der Blutgruppe 0 erhielt ein Spenderorgan der Blutgruppe B. In regelmäßigen Abschnitten wurde die Blutgruppenantigenexpression des Transplantats mittels Biopsie und anschließender Immunhistochemie überprüft. Nach 14 Monaten waren sowohl Blutgruppe-H- als auch -B-Antigene nachweisbar und nach 36 Monaten war nur noch das Blutgruppe-B-Antigen nachweisbar. Der Patient starb fünf Jahre nach der Transplantation an einer Transplantatvaskulopathie (Koestner et al., 2004). Dieses Ereignis würde wiederum die negativen Überlebensraten eines Transplantats nach der Ausbildung eines Endothelchimärismus unterstützen.

Comenzo et al. (1992) berichteten über eine blutgruppeninkompatible Lebertransplantation bei einem fünf Jahre alten Jungen, der dieses Organ aufgrund einer fulminanten Hepatitis erhielt. Der Junge hatte Blutgruppe 0 und erhielt eine Leber der Blutgruppe AB. Nach der Transplantation stellte sich bei dem Jungen zunächst ein komplizierter Verlauf dar mit Sepsis und der Ausbildung eines subhepatischen Abszesses. Bei einer Untersuchung der Blutgruppe des Jungen an Tag 66 wurde noch seine ursprüngliche Blutgruppe detektiert, währenddessen an Tag 73 die Blutgruppe AB detektiert wurde. Das bedeutet, dass in diesem Falle das

Transplantat die Blutgruppe des Empfängers verändert hat, wie es zuvor in Arbeiten bei blutgruppeninkompatiblen Knochenmarktransplantationen beschrieben wurde. Zwischen Tag 112 und 120 wies der Patient wiederum seine ursprüngliche Blutgruppe auf, die sich dann wieder in Blutgruppe AB umformierte. Nach Tag 160 behielt er dann endgültig seine ursprünglich vorhandene Blutgruppe O. Als Ursache für dieses Phänomen vermuteten die Autoren, dass Blutgruppe-A- und B-Antigene auch mit Hilfe von Blutgruppe-A und -B-Substanzen adsorbiert werden können, die sich frei im Plasma sogenannter „Sekretoren“ befinden (Comenzo et al., 1992). Aber auch hier spielten Komplikationen für die Blutgruppenantigenveränderung eine Rolle, nämlich in diesem Fall inflammatorische Prozesse.



**Abb. 21** Klinischer Verlauf des lebertransplantierten Jungen (Comenzo et al., 1992).

Der Einfluss von Entzündungsreaktionen auf Blutgruppenantigene wurde auch im Rahmen des Phänomens des „acquired B“ beschrieben. Erstmals wurde dieses Ereignis durch Cameron et al. (1959) beschrieben. Im Unterschied zum Endothelchimärismus handelt es sich hier jedoch um einen reversiblen Vorgang, der bisher nur bei Patienten der Blutgruppe A<sub>1</sub> beschrieben wurde. Unter dem Einfluss einer bakteriellen Deacetylase wird das N-Acetylgalactosamin, welches das Blutgruppenantigen-bestimmende Kohlenhydrat darstellt, in Galactosamin umgewandelt. Das Galactosamin ist dabei dem Galactose-Rest, wie er beim Blutgruppe-B-Antigen vorkommt, ähnlich und stellt damit ein neu erzeugtes Pseudo-Blutgruppe-B-Antigen dar. Dadurch wird eine Veränderung der Blutgruppe A des Empfängers

zur Blutgruppe B vorgetäuscht, woraus der Name „acquired B“ resultiert. In diesem Artikel wurde auch das Ergebnis einer anderen Arbeitsgemeinschaft um Stayboldt et al. (1987) erwähnt. Hier wurde durch das Versetzen von Erythrozyten der Blutgruppe A<sub>1</sub> mit Patientenserum in vitro ein Pseudo-Blutgruppe-B-Antigen erzeugt. In dem Artikel von Riess et al. (1988) wurde die Historie eines 50-jährigen Mannes mit akuter myelomonozytärer Leukämie beschrieben, der aufgrund einer pulmonalen Infektion einschließlich der Ausbildung eines Lungenabszesses ein solches Pseudo-Blutgruppe-B-Antigen entwickelt hat. Mikrobiologisch ergab sich der Nachweis von *Bacillus cereus*. Nach antimikrobieller Therapie verschwand das Pseudo-Blutgruppe-B-Antigen wieder (Riess et al., 1988).

1983 wurde bereits ein Fall des „acquired B“ beschrieben, in dem die Ursache keine Infektion war, sondern ein Magenkarzinom. Eine 61-jährige Japanerin litt dabei unter einem Adenokarzinom des Magens und entwickelte im Verlauf ihrer Erkrankung einen durch Metastasen verursachten Ileus. Erythrozyten der Blutgruppe A<sub>1</sub> wurden mit dem Serum dieser Patientin inkubiert. Dabei konnte aber kein Blutgruppe-B-Antigen nachgewiesen werden. Man vermutete, dass die Aktivität der Deacetylase zu diesem Zeitpunkt möglicherweise nicht stark genug war um ein solches zu produzieren (Matsushita et al., 1983).

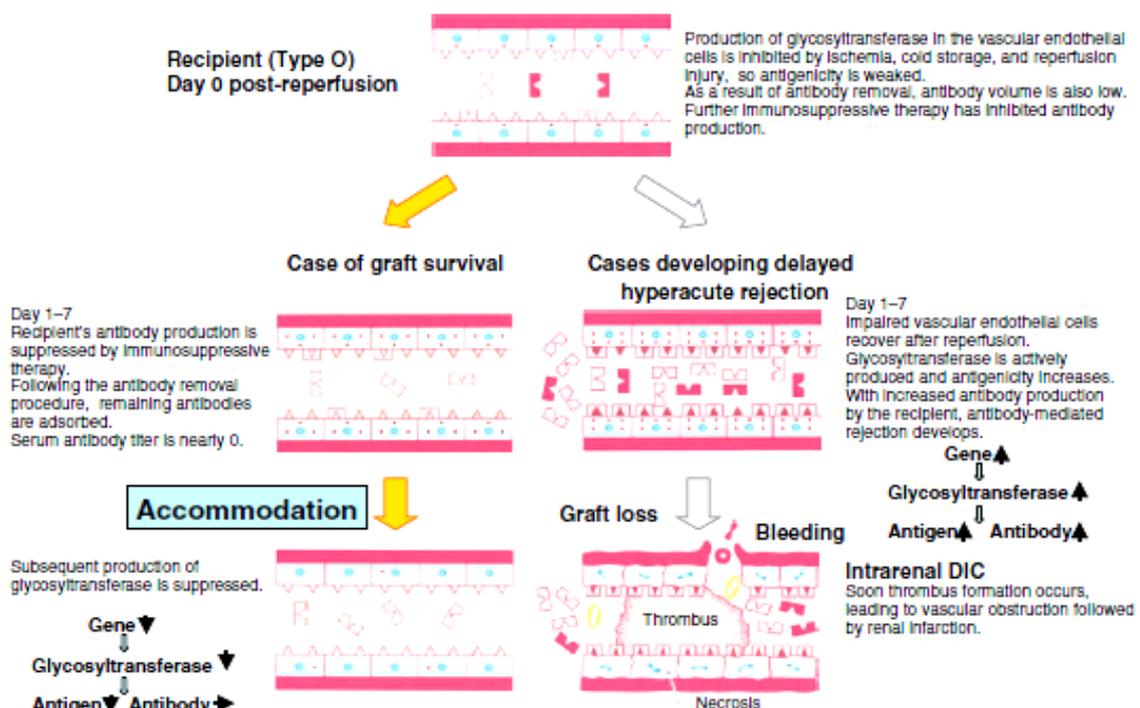
Amerikanische Forscher konnten in den 80er Jahren ein Enzym aus Kaffeebohnen extrahieren, welches die Fähigkeit besitzt eine Reaktion zu katalysieren, die Blutgruppe-B-Antigene von Erythrozyten entfernt (Hohmann et al., 2007). In der Pflanzenwelt und dem Tierreich gibt es einige Organismen, die Blutgruppenverwandte Substanzen produzieren können (Takahashi et al., 2013). Auch eine dänische Arbeitsgruppe beschäftigte sich mit solchen Substanzen und entdeckten ein Blutgruppe-B-Antigen-entfernendes Enzym, welches in *Bacteroides fragiles* vorkommt. Es handelt sich dabei um ein hauptsächlich im Darm vorkommendes Bakterium. Ein Blutgruppe-A-Antigen-entfernendes Enzym konnte ebenfalls entdeckt werden in dem Bakterium *Elizabethkingia meningosepticum*. Die Forscher erhoffen sich ein pharmakologisches Mittel zu finden, um eine Art von „Universalblut“ zu entwickeln (Hohmann et al., 2007). Aber nicht nur im Bereich der Transfusionsmedizin könnten diese Enzyme von Nutzen sein, sondern auch bei der blutgruppeninkompatiblen Transplantation. Würde man das Transplantat mit einem solchen Enzym behandeln, wäre die Menge an Antigenen reduziert und damit auch das immunologische Risiko z.B. einer Rejektion für den Empfänger. Dies könnte zusätzlich zur Akkommodation ein weiterer protektiver Faktor für das Transplantat darstellen.

## **5.7. Spekulationen und Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zur Akkommodation**

Der Begriff der Akkommodation ist nun bereits seit mehr als 20 Jahren bekannt und wurde erstmals bei blutgruppeninkompatiblen Nierentransplantationen beschrieben. Natürlich ist dieses Phänomen nicht nur den Nieren vorbehalten, sondern findet sich durchaus auch in anderen ABO-inkompatibel transplantierten Organen. Welche Ursachen dieses Ereignis hat, bleibt weitgehend unbekannt. Jedoch existieren eine Vielzahl von Theorien dazu. Die Definition des Begriffes besagt, dass es sich um das gleichzeitige Auftreten von Blutgruppenantigenen und -antikörpern handelt, ohne das Zustandekommen einer Interaktion zwischen diesen beiden Partnern und folglich auch einem Fehlen einer Abstoßungsreaktion. Das würde bedeuten, dass das Immunsystem an dieser Stelle überlistet wird. Jedoch darf der Begriff der Akkommodation nicht fälschlicherweise gleichgesetzt werden mit dem Begriff immunologische Toleranz. Akkommodation unterscheidet sich von dieser durch die beibehaltene Fähigkeit des Immunsystems frisches Gewebe des gleichen Spenders abzustößen, sobald jedoch dieses Gewebe „akkommodiert“ wurde, bleibt es geschützt vor dem Immunsystem (Lynch et al., 2010).

Eine Ursache wurde in dieser Arbeit schon mehrfach beschrieben, nämlich dass die Blutgruppenantigene der Schlüssel zur Akkommodation sind. Da der Sachverhalt der Blutgruppenantigene bereits in der Diskussion ausführlich dargestellt wurde, soll hier nur kurz darauf eingegangen werden. Im Rahmen dieser These wird vermutet, dass die Blutgruppenantigene quantitativ vermindert werden oder auch eine qualitative Veränderung stattfindet. Die Ergebnisse vieler Arbeitsgruppen bezüglich einer quantitativen Veränderung sind recht uneinheitlich. Einige Arbeitsgruppen konnten eine Verminderung der Blutgruppenantigene über einen gewissen Zeitraum beobachten, andere wiederum haben keinerlei Veränderung feststellen können, wie im vorigen Teil dieser Arbeit bereits beschrieben. Eine qualitative morphologische Veränderung der Blutgruppenantigene wäre auch denkbar, denn wenn die Bindungsstelle der Blutgruppenantigene für die Antikörper geringfügigen molekularen Veränderungen unterlegen ist, sodass die Affinität der Blutgruppenantikörper für diese Bindungsstellen abnimmt, wäre dies eine mögliche Erklärung für eine fehlende Blutgruppenantigen-Antikörper-Reaktion (Lynch et al., 2008). Doch wie bereits weiter oben beschrieben, konnte etwas Derartiges bis jetzt noch nicht definitiv nachgewiesen werden. Yuzawa et al. (1995) zeigten eine mögliche Modulation von Glycoprotein- und Glycolipid-Antikörpern und vermuteten, dass hier die Ursache für

Akkommodation zu finden ist. Andere Autoren konnten eine Veränderung der Stärke der Blutgruppenantigen-Antikörper-Interaktion jedoch nicht feststellen (Wen Ding et al. 2007). Eine sehr umfangreiche Arbeit zum Thema Akkommodation wurde von Takahashi et al. (2005) angefertigt. Hier wurde ein Modell beschrieben. Bei der Transplantation unterliegt das Spenderorgan einer Ischämiezeit. In dieser Zeit kommt es zu Schäden des Gefäßendothels, was darin resultiert, dass die Blutgruppen-Glycosyltransferasen in dieser Zeit außer Kraft gesetzt sind. Die Blutgruppenantikörperproduktion des Empfängers wird durch die hochdosierte immunsuppressive Therapie zu diesem Zeitpunkt unterdrückt. Nach der Einleitung der Reperfusion kommt es ebenfalls zu einem sogenannten „Reperfusionsschaden“ des Endothels. Daher kommt es zu einer vorübergehenden Abnahme der Blutgruppen-Transferaseaktivität und –produktion. Anschließend wird die Produktion dieser Enzyme durch Stimulation der entsprechenden Gene wiederaufgenommen und die Aktivität nimmt wieder zu. Ab diesem Zeitpunkt kann das Enzym auch im Blut des Empfängers nachgewiesen werden. Daher steigt die Blutgruppenantigenproduktion innerhalb einer Woche nach der Transplantation auch an. In dieser Zeit ist es nun wichtig eine effektive immunsuppressive Therapie durchzuführen um eine Blutgruppenantigen-Antikörper-Reaktion zu inhibieren. In dieser Zeit entwickelt der Körper des Empfängers nun die Fähigkeit die Blutgruppen-Glycosyltransferasen zu inhibieren, sodass weniger Blutgruppenantigene produziert werden können und die Akkommodation eingeleitet wurde (Takahashi et al., 2005).



**Abb. 22** Eine Spenderniere Blutgruppe B wird in einen Empfänger der Blutgruppe 0 transplantiert (Takahashi et al., 2005).

Einen weiteren Angriffspunkt stellen die Blutgruppenantikörper dar. So wäre es denkbar, dass sich die Funktion und Struktur dieser Antikörper, ähnlich wie es bei den Blutgruppenantigenen vermutet wird, verändert in der Art, dass sie nur noch schwach oder auch gar nicht an die Bindungsstellen der Blutgruppenantigene binden und eine Abstoßungsreaktion ausbleibt (Lynch et al., 2008). Galili et al. (2006) berichteten, dass sie die Ursache für Akkommodation in der Entstehung von veränderten Blutgruppenantikörpern durch B-Lymphozyten vermuten. Diese Veränderung soll dadurch zustande kommen, dass die B-Zellen in Abwesenheit von T-Helferzellen stimuliert werden und dadurch eine Art Blutgruppenantikörper entstehen, die zwar an die Blutgruppenantigene binden, jedoch das Transplantat nicht schädigen (Galili et al., 2006). Andere Arbeitsgruppen ließen diese Theorie jedoch fallen, da sie keinen Beweis dafür in ihren Versuchen finden konnten (Lynch et al., 2008).

Andere Autoren vermuten eher eine Veränderung in den Signalwegen des Transplantats selbst. In vielen Arbeiten wurde die Rolle der Ablagerung von C4d ohne Zeichen für eine Abstoßungsreaktion in den Transplantaten beschrieben. Die Ablagerung von Komplement geht mit einer intakten Antikörper-Bindung einher. Jedoch ist es verwunderlich, dass es nicht zu einer Lyse der Zellen und damit zu einer Zerstörung und Abstoßung in diesem Kontext kommt. Dementsprechend wird ein bestimmter intrazellulärer Signalweg als Ursache für das Auftreten von Akkommodation vermutet (Lynch et al., 2010). Iwasaki et al. (2010) zeigten in ihren Versuchen mit humanen Aortenendothelzellen, dass sobald Anti-HLA-Klasse I-Antikörper an diese binden eine Art Schutz vor der Komplement-induzierten Lyse besteht. Sie vermuteten, dass dieser Prozess auf Genebene induziert wird (Iwasaki et al., 2010). Die Expression solcher protektiver Gene wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben. Diese Gene würden die Apoptose beispielsweise inhibieren (Hancock et al., 1998). Aber wiederum andere Autoren konnten solche protektiven Gene in blutgruppeninkompatiblen transplantierten Organen nicht nachweisen. So nutzte man beispielsweise 16 blutgruppeninkompatible Transplantate und untersuchte den Einfluss der protektiven Gene HO-1, Bcl-2, Bcl-xl und Bax auf ihre Akkommodation-initiiierende Wirkung. Eine Assoziation mit der Ausbildung von Akkommodation konnte aber nicht nachgewiesen werden (Park et al., 2003).

Bei der Transplantation blutgruppeninkompatibler Organe in Kindern wird das Auftreten von Akkommodation nicht unbedingt als wichtigster Grund für das Überleben des Transplantats angesehen. Hier geht man davon aus, dass eine Art von B-Zell-Toleranz der Hauptmechanismus dafür ist. Die Ursache liegt in der Unreife des Blutgruppensystems bei Kindern, denn die Antikörperproduktion gegen Blutgruppe-A- bzw. B-Antigene entwickelt sich bei Kindern erst im Laufe der Zeit. Daher entwickeln die Kinder, meistens noch Säuglinge, eine Spender-spezifische B-Zell-Toleranz (Rose et al., 2012).

Von vielen Autoren wird das Auftreten von Akkommodation als ein positives Ereignis für das Überleben des Transplantats angesehen. Es schützt vor akuter Abstoßung. Aber natürlich kann es nicht nur positive Seiten dieses Phänomens geben, denn genau wie jedes Medikament hat auch die Akkommodation Nebenwirkungen. Denn Akkommodation schützt zwar vor akuten Ereignissen, aber nicht vor chronischen. Möglicherweise könnten sich die Mechanismen, die zuvor die Akkommodation eingeleitet haben, später zu einem Schaden des Transplantats führen (Lynch et al., 2010). Smith et al. (2008) berichteten, dass 22% der von ihnen untersuchten Transplantate mehr als 50 Tage nach der Transplantation eine Glomerulopathie entwickelten (Smith et al., 2008). Andere Autoren berichten, dass eine solche Glomerulopathie zum Transplantatverlust führt, sodass geschlussfolgert wurde, dass Akkommodation ein instabiler Status ist, der in eine chronische Nephropathie übergehen kann (Lynch et al., 2010).

Anhand dieser Literaturangaben sieht man, wie weit die Meinungen bezüglich der Bewertung der Akkommodation und auch der Ursachen, die dieses Phänomen bedingen, sich unterscheiden. Man erkennt also, dass noch viel Forschungsarbeit notwendig ist.

## **5.8. Ausblick**

Ich beschäftigte mich in der vorliegenden Arbeit vorrangig mit der Seite der Blutgruppenantigene als Ursache für Akkommodation. Dabei stellen vor allem die Blutgruppen-Glycosyltransferasen interessante und wichtige Angriffspunkte dar. Es wurden folgende Erkenntnisse bezüglich dieser Enzyme gewonnen: Es konnte kein eindeutiger Beweis geführt werden, dass die Blutgruppen-Glycosyltransferasen tatsächlich herunterreguliert werden, aber dass sich Veränderungen vollziehen, konnte gezeigt werden. Wovon genau diese Veränderungen aber abhängen, muss noch weiter untersucht werden. Die Anzahl der Zelllinien könnte noch größer gewählt werden und da hier nur HUVEC der Blutgruppe A untersucht wurden, sollten auch Versuche mit den übrigen Blutgruppen

durchgeführt werden. Möglicherweise könnte man auch anstatt der HUVEC direkt Nierenendothelzellen nutzen. Des Weiteren könnte man den Beobachtungszeitraum länger als 14 Tage wählen. In dieser Arbeit wurde dieser Zeitraum gewählt, da das Auftreten des Phänomens der Akkommodation in der Literatur innerhalb von ein bis zwei Wochen beschrieben wurde. Um eine bessere Tendenz der Veränderung der Blutgruppen-Glycosyltransferasen-Aktivität zu erhalten, wäre möglicherweise ein längerer Zeitraum besser. Wenn es gelänge, zu zeigen, dass die Blutgruppen-Transferasen herunterreguliert werden, wäre das ein enormer Fortschritt im Bereich der blutgruppeninkompatiblen Transplantation. Noch interessanter wäre, das tatsächliche Vorhandensein von Blutgruppen-Glycosyltransferase-Inhibitoren verifizieren zu können, die von einigen Individuen produziert werden. Könnte man diese Mechanismen genauer charakterisieren, so könnte man diese versuchen synthetisch zu imitieren, um ein Medikament herzustellen. Dieses Medikament würde einen bedeutenden Fortschritt im Rahmen der Transplantationsmedizin bedeuten. Mit Hilfe eines solchen Präparats könnte die Verträglichkeit blutgruppeninkompatibler Organe verbessert werden und die Patienten würden weniger mit schädlichen Immunsuppressiva und ihren Nebenwirkungen belastet werden.

## 6 Zusammenfassung

---

Dieser Arbeit liegt das bislang ungeklärte Phänomen der Akkommodation bei ABO-inkompatiblen Nierentransplantationen zugrunde. Akkommodation bedeutet, dass es trotz ABO-Inkompatibilität nicht zu einer Transplantatabstoßung kommt, wenn bis etwa 14 Tage nach Transplantation die entsprechenden Blutgruppenantikörper unterdrückt werden. Nach diesem Zeitraum scheint es keine Rolle zu spielen, ob die Blutgruppenantikörper vorhanden sind.

In der vorliegenden Arbeit gingen wir von der Hypothese aus, dass die in den Endothelzellen des Transplantats exprimierte Blutgruppenantigene eine Hauptrolle in der Entwicklung der Akkommodation spielen. Als Modell für Endothelzellen nutzten wir humane venöse Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) und inkubierten diese über 14 Tage in humanem blutgruppenfremdem Serum, um die Situation einer blutgruppeninkompatiblen Nierentransplantation widerzuspiegeln. Wir testeten die Hypothese, dass nach Inkubation der HUVEC (Blutgruppe A) in blutgruppenfremdem Serum (Blutgruppe 0 und Blutgruppe B) eine Verminderung der Antigenmenge A auf der Oberfläche der Endothelzellen bzw. eine Änderung der A-Blutgruppenantigene der HUVEC hin zur Blutgruppe des fremden Serums (hier: Blutgruppe 0 bzw. B) auftritt. Letzteres konnten wir nicht nachweisen. Eine Verminderung der A-Antigene auf den HUVEC war in der Immunhistochemie nur tendenziell zu erkennen und erreichte keine Signifikanz. Da die Blutgruppenantigene Kohlenhydratstrukturen sind, untersuchten wir anschließend die Glycosyltransferasen, welche an der Produktion der Blutgruppenantigene aus der sog. H-Substanz beteiligt sind. In zwei der drei untersuchten Zelllinien sahen wir eine Aktivitätsminderung der Blutgruppen-Glycosyltransferasen (für das „Spender“-Antigen A) v.a. bei Inkubation in Serum der Blutgruppe 0, über den Zeitraum von 14 Tagen. Dies bedeutet, dass möglicherweise über einen längeren Zeitraum gesehen, die Produktion des A-Antigens abnimmt, wenn die entsprechende Glycosyltransferase in ihrer Aktivität gehemmt wird.

Zur Untersuchung der Antigene und der Glycosyltransferasen im Hinblick auf die Entstehung der Akkommodation findet sich in der Literatur wenig, sodass die vorliegende Arbeit hier einen Beitrag leistet.

Für Folgeversuche wäre die Untersuchung weiterer Zelllinien, auch anderer Blutgruppen, und über einen längeren Zeitraum als 14 Tage denkbar. Weitere Möglichkeiten wären die

Verwendung primärer humaner Endothelzellen aus Nieren und die Gabe von Immunsuppressiva ins Zellkulturmedium.

Es wäre denkbar, dass die Beeinflussung der Antigenexpression auf dem Spenderorgan zu einem Überlebensvorteil transplantierten Patienten führen kann und weitere Forschungsergebnisse zu einer noch besseren Verträglichkeit der blutgruppeninkompatiblen Nierentransplantation führen können. Des Weiteren wäre es von enormem Nutzen, ein Medikament ähnlich der in der Literatur vermuteten Glycosyltransferase-Inhibitoren zu entwickeln, welches zu einer Dosisreduktion der verwendeten Immunsuppressiva und damit ebenfalls zu einer besseren Compliance und einem Überlebensvorteil des Transplantats führen kann.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

---

ABO	Blutgruppensystem
bFGF	Fibroblastenwachstumsfaktor
BSA	Bovine Serum Albumin
CKD-MBD	chronic kidney disease –mineral and bone disorder
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Endothelial Growth Factor
ELISA	Emzyme-linked Immunosorbent Assay
ENTPD3/CD39L3	Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Fuc	Fucose
Gal	Galactose
GalNAc	N-Acetylgalctosamin
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HSA/B/0	humanes Serum der Blutgruppe A/B/0
HUVEC	humane umbilikale venöse Endothelzellen
HLA	humanes Leukozytenantigen
IgG	Immunglobulin G

IgM	Immunglobulin M
MMF	Mycophenolat mofetil
P	Phosphat
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	revolutions per minute
RNA	Ribonukleinsäure
UDP	Uridindiphosphat
UMP	Uridinmonophosphat

## 8 Abbildungsverzeichnis

---

- Abb.1** Patienten- und Transplantatüberlebensraten für ABO-inkompatible Nierentransplantation und historische Kontrollgruppen, welche eine Lebendnierenspende erhielten (Takahashi et al., 2005).
- Abb. 2** Strategie für die immunsuppressive Therapie in der ABO-inkompatiblen Organtransplantation (Takahashi et al., 2006).
- Abb.3** Die Entstehung der Blutgruppenantigene A und B aus dem H-Antigen (GalNAc – N-Acetylgalactosamin, Gal – Galactose, GlcNAc – N-Acetylglucosamin, Fuc – Fucose) (Universitätsmedizin Göttingen, 2008).
- Abb. 4** Schematisches Prinzip der Funktionsweise des TaqMan® zur Blutgruppenbestimmung (Applied Biosystems, 2010).
- Abb. 5** Prinzip des Glycosyltransferase-Aktivität-ELISA der Firma R&D Systems, modifiziert zum Nachweis der Blutgruppe A-Transferase. ENTPD3/CD39L3 = Nukleotidase.
- Abb. 6A** HUVEC nach Zusatz von 2% FBS zum Medium an Tag null (links, Vergrößerung 100fach) und Tag 14 (rechts, Vergrößerung 200fach).
- Abb. 6B** HUVEC nach Zusatz von 2% humanem Serum der Blutgruppe A zum Medium an Tag null (links, Vergrößerung 100fach) und Tag 14 (rechts, Vergrößerung 200fach).
- Abb. 6C** HUVEC nach Zusatz von 1% FBS und 1% humanem Serum der Blutgruppe A zum Medium an Tag null (links, Vergrößerung 100fach) und Tag 14 (rechts, Vergrößerung 200fach).
- Abb. 7A** Lichtmikroskopische Aufnahme der HUVEC, inkubiert in humanem Serum der Blutgruppe A an Tag null, sieben, neun und 14 (Vergrößerung 100fach).
- Abb. 7B** Lichtmikroskopische Aufnahme der HUVEC, inkubiert in humanem Serum der Blutgruppe B an Tag null, sieben, neun und 14 (Vergrößerung 100fach).
- Abb. 7C** Lichtmikroskopische Aufnahme der HUVEC, inkubiert in humanem Serum der Blutgruppe 0 an Tag null, sieben, neun und 14 (Vergrößerung 100fach).
- Abb. 8A** Immunfluoreszenzfärbung der Erythrozyten Blutgruppe A mittels A-Blutgruppenantigen-Antikörper und FITC-markiertem Sekundärantikörper (Vergrößerung 400fach).

- Abb. 8B** Immunfluoreszenzfärbung der Erythrozyten Blutgruppe B mittels B-Blutgruppenantigen-Antikörper und FITC-markiertem Sekundärantikörper (Vergrößerung 400fach).
- Abb. 9A** Immunfluoreszenzfärbung HUVEC Passage sieben der Blutgruppe A mit A-Blutgruppenantigen-Antikörper, FITC-markiertem Sekundärantikörper und Kernfärbung mit DAPI (Vergrößerung 400fach).
- Abb. 9B** Immunfluoreszenzfärbung HUVEC Passage neun der Blutgruppe A mit A-Blutgruppenantigen-Antikörper, FITC-markiertem Sekundärantikörper und Kernfärbung mit DAPI (Vergrößerung 400fach).
- Abb. 9C** Immunfluoreszenzfärbung HUVEC Passage 11 der Blutgruppe A mit A-Blutgruppenantigen-Antikörper, FITC-markiertem Sekundärantikörper und Kernfärbung mit DAPI (Vergrößerung 400fach).
- Abb. 9D** Immunfluoreszenzfärbung HUVEC Passage 11 der Blutgruppe A mit B-Blutgruppenantigen-Antikörper, FITC-markiertem Sekundärantikörper und Kernfärbung mit DAPI (Vergrößerung 400fach).
- Abb. 9E** Immunfluoreszenzfärbung Negativkontrolle HUVEC Passage acht der Blutgruppe A mit FITC-markiertem Sekundärantikörper und DAPI ohne Blutgruppenantigen-Antikörper (Vergrößerung 200fach).
- Abb. 10A** Immunfluoreszenzfärbung der HUVEC Blutgruppe A<sub>1</sub>0 an Tag null mittels A-Blutgruppenantigen-Antikörper, FITC-konjugiertem Sekundärantikörper und DAPI (Vergrößerung 200fach).
- Abb. 10B** Immunfluoreszenzfärbung der HUVEC Blutgruppe A<sub>1</sub>0 nach Inkubation in humanem Serum der Blutgruppe A an Tag sieben mittels A-Blutgruppenantigen-Antikörper, FITC-konjugiertem Sekundärantikörper und DAPI (Vergrößerung 200fach).
- Abb. 10C** Immunfluoreszenzfärbung der HUVEC Blutgruppe A<sub>1</sub>0 nach Inkubation in humanem Serum der Blutgruppe B an Tag sieben mittels A-Blutgruppenantigen-Antikörper, FITC-konjugiertem Sekundärantikörper und DAPI (Vergrößerung 200fach).
- Abb. 10D** Immunfluoreszenzfärbung der HUVEC Blutgruppe A<sub>1</sub>0 nach Inkubation in humanem Serum der Blutgruppe 0 an Tag sieben mittels A-

Blutgruppenantigen-Antikörper, FITC-konjugiertem Sekundärantikörper und DAPI (Vergrößerung 200fach).

**Abb. 10E** Immunfluoreszenzfärbung der HUVEC Blutgruppe A<sub>1</sub>0 nach Inkubation in humanem Serum der Blutgruppe A an Tag 14 mittels A-Blutgruppenantigen-Antikörper, FITC-konjugiertem Sekundärantikörper und DAPI (Vergrößerung 200fach).

**Abb. 10F** Immunfluoreszenzfärbung der HUVEC Blutgruppe A<sub>1</sub>0 nach Inkubation in humanem Serum der Blutgruppe B an Tag 14 mittels A-Blutgruppenantigen-Antikörper, FITC-konjugiertem Sekundärantikörper und DAPI (Vergrößerung 200fach).

**Abb. 10G** Immunfluoreszenzfärbung der HUVEC Blutgruppe A<sub>1</sub>0 nach Inkubation in humanem Serum der Blutgruppe 0 an Tag 14 mittels A-Blutgruppenantigen-Antikörper, FITC-konjugiertem Sekundärantikörper und DAPI (Vergrößerung 200fach).

**Abb. 10H** Immunfluoreszenzfärbung der Negativkontrolle der HUVEC Blutgruppe A<sub>1</sub>0 mittels FITC-konjugiertem Sekundärantikörper und DAPI (Vergrößerung 200fach).

**Abb. 11A** Veränderung der  $\alpha$ 1,3N-Acetylgalactosaminyltransferase-Aktivität der 1. Zelllinie der HUVEC der Blutgruppe A<sub>1</sub>0 in humanem Serum der Blutgruppe A, B und 0 an Tag sieben und 14 (HS= humanes Serum, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

**Abb. 11B** Referenzgruppe für die Veränderung der  $\alpha$ 1,3N-Acetylgalactosaminyltransferase-Aktivität der 1. Zelllinie der HUVEC der Blutgruppe A<sub>1</sub>0. Positivkontrolle = HUVEC in humanem Serum der Blutgruppe A an Tag 0. Negativkontrolle = HUVEC der Blutgruppe 0 (HS= humanes Serum, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

**Abb. 12A** Veränderung der  $\alpha$ 1,3N-Acetylgalactosaminyltransferase-Aktivität der 2. Zelllinie der HUVEC der Blutgruppe A<sub>1</sub>0 in humanem Serum der Blutgruppe A, B und 0 an Tag sieben und 14 (HS= humanes Serum, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

**Abb. 12B** Referenzgruppe für die Veränderung der  $\alpha$ 1,3N-Acetylgalactosaminyltransferase-Aktivität der 2. Zelllinie der HUVEC der

Blutgruppe A<sub>1</sub>0. Positivkontrolle = HUVEC in humanem Serum der Blutgruppe A an Tag null. Negativkontrolle = HUVEC der Blutgruppe 0 (HS= humanes Serum, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01).

**Abb. 13A** Veränderung der  $\alpha$ 1,3N-Acetylgalactosaminyltransferase-Aktivität der 3. Zelllinie der HUVEC der Blutgruppe A<sub>1</sub>0 in humanem Serum der Blutgruppe A, B und 0 an Tag sieben und 14 (HS= humanes Serum, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01).

**Abb. 13B** Referenzgruppe für die Veränderung der  $\alpha$ 1,3N-Acetylgalactosaminyltransferase-Aktivität der 3. Zelllinie der HUVEC der Blutgruppe A<sub>1</sub>0. Positivkontrolle = HUVEC in humanem Serum der Blutgruppe A an Tag null. Negativkontrolle = HUVEC der Blutgruppe 0 (HS= humanes Serum, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01).

**Abb. 14A** Veränderung der  $\alpha$ 1,3N-Acetylgalactosaminyltransferase-Aktivität der drei Zelllinien der HUVEC der Blutgruppe A<sub>1</sub>0 in humanem Serum der Blutgruppe A, B und 0 an Tag sieben und 14 (HS= humanes Serum, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01).

**Abb. 14B** Referenzgruppe für die Veränderung der  $\alpha$ 1,3N-Acetylgalactosaminyltransferase-Aktivität der drei Zelllinien der HUVEC der Blutgruppe A<sub>1</sub>0. Positivkontrolle = HUVEC in humanem Serum der Blutgruppe A an Tag null. Negativkontrolle = HUVEC der Blutgruppe 0 (HS= humanes Serum, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01).

**Abb. 15** Veränderung der Blutgruppenantigenexpression während einer Langzeitbeobachtung in ausgewählten Patienten. Bei allen ABO-inkompatiblen Patienten wurde eine Abnahme der Blutgruppenantigen-positiven Gefäße beobachtet. Bei allen blutgruppenkompatiblen Patienten wurde die Blutgruppenantigenexpression in nahezu allen Endothelzellen identifiziert (Tanabe et al., 2011).

**Abb. 16** Fall 1: Immunhistochemie der Blutgruppe-A-Antigene im Transplantat mit Anti-Blutgruppe-A-Antikörpern nach blutgruppeninkompatibler Nierentransplantation. Die Gewebe wurde präpariert zum Zeitpunkt null und nach ein und zwei Monaten (Tasaki et al., 2010).

- Abb. 17** Fall 1: Antikörpertiter, Serumkreatinin und Blutgruppe-A-Enzym-Aktivität bei einem Patienten mit blutgruppeninkompatibler Nierentransplantation (A<sub>1</sub>O auf B) und akuter Abstoßungsreaktion (Tasaki et al., 2010).
- Abb. 18** Fall 2: Antikörpertiter, Serumkreatinin und Blutgruppe-B-Enzym-Aktivität bei einem Patienten mit blutgruppeninkompatibler Nierentransplantation ohne Komplikationen im Verlauf (Tasaki et al., 2010).
- Abb. 19** Transplantatüberleben beim Auftreten von Chimärismus (Tanabe et al., 2012).
- Abb. 20** ABO-inkompatible Nierentransplantation eines Blutgruppe-B-Spenders in einen Empfänger der Blutgruppe 0 (Takahashi et al., 2005).
- Abb. 21** Klinischer Verlauf des lebertransplantierten Jungen (Comenzo et al., 1992).
- Abb. 22** Eine Spenderniere Blutgruppe B wird in einen Empfänger der Blutgruppe 0 transplantiert (Takahashi et al., 2005).

## 9 Literaturverzeichnis

---

- AIKAWA, A., KAWAMURA, T., SHISHIDO, S., SAITO, K., TAKAHASHI, K.  
ABO-incompatible living-donor pediatric kidney transplantation in Japan.  
*Clinics.*, 2014; 69 (S1): 22-27.
- ANDREU, G., MATIVET, S., SIMONNEAU, M., PIERRE, J., SALMON, C.  
Un antigène B acquis chez un sujet de groupe A2. *Revue Française de  
Transfusion et d'immuno-hématologie*, 1978; No.1.
- BARBOLLA, L., MOJENA, M., CIENFUEGOS, J.A., ESCARTIN, P.  
Presence of an inhibitor of glycosyltransferase activity in a patient following an  
ABO incompatible liver transplant. *Br J Haematol.* 1988; 69: 93-96.
- BARIÉTY, J., ORIOL, R., HINGLAIS, N., ZANETTI, M., BRETTON, R., DALIX, A.-M.,  
MANDET, C.  
Distribution of blood group antigen A in normal and pathologic human  
kidneys. *Kidney International*, 1980; Vol. 17; pp. 820-826.
- CAMERON, C., GRAHAM, F., DUNSFORD, I., SICKLES, G., MACPHERSON, C.R.,  
CAHAN, A., SANGER, R.  
Acquisition of a B-like antigen by red blood cells. *Brit. Med. J.*, 1959; 29-32.
- CHUNG, B.H., LIM, J.U., KIM, Y., KIM, J.-I., MOON, I.S., CHOI, B.S., PARK, C.W., KIM,  
Y.-S., YANG, C.W.  
Impact of the baseline anti-A/B antibody titer on the clinical outcome in ABO-  
incompatible kidney transplantation. *Nephron Clin Pract*, 2013; 124: 79-88.
- COMENZO, R.L., MALACHOWSKI, M.E., ROHRER, R.J., FREEMAN, R.B., RABSON,  
A., BERKMAN, E.M.  
Anomalous ABO phenotype in a child after an ABO-incompatible liver  
transplantation. *The New England Journal of Medicine* 1992 Vol.326, No.13:  
867-870.
- DENK, H., TAPPEINER, G., DAVIDOVITS, A., ECKERSTORFER, R., HOLZNER, J.H.  
Carcinoembryonic antigens and blood group substances in carcinomas of the  
stomach and colon. *J. Natl Cancer Inst.*, 1974; Vol. 53; 933.
- DÖRNER, T., FELDKAMP, J., KUNZE, J., PFITZMANN, R., RADKE, M.,  
SCHÖNBERGER, B., SPRINGER, G., STRAUBE, E., STRAUBE, W.  
*Psyhyrembel-Klinisches Wörterbuch*, 2004; 260. Auflage; 304.
- EBERHORN, J.  
Blutgruppen. *Planet Wissen*, 2013; [www.planet-wissen.de](http://www.planet-wissen.de).
- EIGLER, F.W.

Zur Geschichte der Nierentransplantation in Deutschland. Zentralbl Chir 2002; 127: 1001-1008.

GALILI, U.

Xenotransplantation and ABO incompatible transplantation: the similarities they share. Transfus Apher Sci, 2006; 35: 45-58.

GENBERG, H.

ABO-incompatible kidney transplantation using antigen-specific Immunadsorption and Rituximab. Department of clinical science, intervention and technology, Karolinska Institut, Stockholm Sweden.

GERBAL, A., ROPARS, C.

Acquired B antigen. Rev Fr Transfus Immunohematol, 1976; 19 (1): 127-44.

GRÄF, HG.

Goethe und Schiller in Briefen von Heinrich Voß dem Jüngeren. Reclam, 98.

HÄKKINEN, I.

A-like blood group antigen in gastric cancer cells of patients in blood Group O or B. J Natl Cancer Inst, 1970; 44: 1183.

HANCOCK, W.W., BUELOW, R., SAYEGH, M.H.

Antibody-induced transplant Arteriosclerosis is prevented by graft expression of anti-oxidant and anti-apoptotic genes. Nat Med, 1998; 4: 1392-1396.

HOHMANN, C.

Von A oder B zu Null. Pharmazeutische Zeitung online, Ausgabe 14/2007.

IWASAKI, K., MIWA, Y., HANEDA, M., UCHIDA, K.

Significance of HLA class I antibody-induced antioxidant gene expression for endothelial cell protection against complement attack. Biochem Biophys Res Commun, 2010; 391:1210–1215.

KEUSCH, J., LYDYARD, P.M., ISENBERG, D.A. & DELVES, P.J.

β1,4-Galactosyltransferase activity in B cells detected using a simple ELISA-based assay. Glycobiology 1995: vol. 5 no. 4 pp. 365-370.

KING, K.E., WARREN, D.S., SAMANIEGO-PICOTA, M., CAMPBELL-LEE, S., MONTGOMERY, R.A., BALDWIN, W.M.

Antibody, complement and accommodation in ABO-incompatible transplants. Current Opinion in Immunology, 2004; 16: 545-549.

KOCHAEEMER, A., KERN, S., KLÜTER, H., BIEBACK, K.

Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. Stem Cells, 2007; 25: 1270-1278.

- KOESTNER, S.C., KAPPELER, A., SCHAFFNER, T., CARREL, T.P., NYDEGGER, U.E., MOHACSI, P.  
Histo-blood group type change of the graft from B to 0 after ABO mismatched heart transplantation. *Lancet* 2004; 363: 1523-25.
- LABITZKE, R., FRIEDL, P.  
A serum-free medium formulation supporting growth of human umbilical cord vein endothelial cells in long-term cultivation. *Cytotechnology*, 2000; 35: 87-92.
- LÖFFLER, G., PETRIDES, P.E. & HEINRICH, P.C.  
*Biochemie & Pathobiochemie*. Springer Verlag, 8.Auflage: 965-967.
- LYNCH, R. J. & PLATT, J. L.  
Accommodation in organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*, 2008; 13 (2): 165-170.
- LYNCH, R. J. & PLATT, J. L.  
Accommodation in renal transplantation: unanswered questions. *Curr Opin Organ Transplant*; 15: 481-485.
- MASAMUNE, H., KAWASAKI, H., ABE, S., OYAMA, K., YAMAGUCHI, Y.  
Molischpositive mucopolysaccharides of gastric cancers as compared with the corresponding components of gastric mucosae. *Tohoku J Exp Med*, 1958; 68: 81-91.
- MATSUSHITA, S., IMAMURA, T., MIZUTA, T., HANADA, M.  
Acquired B antigen and polyagglutination in a patient with gastric cancer. *Japanese Journal of Surgery*, 1983; Vol. 13; No. 6; pp. 540-542.
- MCBROOM, C.R., SAMANEN, C.H. & GOLDSTEIN, I.J.  
Carbohydrate antigens: Coupling of carbohydrates to proteins by diazonium and phenylisothiocyanate reactions. *Methods Enzymol.*: 28, 212-219.
- MEDAWAR, P.  
Transplantation of tissues and organs: Introduction. *Br Med Bull*, 1965; 21:97
- MONTGOMERY, R.A.  
ABO incompatible transplantation: To B or not to B. *American Journal of Transplantation*, 2004; 4: 1011-1012.
- MÜHLBACHER, F.  
Alternativen zur ABO-inkompatiblen Nierentransplantation. *Nephro News*, Ausgabe 2/07.
- MURAMATSU, M., GONZALEZ, H.D., CACCIOLA, R., AIKAWA, A., YAQOUB, M.M., PULIATTI, C.

ABO incompatible renal transplants: Good or bad? *World J Transplant*, 2014; 4(1): 18-29.

NELSON, P.W., LANDRENEAU, M.D., LUGER, A.M., PIERCE, G.E., ROSS, G., SHIELD, C.F., WARADY, B.A., AEDER, M.I., HELLING, T.S., HUGHES, T.M., BECK, M.L., HARRELL, K.M., BRYAN, C.F.

Ten-year experience in transplantation of A2 kidneys into B and O recipients. *Transplantation*, 1998; Vol. 65; 256-260.

NOSAKA, M., ISHIDA, Y., TANAKA, A., HAYASHI, T., MIYASHITA, T., KAMINAKA, C., EISENMENGER, W., FURUKAWA, F., KIMURA, A.

Aberrant expression of histo-blood group A type 3 antigens in vascular endothelial cells in inflammatory sites. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 2008; Vol. 56 (3): 223-231.

PARK, W.D., GRANDE, J.P., NINOVA, D., NATH, K.A., PLATT, J.L., GLOOR, J.M., STEGALL, M.D.

Accommodation in ABO-incompatible kidney allografts, a novel mechanism of self-protection against antibody-mediated injury. *American Journal of Transplantation* 2003; 3: 952-960.

RIESS, H., ECKSTEIN, R., BINSACK, T., RUCKDESCHEL, G. & MEMPEL, W.

Acquired B antigen associated with infection by bacillus cereus: in vivo and in vitro transformation of A1 red cells. *Blut* (1988) 56; 237-238.

ROSE, L.M., WEST, L.J.

Accommodation: Does it apply to human leukocyte antigens? *Transplantation*, 2012; 93: 244-246.

ROSTAING, L., KAMAR, N.

Can we prevent donor-specific antibodies from developing after ABO-incompatible kidney transplantation? *Kidney International*, 2014; 85: 245-247.

RYDBERG, L.

ABO-incompatibility in solid organ transplantation. *Transfus Med* 2001; 11 (4): 325-342.

SCHMIDT, R.F., LANG, F.

*Physiologie des Menschen*, 2007; 30. Auflage; 619.

SETOGUCHI, K., ISHIDA, H., SHIMMURA, H., SHIMIZU, T., SHIRAKAWA, H., OMOTO, K., TOKI, D., IIDA, S., SETOGUCHI, S., TOKUMOTO, T., HORITA, S., NAKAYAMA, H., YAMAGUCHI, Y., TANABE, K.

Analysis of renal transplant protocol biopsies in ABO-incompatible kidney transplantation. *American Journal of Transplantation*, 2008; 8: 86-94.

RÖDEL, S.

Geschichte der Nierentransplantation. Novartis Pharma GmbH, 2009;  
www.transplantation-verstehen.de.

SMITH, R.N., KAWAI, T., BOSKOVIC, S.

Four stages and lack of stable accommodation in chronic alloantibody-mediated renal allograft rejection in cynomolgus monkeys. *Am J Transplant* 2008; 8: 1662-1672.

STAYBOLDT, C., REARDEN, A., LANE, T.A.

B antigen acquired by normal A1 red cells exposed to a patient's serum. *Transfusion*, 1987; Vol. 27: 41-44.

STEIGER, J., DICKENMANN, M.

ABO-inkompatible Nierentransplantation. *Nephro News*, Ausgabe 4/06.

TAKAHASHI, K.

A new concept of accommodation in ABO-incompatible kidney transplantation. *Clin Transplant* 2005; 19 (Suppl. 14): 76-85.

TAKAHASHI, K.

Recent findings in ABO-incompatible kidney transplantation: classification and therapeutic strategy for acute antibody-mediated rejection due to ABO-blood-group-related antigens during the critical period preceding the establishment of accommodation. *Clin Exp Nephrol* 2007; 11: 128-141.

TAKAHASHI, K., KAZUHIDE, S.

ABO-incompatible kidney transplantation. *Transplantation Reviews* 27, 2013; 1-8.

TANABE, T., ISHIDA, H., HORITA, S.,

Decrease of blood type antigenicity over the long-term after ABO-incompatible kidney transplantation. *Transpl Immunol*, 2011; Vol. 25: 1.

TANABE, T., ISHIDA, H., HORITA, S., HONDA, K., YAMAGUCHI, Y., NONOMURA, K., TANABE, K.

Endothelial chimerism after ABO-incompatible kidney transplantation. *Transplantation*, 2012; Vol. 93, No. 7; 709-716.

TASAKI, M., NAKAJIMA, T., IMAI, N., NAKAGAWA, Y., SAITO, K., TAKAHASHI, K. & YAZAWA, S.

Detection of allogeneic blood group A and B enzyme activities in patients with ABO incompatible kidney transplantation. *Glycobiology* 2010: vol. 20 no. 10 pp. 1251-1258.

ULFVIN, A., BÄCKER, A.E., CLAUSEN, H., HAKOMORI, S.-I., RYDBERG, L., SAMUELSSON, B.E., BREIMER, M.E.

Expression of glycolipid blood group antigens in single human kidneys: change in antigen expression of rejected ABO incompatible kidney grafts. *Kidney International*, 1993; Vol. 44; pp. 1289-1297.

VAN AGTEREN, M., WEIMAR, W., DE WEERD, A.E., TE BOEKHORST, P.A.W., IJZERMANS, J.N.M., VAN DE WETERING, J., BETJES, M.G.H.

The first fifty ABO blood group incompatible kidney transplantations: the Rotterdam experience. *Journal of Transplantation*, 2014.

VAN POELGEEST, E.P., BAELDE, H.J., LAGAAIJ, E.L.,

Endothelial cell chimerism occurs more often and earlier in female than in male recipients of kidney transplants. *Kidney Int*, 2005; 68: 847.

WEISS, F.U., SCHURMANN, C., TEUMER, A., MAYERLE, J., SIMON, P., VÖLZKE, H., GREINACHER, A., KUEHN, J.-P., ZENKER, M., VÖLKER, U., HOMUTH, G., LERCH, M.

ABO blood type B and fucosyltransferase 2 non-secretor status as genetic risk factors for chronic pancreatitis. *Gut*, 2016; Vol. 65 No. 2: 353-354.

WEN DING, J., ZHOU, T., MA, L.

Expression of complement regulatory proteins in accommodated xenografts induced by anti-alpha-Gal IgG1 in a rat-to-mouse model. *Am J Transplant*, 2007; 7: 1-9.

WU, Z.L., ETHEN, C.M., PRATHER, B., MACHACEK, M., JIANG, W.

Universal phosphatase-coupled glycosyltransferase assay. *Glycobiology*, 2010; Vol. 21 No. 6; pp. 727-733.

WÜTHRICH, RUDOLF P.

Nierentransplantation – Grundlagen der Vor- und Nachsorge, Langzeitüberwachung. Springer Verlag, 2.Auflage: 3-11.

YAICH, S.

ABO-incompatible kidney transplantation. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 2013; 24(3): 463-472.

YAMAMOTO, F.

Review: ABO blood group system – ABH oligosaccharide antigens, anti-A and anti-B, A and B glycosyltransferases, and ABO genes. *Immunohematology*, 2004; Vol. 20; No. 1.

YOSHIDA, A., SCHMIDT, G.M., BLUME, K.G., BEUTLER, E.

Plasma blood group glycosyltransferase activities after bone marrow transplantation. *Blood*, 1980; Vol. 55, No. 4; 699-701.

YUZAWA, Y., BRETT, J., FUKATSU, A.

Interaction of antibody with forssman antigen in guinea pigs. *Am J Pathol*, 1995; 146: 1260-1272.

## 10 Danksagung

---

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Zunächst gilt mein Dank meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Sylvia Stracke für die Überlassung des Themas sowie die Betreuung meiner Arbeit in der Abteilung Nephrologie der Klinik für Innere Medizin A an der Universitätsmedizin Greifswald.

Weiterhin will ich den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des gastroenterologischen Forschungslabors der Klinik für Innere Medizin A der Universität Greifswald unter der Leitung von Prof. Dr. med. M. Lerch für die tatkräftige Unterstützung beim Anlernen und Durchführen der experimentellen Tätigkeiten danken. Diesbezüglich möchte ich ebenso Norina Loth, der MTA des nephrologischen Forschungslabors herzlich danken.

Für die Bereitstellung der HUVEC gilt mein Dank dem Forschungslabor der Abteilung für Frauenheilkunde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. M. Zygmunt. Außerdem bedanke ich mich beim Institut für Transfusionsmedizin der Universität Greifswald unter der Leitung von Prof. Dr. med. A. Greinacher für die humanen Seren und Erythrozyten, die mir für meine Experimente zur Verfügung gestellt wurden.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meinen Freunden bedanken, die mich sowohl während meiner Ausbildung, als auch im Berufsleben jederzeit mit Rat und Tat unterstützt haben um meine Ziele zu erreichen und mich immer wieder motivierten diese Arbeit fertig zu stellen.

## 11 Eidesstattliche Erklärung

---

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

12.03.2020

Diana Hartwig

## 12 Lebenslauf

---

Name: Diana Hartwig

Geburtsdatum: 05.12.1987

Geburtsort: Eberswalde

Eltern: Reinhard Hartwig  
Sabine Hartwig geb. Schikorra

Schulbildung:

1994 – 2000 Grundschule „Am Stadtwald“ Eberswalde

2000 – 2003 Gymnasium Finow in Eberswalde

2003 – 2007 Einstein-Gymnasium Neuenhagen bei Berlin

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Abitur) 2007

Studium und bisheriger beruflicher Werdegang:

Seit 2007 Studium der Humanmedizin an der Ernst-Moritz-Arndt Universität in Greifswald

2010 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Erstes Staatsexamen)

seit 2011 Beginn einer experimentellen Promotion im Nephrologischen Forschungslabor Greifswald unter der Leitung von Prof. Stracke (Thema: Expression des Blutgruppe A Antigens und Aktivität der A-Glycosyltransferase in HUVEC nach der Kultivierung in humanem Serum der Blutgruppe A, B und 0)

2013/2014 Praktisches Jahr (1.Tertial: Anästhesie im Universitätsklinikum Greifswald, 2.Tertial: Innere Medizin im Südharzlinikum Nordhausen, 3. Tertial: Gefäßchirurgie im Südharzlinikum Nordhausen)

2014 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Zweites Staatsexamen)

09/2014-09/2016	Assistenzarztstätigkeit im Bereich Nephrologie, Rheumatologie und Hochdruckkrankheiten einschließlich stationärer Dialyse (1 Jahr Basisweiterbildung, 1 Jahr spezielle Nephrologie)
10/2016	Assistenzarztstätigkeit im Bereich internistische Intensivmedizin (6 Monate)
03/2017	Assistenzarztstätigkeit im Bereich Kardiologie (9 Monate)
12/2017	Assistenzarztstätigkeit im Bereich Gastroenterologie (geplant für 12 Monate)
seit 01/2019	Assistenzarztstätigkeit in der Klinik für Nephrologie Charité Campus Benjamin Franklin
seit 07/2020	Assistenzärztin für Innere Medizin und Nephrologie am Südharzkrankenhaus Nordhausen
seit 03/2021	Fachärztin für Innere Medizin und Nephrologie am Südharzkrankenhaus Nordhausen