

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss der Lagerung von Erythrozytenkonzentraten auf  
die Komplementaktivierung

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Bettina Uta Bartl  
aus Offenbach am Main

Datum der Promotion: 25.06.2017

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Zusammenfassung</b>	<b>IV</b>
<b>Abstract</b>	<b>V</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>Veröffentlichung</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Erythrozyten und die physiologische Funktion	1
1.2 Die Transfusionsmedizin	3
1.2.1 Die Geschichte der Transfusionsmedizin	3
1.2.2 Erythrozytenkonzentrate im klinischen Alltag	5
1.2.3 Lagerschäden in Erythrozytenkonzentraten	6
1.3 Das Komplementsystem	11
1.3.1 Allgemein	11
1.3.2 Die Komplementrezeptoren und Regulatorproteine	13
1.4 Die Erythrophagozytose	16
<b>2 Zielsetzung</b>	<b>18</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>19</b>
3.1 Materialien	19
3.1.1 Antikörper, Antiseren und Proteine	19
3.1.2 Puffer und Medien	19
3.1.3 Geräte	20
3.1.4 Verbrauchsmaterialien	20
3.1.5 Zusammensetzung Erythrozytenkonzentrat	21
3.2 Methoden	22
3.2.1 Prozessübersicht	22
3.2.2 Gewinnung und Vorbereitung der Proben	23
3.2.3 Hämolysetest und Transfusionssimulation	24
3.2.4 Durchflusszytometrie	24
3.2.5 Direkter Coombstest	26

<b>4 Ergebnisse</b>	<b>30</b>
<b>4.1 Titration der Antikörper</b>	<b>30</b>
<b>4.2 Ergebnisse zu den Lagerschäden</b>	<b>36</b>
4.2.1 Änderung von C3d über die Lagerungszeit	36
4.2.2 Effekt der Transfusionssimulation auf die Komplementaktivierung	36
4.2.3 Bestätigung der Ergebnisse durch den DAT	38
4.2.4 Änderung von CD35 über die Lagerungszeit	39
4.2.5 Varianz der CD35 Expression	41
4.2.6 Änderung von CD59 über die Lagerungszeit	42
4.2.7 Änderung der CD55 Expressionen	43
4.2.8 Änderung der CD47 Expression über die Lagerungszeit	44
4.2.9 Zusammenfassung der FACS Ergebnisse	46
<b>5 Diskussion</b>	<b>47</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>57</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>64</b>
<b>Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen</b>	<b>65</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>66</b>
<b>Publikationsliste</b>	<b>67</b>

## Zusammenfassung

**EINLEITUNG:** Lagerschäden in Erythrozytenkonzentraten sind vielfältig und ein limitierender Faktor in der Transfusionsmedizin. Welche Rolle Komplement in diesem Zusammenhang einnimmt, wurde bislang nicht hinreichend untersucht.

**METHODIK:** Erythrozytenkonzentrate wurden 42 Tage gelagert, dabei wöchentlich Proben entnommen und diese durchflusszytometrisch auf CD35, CD55, CD47, CD59 und C3d untersucht. Des Weiteren erfolgte ein direkter Antiglobulintest auf C3d und die Immunglobuline IgA, IgG und IgM. Um den Kontakt des Erythrozytenkonzentrats mit Serum zu simulieren, wurde eine Transfusionssimulation durchgeführt, wobei Erythrozyten für 30 Minuten bei 37° mit homologem Serum inkubiert wurden.

**ERGEBNISSE:** C3d stieg über die Lagerungszeit an, wobei die Zunahme nach Transfusionsimulation stärker war (ANOVA  $< 0.0001$ ) als vor Transfusionsimulation (ANOVA  $p = 0.0103$ ). Im direkten Agglutinations Test wurden diese Beobachtungen bestätigt.

Die Abnahme von CD35, CD55 und CD47 über den Zeitraum der Lagerung war signifikant (jeweils ANOVA  $p < 0.0001$ ), wobei die meisten Veränderungen ab Tag 14 auftraten. CD59 zeigte keinen Abfall, und Immunglobuline wurden nicht nachgewiesen, unabhängig der Transfusionssimulation.

**ZUSAMMENFASSUNG:** Die Transfusion macht Erythrozyten sensibler für spontane Komplementaktivierung. Ursächlich hierfür könnte die zunehmende Anfälligkeit von CD35 gegenüber proteolytischer Spaltung oder Vesikularisierung sein. Die Transfusion von Erythrozytenkonzentraten jenseits einer Lagerungszeit von 14 Tagen könnte in kritisch kranken Patienten durchaus relevant sein.

## Abstract

**BACKGROUND:** Storage lesions in Red Blood Cell Concentrates are manifold and a limiting factor within transfusion medicine. Up to now the role of complement within this context has not sufficiently been researched.

**STUDY DESIGN AND METHODS:** Red Blood Cell Concentrates were stored for 42 days, with samples being retrieved on a weekly basis. Such samples were examined by flow cytometry for CD35, CD55, CD47, CD59 and C3d. In addition a direct Agglutination Test was carried out for C3d and the Immunoglobulins IgA, IgG and IgM. To simulate the contact of Red Blood Cell Concentrates with serum, a transfusion was simulated by incubating erythrocytes with homologue serum for 30 minutes at 37 degree Celsius.

**RESULTS:** C3d increased during the storage period. The increase was stronger *after* the transfusion was simulated (ANOVA  $< 0.0001$ ) than *before* the transfusion was simulated (ANOVA  $p = 0.0103$ ). The direct Agglutination test confirmed these observations. The decline in CD35, CD55 and CD47 during the storage period was significant (in each case ANOVA  $p < 0.0001$ ), with the largest changes arising after 14 days. CD59 showed no decline and there were no Immunoglobulins detected, irrespective of the transfusion simulation.

**CONCLUSION:** RBCs are becoming increasingly following TS, which might be associated with the increased susceptibility of CD35 to proteolytic cleavage and vesiculation. The use of RBCs stored longer than 14 days might, in fact, be clinically significant in critically ill patients.

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
DAT	Direkter Agglutinations Test
EK	Erythrozytenkonzentrat, Erythrozytenkonzentrate
FACS	Fluorescence-activated cell sorting (deutsch: Durchflusszytometrie)
FB	Frischblutproben
MAC	Membrane Attack Complex
MFI	Mean Fluorescence Intensity
PK	Positivkontrolle
RCA	Regulators of Complement Activation
Tab.	Tabelle
TS	Transfusionssimulation

## Veröffentlichung

Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden als Originalartikel in Transfusion Medicine veröffentlicht:

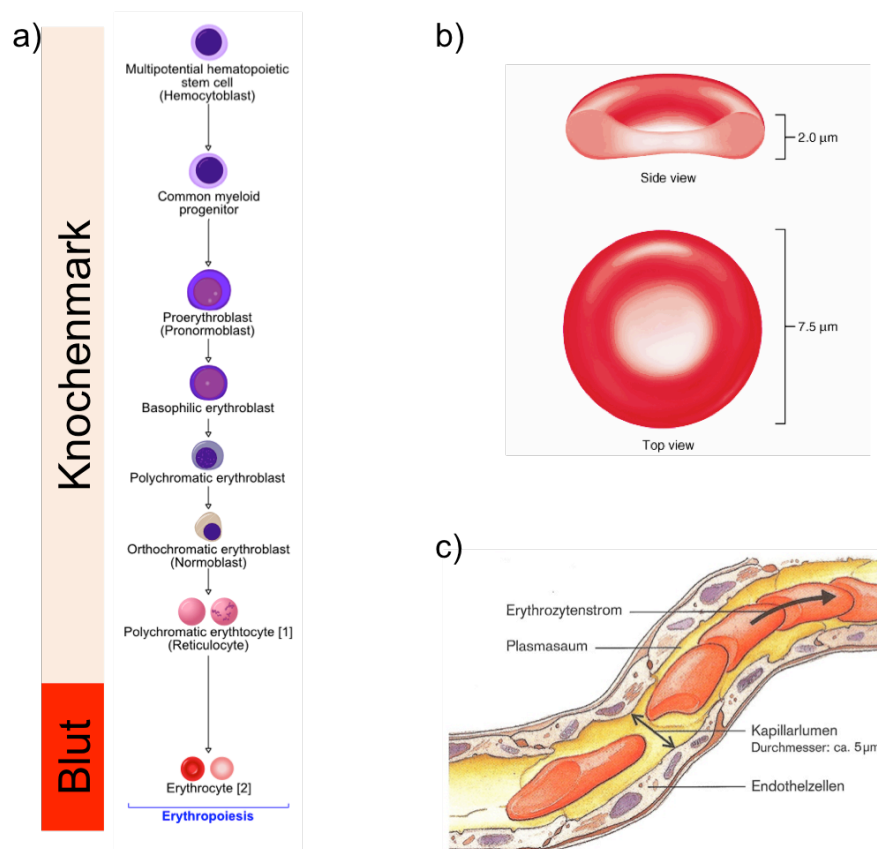
Kamhieh-Milz J\*, **Bartl B\***, Sterzer V, Kamhieh-Milz S, Salama A, Storage of RBC results in an increased susceptibility for complement-mediated degradation. Transfus Med, 2014. 24 (6): p. 392-9.

\* Geteilte Erstautorschaft

# 1 Einleitung

## 1.1 Erythrozyten und die physiologische Funktion

Erythrozyten, auch rote Blutkörperchen genannt, sorgen dafür, dass Zellen und Gewebe mit lebensnotwendigem Sauerstoff versorgt werden. In Abhängigkeit der Menge des Gesamtblutes und des physiologischen Zustandes des Menschen befinden sich 24 - 30 Billionen Erythrozyten im Blutkreislauf [1]. Darüber hinaus transportieren sie auch einen Teil des  $\text{CO}_2$  und sind an der pH Regulation beteiligt [2]. Sie entstehen im roten Knochenmark, wo sie aus pluripotenten Stammzellen über mehrere Differenzierungsschritte gebildet werden [1] (Abb. 1a).



**Abbildung 1:** Der Erythrozyt entwickelt sich aus einer pluripotenten Stammzelle im roten Knochenmark über verschiedene kernhaltige Stufen (Erythroblasten) bis – nach Ausstoß des Kernmaterials – zum Retikulozyt. Nach anschließendem Verlust der RNA und Zellorganellen ist der Entwicklungsprozess (ca. 7 Tage) abgeschlossen (a) [1]. Der Erythrozyt besitzt durch seine spezielle bikonkave Form ein hohes Oberflächen/Volumen Verhältnis, was eine kurze Diffusionsstrecke vom Sauerstoff zum Hämoglobin begünstigt (b) [2]. Darüber hinaus dringt ein Erythrozyt durch sein hohes Verformungspotential auch durch kleinste Kapillaren (c) [2].



Während dieser Differenzierungsprozesse werden die Erythrozyten immer mehr mit Hämoglobin gefüllt, verlieren jedoch gleichzeitig durch den Reifungsprozess stetig Fläche, Volumen und Hämoglobin durch Vesikularisierung von 50 – 200 nm Partikel [3, 4]. Reife Erythrozyten sind bikonkav geformte Zellen mit einem Durchmesser von 7,5  $\mu\text{m}$ , bei einer Randdicke von 2  $\mu\text{m}$  und einer zentralen Vertiefung von 1  $\mu\text{m}$  (Abb. 1.b). Somit sind Erythrozyten klein genug, um durch die feinen Kapillaren in den Blutkreislauf zu gelangen (Abb. 1b und 1c). Hier zirkulieren sie etwa 120 Tage und legen dabei eine Strecke von ca. 300 km zurück, um anschließend in Milz und Leber abgebaut zu werden [2]. Die Erythrozytenneubildung beträgt 1 % pro Tag, was einer Produktionskapazität von etwa 2 Millionen Erythrozyten pro Sekunde entspricht. Bei Bedarf kann diese jedoch noch um das Fünf- bis Zehnfache gesteigert werden.

Das Volumen des Erythrozyten wird hauptsächlich durch das Hämoglobin (Hb) bestimmt. Dieses ist ein Tetramer mit vier Untereinheiten. Die häufigste Form ist das HbA<sub>1</sub>, welches aus zwei  $\alpha$  und zwei  $\beta$  Untereinheiten gebildet wird. Das Hämoglobin ist ein annähernd kugelförmiges Molekül mit einem Durchmesser von 5 nm. An jeder einzelnen Untereinheit kann ein Sauerstoffmolekül gebunden werden. Hat das erste Sauerstoffmolekül gebunden, kommt es zu einer Konformationsänderung des Hämoglobins vom T-Zustand (Spannungszustand) zum R-Zustand (Entspannungszustand), was zu einer erhöhten Sauerstoffaffinität führt [5].

## 1.2 Die Transfusionsmedizin

### 1.2.1 Die Geschichte der Transfusionsmedizin

Das Interesse für Transfusionsmedizin bahnte sich seinen Weg, nachdem William Harvey (1578 – 1657) als Erster die Blutzirkulation beschrieb [6]. Diese Erkenntnis führte dazu, dass immer mehr Versuche mit Blut durchgeführt wurden. Im Verlauf kam es zu Transfusionen von Tier zu Tier, von Tier zu Mensch und auch von Mensch zu Mensch. Letzteres wurde erstmals von James Blundell (1790 – 1877) am 22.12.1818 durchgeführt, weswegen er auch als „Vater der modernen Transfusionsmedizin“ bezeichnet wird [7].

Die Therapieerfolge dieser Transfusionen waren äußerst unbefriedigend, sodass sich der Chirurg Ernst von Bergmann in seiner Rede 1883 zur Feier des Stiftungstages der militärärztlichen Bildungsanstalt gegen jegliche tierische Transfusion aussprach und auch riet artengleiche Transfusionen nur noch als Ultima Ratio zuzulassen:

*„Die vor noch nicht zehn Jahren prophezeite, neue, blutspendende Aera in der Medizin ist bereits im Keime erstickt und schnell zu Grabe getragen worden. Wir müssen uns eben im Können bescheiden, so lange wir noch im Wissen zurückstehen“ [8].*

Es vergingen weitere Jahre bis Karl Landsteiner 1900 die Agglutinationserscheinung des Blutes entdeckte und damit einen der wichtigsten Meilensteine der Geschichte der Transfusionsmedizin: Die Geburtsstunde des heutigen ABO Blutgruppensystems [9]. Trotz dieser Entdeckung entwickelte sich die Transfusionsmedizin die nächsten Jahre nur zaghaft. Die Koagulationseigenschaften des Blutes erschwerten die Transfusion. Blutübertragungen fanden auf direktem Weg zwischen Spender und Empfänger statt. Zunächst noch sehr invasiv, wobei zum Beispiel die chirurgisch präparierte Arteria radialis in die Empfängervene eingenäht wurde. Auch venovenöse Übertragungen fanden statt und in Folge auch mit zwischengeschalteten Apparaturen, z.B. einem Schlauchpumpensystem zur gleichmäßigen Blutübertragung. Diese Vorgehen waren zeitaufwendig, komplikationsbehaftet und invasiv (Abb. 2) [10]. Auch die indirekte venovenöse Frischblutübertragung wurde durchgeführt, wobei Spender und Empfänger zwar nicht direkt nebeneinander liegen, jedoch zur selben Zeit anwesend sein mussten. Bis in den ersten Weltkrieg hinein wurden nur kleine Schritte zur Verbesserung der Blutübertragung erzielt [10].

Früher

Heute



**Abbildung 2:** Blundell's Transfusion als direkte Übertragung (Abbildung aus Pelis 1997 [11]). Heute kann die Transfusion örtlich und zeitlich getrennt von Spender und Empfänger erfolgen [12].

1916 war Peyton Rous der Erste, der Erythrozyten lagerte. Er gab roten Blutzellen von Kaninchen eine Mischung aus Citrat und Glucose hinzu, lagerte diese für vier Wochen kühl und stellte fest, dass sie nicht hämolysierten. Nach Rücktransfusion in das Spenderkaninchen, stieg der Hämatokrit an, eine Hämoglobinurie oder Bilirubinurie traten nicht auf [13-15]. Zwei Jahre später wand Oswald Robertson diese Erkenntnis an menschlichem Blut an – die erste Blutbank Frankreichs während des ersten Weltkrieges. Durch Citrat konnten Spender und Empfänger nun räumlich voneinander getrennt sein, durch den Zusatz von Glucose auch zeitlich. Oswalds Blutprodukte konnten 26 Tage gelagert werden und sollten Soldaten im Schockzustand zu Gute kommen [16, 17]. Seine amerikanischen Kollegen hingegen befürchteten, dass der Zusatz von Glucose das bakterielle Wachstum fördern könnte, außerdem karamellisierte Dextrose beim Erhitzen, während Natriumcitratlösungen problemlos autoklaviert werden konnten. Die Vollblutentnahme in autoklavierte Flaschen mit 3,8 % Natriumcitrat und eine Lagerungszeit von 5 Tagen auf Eis waren die ersten Blutbank Standards [18, 19]. Die Entwicklung dieser Standards ging nur schleppend voran. Nach und nach erfolgten Verbesserungen in Lagerungsbedingungen und Einführung neuer Standards. Neben der Hitzesterilisation in den 1940er Jahren folgten Phosphatzusätze in den 1950ern, Adenin in den 1970ern, Additivlösungen in den 1980ern und die Leukozytenreduktion in den 1990ern [19]. Bis heute werden weitere Verbesserungen für optimierte Lagerbedingungen erforscht und es ist davon auszugehen, dass dieser Prozess noch nicht endgültig abgeschlossen ist.

### 1.2.2 Erythrozytenkonzentrate im klinischen Alltag

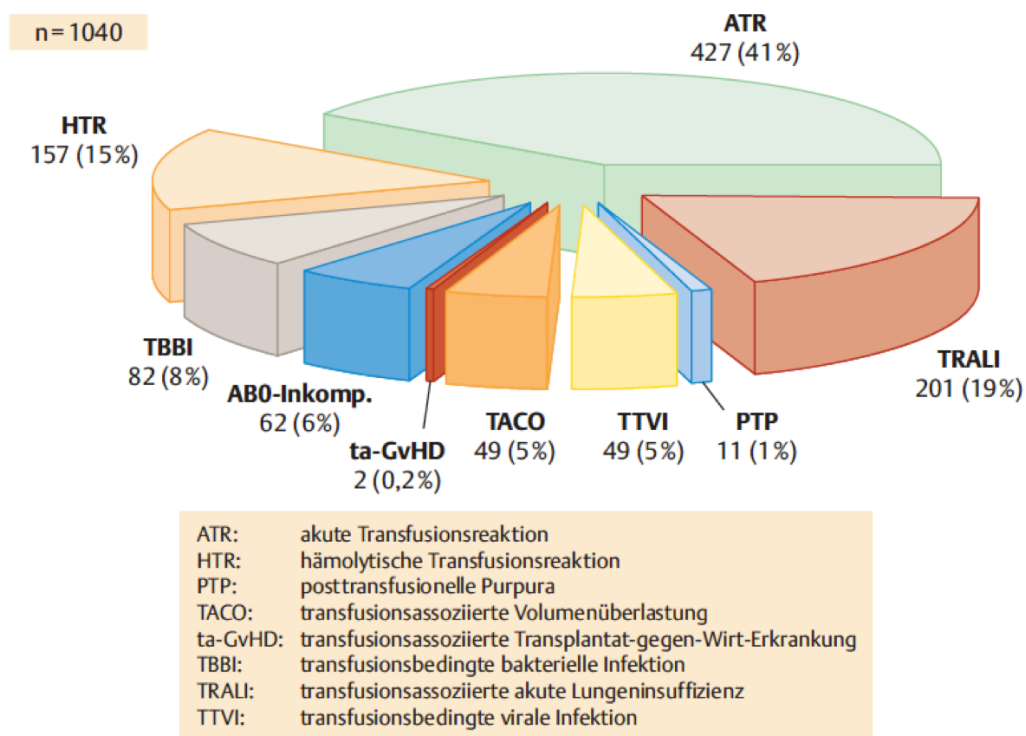
Heute werden Erythrozytenkonzentrate (EK) in den meisten Fällen aus frisch abgenommenem Vollblut oder gegebenenfalls maschinell mittels Zellseparatoren gewonnen. Die durch das Paul-Ehrlich-Institut zugelassenen Präparate weisen nur einen geringfügig abweichenden Gehalt an restlichen Thrombozyten, Plasmakomponenten und Additivlösung auf. In Deutschland sind EK seit dem 01.10.2001 leukozytendepletiert. Hierdurch reduziert sich das Risiko einer Immunisierung gegen Leukozytenantigene (HLA) und auch die Übertragung zellständiger Viren (z.B. Zytomegalievirus) kann weitgehend verhindert werden [20].

Erythrozytenkonzentrate sind im medizinischen Alltag von allen Blutprodukten das am häufigsten transfundierte. Die Ressource Blut ist begrenzt. Nur 3 - 4 % der Menschen in unserer Bevölkerung gehen regelmäßig zum Blutspenden [20]. Im Jahr 2000 belief sich die Anzahl der transfundierten EK noch auf 3.189.592. Zwölf Jahre später hat der Verbrauch bereits um über 1 Million zugenommen (4.343.656 EK) [21]. Zeitgleich vollzieht sich ein demographischer Wandel, in welchem die Anzahl medizinisch bedürftiger, älterer Menschen zunimmt, im Verhältnis hierzu jedoch die Anzahl geeigneter Spender abnimmt [22]. Somit steigen die Ansprüche an eine hohe Qualität und Lagerfähigkeit der Blutprodukte stetig an.

Die beiden **Hauptindikationen** für eine EK-Transfusion sind die akute und chronische Anämie. Man spricht von Anämie wenn eine Verminderung der Hämoglobinkonzentration, des Hämatokrit oder der Erythrozytenzahl unter die Norm vorliegt. Die Indikation zur Transfusion wird individuell gestellt, unter Berücksichtigung der Kriterien Hämoglobinkonzentration, Kompensationsfähigkeit und Risikofaktoren des Patienten [23]. Die Transfusion von EK muss nach Richtlinien und immer blutgruppengleich erfolgen [24]. Im Notfall darf eine Transfusion der Blutgruppe 0 durchgeführt werden, bis die Patientenblutgruppe bekannt ist [23]. Die Transfusion *eines* EK führt – bei nicht Vorliegen einer aktiven Blutung – zu einem Hämoglobinanstieg von 1 - 1,5 g/dl und einem Hämatokritanstieg von ca. 3 – 4 % [20].

In seltenen Fällen kann es zu **Transfusionsreaktionen** kommen, die in „schwerwiegend“ und „nicht schwerwiegend“ eingeteilt werden können und in jedem Fall protokolliert werden müssen. Akute (allergische) Transfusionsreaktionen der Grade

I und II, sowie febrile Transfusionsreaktionen mit gering bis mittelgradig ausgeprägten Symptomen zählen zu den „nicht schwerwiegenden“ Transfusionsreaktionen. Zwischen 1997 und 2010 wurden dem Paul-Ehrlich-Institut 6469 Verdachtsfälle einer Transfusionsreaktion gemeldet, 1042 bestätigten sich hiervon als schwerwiegende Transfusionsreaktion, wobei 71 Todesfälle dokumentiert wurden [25]. Eine Verteilung der schwerwiegenden Transfusionsreaktionen ist Abbildung 3 zu entnehmen.

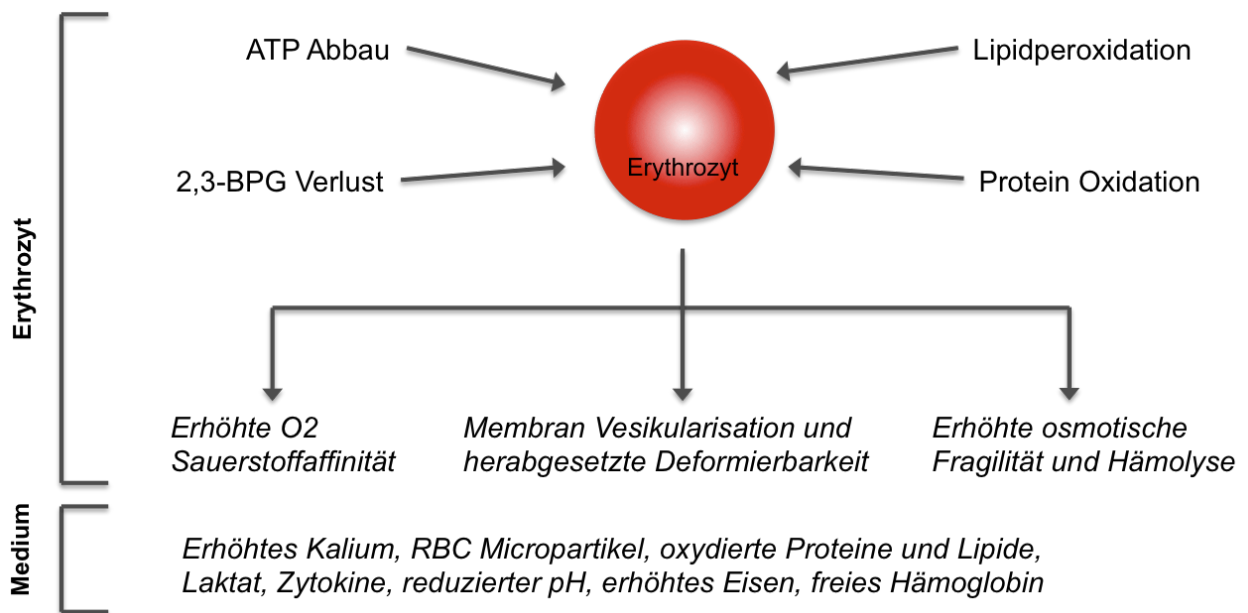


**Abbildung 3:** Übersicht über schwerwiegende Transfusionsreaktionen zwischen den Jahren 1997 bis 2010, die dem Paul-Ehrlich-Institut gemeldet waren (bezogen auf  $81,668 \times 10^6$  transfundierte Blutprodukte, davon  $58,629 \times 10^6$  EKs). Abbildung aus dem Hämovigilanz-Bericht des Paul-Ehrlich-Instituts [25].

### 1.2.3 Lagerschäden in Erythrozytenkonzentraten

Seit der ersten Lagerung von Blutprodukten durch Oswald Robertson ist nahezu ein Jahrhundert vergangen und seither ist die Qualität und Lebensfähigkeit von Erythrozytenkonzentraten stetig verbessert worden. Während der Lagerungszeit entstehen sogenannte Lagerungsschäden (engl. „storage lesion“). Diese Schäden lassen sich zusammenfassend als jene Veränderungen beschreiben, die die Qualität des Erythrozytenkonzentrates reduzieren und das Überleben und die Funktion der

Erythrozyten nach Transfusion verringern. Hierzu zählen morphologische Veränderungen, biochemische Veränderungen und auch Veränderungen im Lagermedium (Abb. 4). Auf einige Lagerschäden wird im Folgenden näher eingegangen.



**Abbildung 4:** Veränderungen in Erythrozyten und dem Lagermedium über die Zeit. *ATP Adenosintriphosphat; 2,3-BPG 2,3-Bisphosphoglycerat; RBC Red blood cells.* Abbildung nach Aubron et al 2013 [26].

In den Erythrozytenkonzentraten schreitet die Glykolyse weiter voran. Das bedeutet, dass deren Nebenprodukte wie Laktat, Protonen und Proteine über die Zeit akkumulieren [15, 27]. Während diese Nebenprodukte *in vivo* zügig aus der Zirkulation entfernt werden, verbleiben sie *in vitro* in den Erythrozytenkonzentraten und führen zu strukturellen und funktionellen (biochemischen) Veränderungen. Protonen reduzieren den pH-Wert und ändern die Glykolyse, was zunächst zu einem schnellen Abfall von 2,3-Bisphosphoglycerat führt (2,3-BPG). Dies führt gleichzeitig zu einem Anstieg der ATP-Produktion. Bei fortschreitender Säuerung verlangsamt sich die Glykolyse zunehmend und die ATP-Produktion nimmt ab [15].

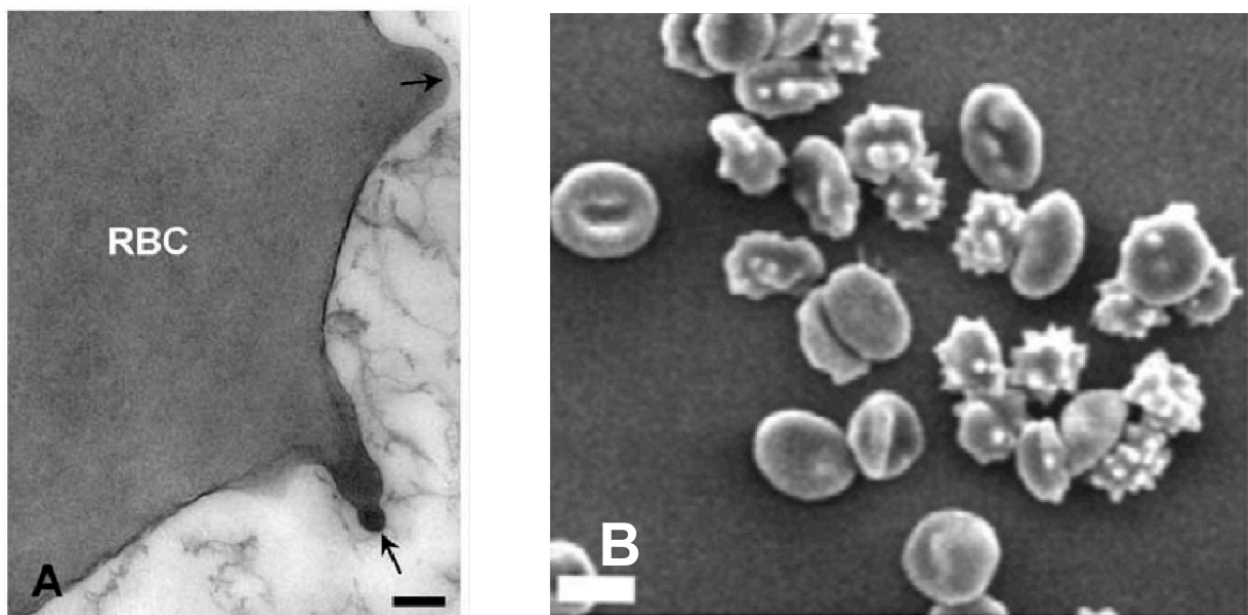
**2,3-BPG** wird über einen Nebenweg der Glykolyse des erythrozytären Stoffwechsels gebildet. Sehr reines Hämoglobin bindet sehr fest an Sauerstoff (O<sub>2</sub>) [5]. Jedoch ist

nicht nur eine effiziente Sauerstoffaufnahme erforderlich, sondern auch eine effiziente Abgabe im peripheren Gewebe. Damit diese Abgabe erfolgen kann, muss das Hämoglobin 2,3-BPG binden, welches wiederum den T-Zustand des Hämoglobins stabilisiert und die O<sub>2</sub>-Affinität aller Untereinheiten vermindert. Das bedeutet, dass es zu einer Rechtsverschiebung der Sauerstoffbindungskurve kommt und somit Sauerstoff im peripheren Gewebe leichter abgegeben werden kann [5]. In gelagerten Erythrozytenkonzentraten ist 2,3-BPG nach 14 Tagen faktisch aufgebraucht [28], was eine Linksverschiebung der Sauerstoffbindungskurve zu Folge hat. Dadurch nimmt die O<sub>2</sub>-Affinität zu, und die O<sub>2</sub>-Abgabe im sauerstoffbedürftigen Gewebe nimmt ab. Nach stattgefundener Transfusion steigt der 2,3-BPG Spiegel zwar wieder an, kann aber erst innerhalb von drei Tagen vollständig rekompensiert werden [29].

Die **Adenosintriphosphat (ATP)** Konzentration in Erythrozyten korreliert sehr stark mit der *in vivo* Überlebenszeit [27]. In frischem Blut beträgt die ATP-Konzentration ca. 4 µmol/g Hb. Charakteristischer Weise hält sich der ATP Gehalt zunächst und kann sogar ansteigen, fällt nach einer gewissen Zeit jedoch wieder ab. Wird die Konzentration unter ein Level von 2 µmol/g Hb reduziert, so fällt die Erythrozyten-Wiederfindungsrate typischerweise unter 75 % [27, 30]. Die Vorgabe europäischer Leitlinien fordert jedoch, dass die Wiederfindungsrate (engl. 24h-recovery) mindestens 75 % betragen muss. Durch Zusätze wie Phosphat und Adenin zum Lagermedium konnte der ATP Abfall herausgezögert, aber nicht verhindert werden.

Auch **oxidativer Stress** kann Lagerschäden verursachen. Beim Blutspenden ist das venöse Blut nur teilweise mit Sauerstoff gesättigt. Das bewirkt, dass der Sauerstoff in einem kontinuierlichen Austausch zwischen benachbarten Hämoglobinmolekülen steht. Dabei können Sauerstoffmoleküle Elektronen aufnehmen, wodurch sich Eisenmethämoglobin und Superoxid-Anionen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) bilden. Gelegentlich ist es möglich, dass dieses Superoxid-Anion mit Eisen und Wasser in der Fenton-Haber-Weiss Reaktion ein Hydroxylradikal formt. Hydroxylradikale sind aggressive, freie Sauerstoffradikale die biologische Moleküle, inkl. Proteine und Lipide schädigen können [15, 31]. Dadurch kommt es unter anderem zu charakteristischen Membranveränderungen. Hierzu zählen die Abnahme kritischer Antigenmarker (z.B. CD47), die Aggregation und Oxidation von Membran-Hämoglobin, Spektrin und andere Zytoskelettproteine, sowie die Induktion der Apoptose [32-35].

Die betroffene Membran bildet kleine Bläschen aus, die dann als sogenannte **Mikrovesikel** extrazellulär abgesondert werden. Dieser Vorgang ermöglicht es den Erythrozyten, schädigende Komponenten zu eliminieren und sich so vor frühzeitiger Phagozytose zu schützen [3, 36, 37]. Durch diesen Vorgang nehmen die bikonkaven Erythrozyten zunehmend die Form von Echinozyten an (Abb. 5).



**Abbildung 5:** (A) Aufnahme eines Erythrozyten (RBC) mit konventioneller Elektronenmikroskopie. Die Transformation zum Echinozyten ist sichtbar, die Membranausziehungen sind mit Pfeilen dargestellt. Die Abschnürung eines Mikrovesikels ist zu erkennen (unterer Pfeil). Balken = 0,5 µm, aus Antonelou et al 2010 [38]. (B) Elektronenmikroskopie von leukozytendepletierten Erythrozyten nach einer Lagerungszeit von 42 Tagen in CPD-SAGM. Aus Antonelou et al 2012 [39].

Durch den Verlust der Membranvesikel kommt es zu einem stärkeren Oberflächen- als Volumenverlust. Dies führt dazu, dass die Erythrozyten zu unelastischen Sphärozyten werden, die entweder während der Lagerung hämolysieren oder nach Transfusion schneller abgebaut werden [27]. Die Form, die Deformierbarkeit und die mechanische Stabilität sind jedoch essentiell, damit sie in die kleinsten Kapillaren Sauerstoff transportieren, nicht frühzeitig abgebaut, und somit ihrer Funktion gerecht werden können.

Auf Grund der Lagerungstemperatur von Erythrozytenkonzentraten bei ca. 4°C ist die **Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Pumpe** in der Zellmembran inaktiv [28, 40]. Dies hat zur Folge, dass Natrium passiv in die Zelle strömt, während Kalium kontinuierlich aus der Zelle in das



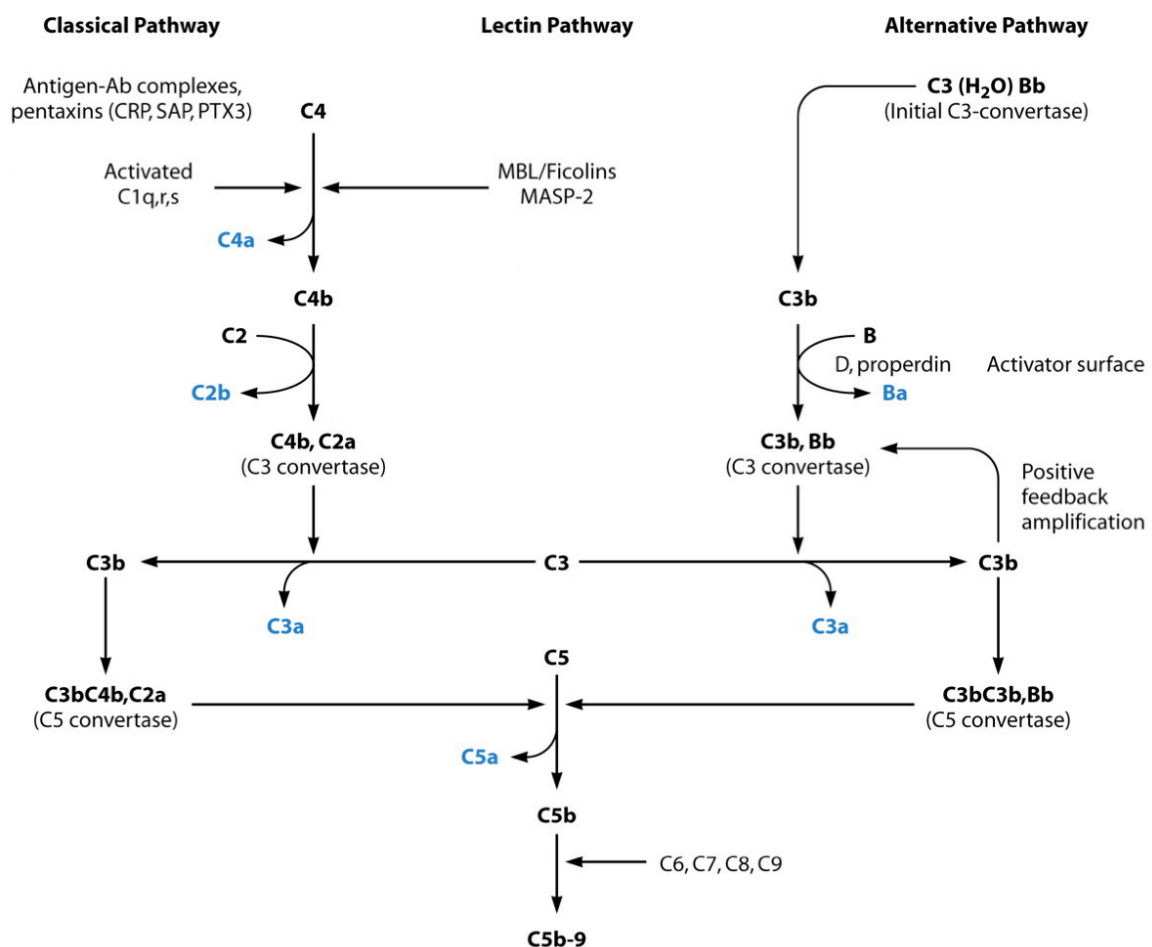
Lagermedium austritt. Auch wenn dies ein reversibler Prozess ist und sich die Natriumkonzentration innerhalb von 24 Stunden normalisieren kann, so dauert es vier Tage bis in den Zellen wieder ein normaler Kaliumspiegel erreicht wird [28, 41, 42]. Hohe Kaliumkonzentrationen können in Neugeborenen und Kleinkindern bei großem Transfusionsvolumen zu Arrhythmien bis hin zum Herzstillstand führen [43]. Daher finden z.B. in der Kinderchirurgie nur frische oder sogar gewaschene Erythrozytenkonzentrate Anwendung [41, 44, 45].

Auch wenn Lagerschäden bereits umfassend in der Literatur beschrieben wurden, ist die klinische Relevanz in einigen Teilen noch immer unklar. [3, 15, 26, 32, 41, 46-50]. Dabei wurde das Komplementsystem kaum berücksichtigt.

## 1.3 Das Komplementsystem

### 1.3.1 Allgemein

Das Komplementsystem ist Teil der angeborenen Immunantwort. Ende des 19. Jahrhunderts beschrieb Paul Ehrlich es als jene Aktivität des Blutserums, das die Aktivität der Antikörper „komplementiert“ – also vervollständigt. Das Komplementsystem umfasst ca. 30 Glykoproteine, die in der Leber synthetisiert werden und anschließend in gebundener oder löslicher Form in den Blutkreislauf gelangen. Dort trägt es, teils zusammen mit Antikörpern, teils antikörperunabhängig, zur Infektionsabwehr bei. Die Proteine des Komplementsystems sind im Blutplasma stets gegenwärtig. Je nach Aktivierungsart unterscheidet man den klassischen Weg, den alternativen Weg oder den Lektinweg (siehe Abb. 6) [5].



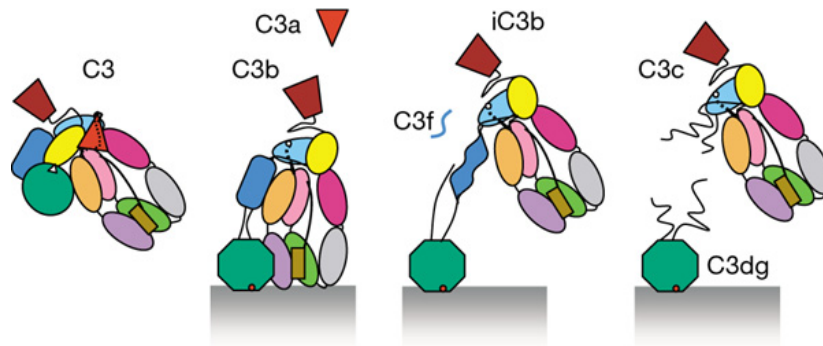
**Abbildung 6:** Die drei Hauptaktivierungswege der Komplementkaskade des Immunsystems, der klassische, der alternative und der Lektin Weg. Nach Ram et al. 2010 [51].

**Der klassische Weg** der Komplementaktivierung geschieht durch Antigen-Antikörper-Komplexe. Antikörper vom Typ IgM (frühes Infektionsstadium) und vom Typ IgG (spätes Infektionsstadium) binden an Mikroorganismen, z.B. Bakterien. Dabei exponieren die Antikörper ihren Fc-Anteil und das Komplementprotein C1 kann binden. C1 wird aus den Untereinheiten C1q, C1r und C1s gebildet, wobei C1q die größte und wichtigste Untereinheit ist, denn diese vermittelt die Bindung an den Antikörper. Es folgt eine Reaktionskaskade, die schließlich zur Lyse des Bakteriums führt: Komplementfaktor C1 wird aktiviert, indem der Antigen-Antikörper-Komplex an die Untereinheit C1q bindet. Dies führt zu einer Konformationsänderung. C1s spaltet proteolytisch die Faktoren C2 und C4. Daraus entstandenes C2a und C4b bilden dann die klassische C3-Konvertase (C4b2a). Diese Konvertase spaltet nun C3, wodurch der zentrale Faktor C3b entsteht. Zusammen mit C4b2a bildet er nun die klassische C5 Konvertase (C4b2a3b), die wiederum C5 proteolytisch in C5a und C5b spaltet. Das größere Fragment C5b bindet anschließend die Komplementproteine C6, C7, C8 und C9. Somit entsteht der so genannte Membrane-Attack-Complex (MAC), durch den es in der Membran des Mikroorganismus zur Porenbildung und darauffolgend zur Osmose und Lyse kommt [52, 53]. Es gibt jedoch auch noch andere Faktoren wie Lektin oder C-reaktives Protein, welche wie C1q ebenfalls die Komplementkaskade auslösen können [52, 54].

**Der alternative Weg** der Komplementaktivierung ist antikörperunabhängig. Die Initiierung erfolgt durch die direkte Bindung von C3b an eine pathogene Oberfläche. C3b kann durch spontane Hydrolyse entstehen. Im Normalfall wird C3b von den Faktoren H und I inaktiviert, bindet es jedoch an die Oberfläche eines Mikroorganismus oder Fremdkörpers, so stabilisiert es sich und wird verstärkt. Durch proteolytische Spaltung des Kofaktors B in Ba und Bb entsteht die alternative C3 Konvertase (C3bBb). Durch weitere C3b Moleküle wird die C5 Konvertase (C3bBb3b) gebildet, die den Komplementfaktor C5 spaltet. Entsprechend dem klassischen Weg bildet auch hier C5b mit C6, C7, C8 und C9 den MAC und es kommt zur Lyse des pathogenen Organismus [52].

Nach der klassischen oder alternativen Komplementaktivierung wird C3 gespalten, wobei das C3b-Fragment membranständig auf der Zielzelloberfläche verbleibt. Eine weiterführende Komplementaktivierung kann zum Beispiel durch Faktor I verhindert werden. Es entsteht ein inhibiertes C3b Molekül (iC3b), welches proteolytisch von der

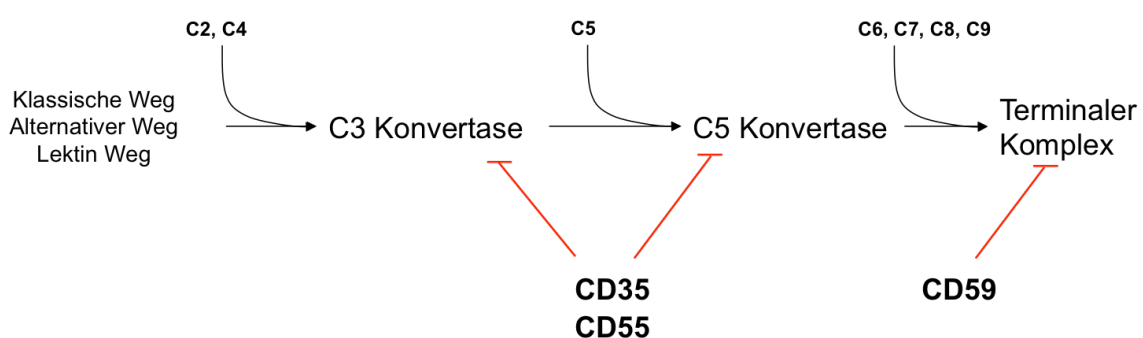
Zielzelle gespalten wird. Eine weitere Anlagerung weitere Komplementfaktoren (C5-C9) ist nicht mehr möglich. Auf der Zelloberfläche verbleibt das C3dg Molekül als Nachweis einer vorausgegangenen Komplementaktivierung (Abb. 7).



**Abbildung 7:** detaillierte Ansicht zur Spaltung von C3 und Entstehung von C3d (aus Janssen et al 2006) [55].

### 1.3.2 Die Komplementrezeptoren und Regulatorproteine

Es gibt weitere Regulatoren, die die Komplementaktivierung oder deren Ausgang steuern können. Dazu zählen vor allem CD35, CD55 und CD59, die auf verschiedenen Ebenen eine Komplementaktivierung beeinflussen können (siehe Abb. 8).



**Abbildung 8:** Der Komplementrezeptor CD35 und das Regulatorprotein CD55 wirken hemmend auf die C3 Konvertase und die C5 Konvertase der Komplementkaskade. CD59 inhibiert die Bildung des Membran-Attack-Komplexes in letzter Instanz [56].

Der **Komplementrezeptor 1 (CR1; CD35; C3b/C4b-Rezeptor)** ist ein membrangebundenes Glykoprotein und zählt zu den Regulatoren der Komplement-Aktivitäts-Familie (engl. regulators of complement activation, RCA) [57, 58]. Er wird auf

Erythrozyten, Monozyten, Makrophagen, Leukozyten, B-Zellen, folliculären dendritischen Zellen und einigen T-Zellen exprimiert. Es existieren vier Subtypen – Allele A, B, C, D – die sich in Größe, Bindestellenanzahl und Häufigkeit unterscheiden [59]. Der mit 81 % am häufigsten exprimierte ist der 190 kDa große CR1-A, gefolgt von CR1-B (18 %, 220 kDa), CR1-C (1 %, 160 kDa) und CR1-D (< 1 %, 250 kDa) [57]. Durch genetischen Polymorphismus des CR1 erklärt sich die unterschiedliche CR1-Dichte auf der Zelloberfläche [57]. Die Mittlere Anzahl an CR1 pro Erythrozyt reicht von 150 bis 1200 [60], wohingegen eine solche Dichteveriabilität z.B. auf Leukozyten nicht beschrieben wird [61]. Eine abnehmende Expression von CR1 wird in Zusammenhang mit verschiedenen Krankheiten beschrieben, z.B. SLE oder Rheumatoide Arthritis [62-64]. Doch auch während der normalen Erythrozytenlebensspanne sinkt die CR1 Expression *in vivo* [65]. Der CR1 hat unterschiedliche biologische Funktionen [62]:

- **Regulation der Komplementkaskade:** Das CR1 Molekül agiert als Rezeptor für C3b und C4b, wobei es die Konvertasen C3 und C5 des klassischen und des alternativen Weges destabilisiert und hemmt. Des Weiteren fungiert CR1 als wichtiger Kofaktor für die durch Faktor I vermittelte Inaktivierung von C3b und C4 im alternativen Weg. Die Rolle von CR1 als MBL-Rezeptor (Mannan bindender Lektin Rezeptor) könnte auch im Lektin Weg von Bedeutung sein [66-69].
- **Beseitigung von Immunkomplexen:** Der erythrozytäre CR1 ist in der Lage C3b/C4b-opsonisierte Immunkomplexe zu binden und auf der Erythrozytenmembran zu immobilisieren. Es folgt der Transport zu den Makrophagen in Leber und Milz, wo die Immunkomplexe metabolisiert werden [70, 71].
- **Rezeptor für Phagozytose:** Immunkomplexe und pathogene Partikel, an denen C3b gebunden hat, werden von CR1 vor allem auf polymorphkernigen Zellen und Monozyten erkannt [72]. Fc-gamma Rezeptoren und CR1 arbeiten synergistisch bei der Aufnahme der Partikel. Im Zellinneren kommt es dann zur Zerstörung durch Lysosomen [73, 74].

**CD55**, auch **DAF (Decay-accelerating-Faktor)** genannt, ist ein Glykoprotein, das wie auch CD35 zur RCA-Family gehört, und auf Chromosom 1 kodiert ist. Es ist ein einzelkettiges Membranprotein von 70kDa. Sieben Isoformen sind bekannt, wovon drei in löslicher Form vorliegen und auf wesentlich niedrigerem Level exprimiert werden. Im

Rahmen der Komplementaktivierung entstehen aus C3 und C4 die Spaltprodukte C4b und C3b. Binden C4b und C3b Moleküle an die Zelloberfläche, ist CD55 in der Lage dies zu erkennen und zu interagieren. CD55 verhindert, dass die Polypeptide C4b und C3b die Umwandlung von C3 und Faktor B zu enzymatisch aktiven C2a und Bb katalysieren können. Somit wird die Formation der C3 Konvertasen (C4b2a und C3bBb) gehemmt [75]. Der MAC wird in Folge dessen nicht gebildet. Durch diese Unterbrechung der Komplementkaskade wird die Wirtszelle vor Schäden geschützt [75-77].

**CD59** ist ein Membranprotein und ein starker Inhibitor des Membran-Attack-Complexes und wird daher auch **MAC-Inhibitor Protein** genannt. Es ist ein kleines, 20 kDa großes globuläres Membranprotein. Es existieren weitere Synonyme wie Protectin oder Membran Inhibitor of Reactive Lysis (MIRL). CD59 bindet C5b-C8 und verhindert die Anlagerung weiterer C9 Moleküle wodurch der MAC nicht gebildet werden kann. Des Weiteren spielt das Protein im Signaltransduktionsweg der Aktivierung von T-Zellen eine Rolle [76, 78, 79]. Mutationen, die CD55 und CD59 betreffen, können beim betroffenen Patienten z.B. paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie auslösen [80].

## 1.4 Die Erythrophagozytose

Während ihrer Lebensspanne von ca. 120 Tagen legen Erythrozyten im menschlichen Kreislauf eine weite Strecke zurück und überstehen dabei immer wiederkehrende hohe Turbulenzen, starke Scherkräfte und extreme Druckverhältnisse [81]. Da es bei Erythrozyten den apoptotischen Signalweg im klassischen Sinne nicht gibt, muss es für Erythrozyten einen speziellen Mechanismus geben, der zur Erkennung durch Makrophagen nach einer definierten Lebensspanne zur Aussonderung führt. Bisher wurde eine große Anzahl an Modifikationen in alternden Erythrozyten beschrieben. Sie sind kleiner, dichter, weniger elastisch, viele Enzyme zeigen eine erniedrigte Aktivität, kleine Mengen an Hämoglobin sind denaturiert und an die innere Membran gebunden und alternde Erythrozyten binden vermehrt „natürlich auftretende Antikörper“ (NABs) [82].

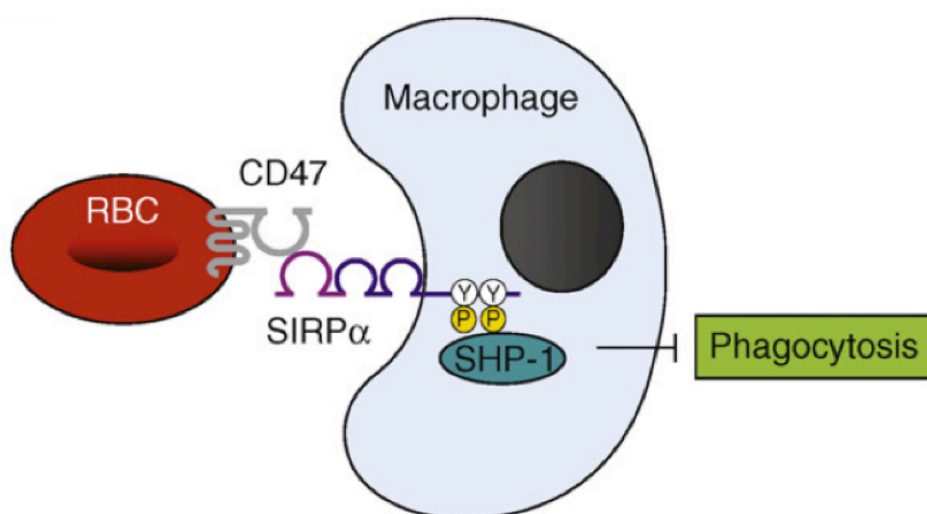
Die äußere Erythrozytenmembran ist non-immunogen und non-adhäsiv. Zum einen wird damit eine Endotheladhäsion vermieden, zum anderen eine frühzeitige Phagozytose durch Makrophagen in Milz, Leber, oder rotem Knochenmark verhindert [81]. Im Verlauf häufen sich auf der Membran alternder Erythrozyten sogenannte „eat me“ Signale an und es kommt zu einer Verminderung der „don't eat me“ Signale. Zu den wichtigsten Vertretern zählen alterungsbedingte Konformationsänderungen des sog. „Senescent cell Antigen“ (Band-3 Protein), die Externalisierung von Phosphatidylserin und der Verlust von CD47 („Marker of Self“).

Das **Band-3 Protein** ist ein integrales Membranprotein. Es stellt 25 % aller erythrozytären Membranproteine dar und dient als Hauptligand natürlich auftretender Antikörper (NAB) [81-84]. Das Protein Band-3 besitzt zwei unabhängige Domänen. Die membranseitige Domain katalysiert den Anionenaustausch (vor allem von  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ ) und enthält die Antigen determinante, die von NABs erkannt werden [82]. Die Domain auf zyttoplasmatischer Seite bindet an verschiedene Proteine: Zytoskeletproteine, glykolytische Enzyme (Aldolase, GAPDH, Phosphofruktokinase), Produkte durch Hämoglobin denaturierung, Tyrosinkinase [82]. Es scheint, dass jede dieser Interaktionen einen zentralen Effekt auf Struktur und Funktion des Erythrozyten hat [82, 85]. In alten Erythrozyten kommt es dann zu einer vermehrten Anlagerung von Anti-Band-3 IgG. Dadurch wird die Komplementkaskade aktiviert und die Komplementamplifikation von

C3 zu C3b bewirkt. Die Erkennung dieser so durch C3b opsonisierten Erythrozyten erfolgt über CR1 oder Fc-gamma Rezeptoren von Phagozyten [81].

**Phosphatidylserin** ist Bestandteil der Zellmembran. In vitalen Zellen ist es nur intrazellulär vorzufinden. Bei zunehmenden Membranschädigungen vor allem durch Alterungsprozesse oder durch verschiedene Substanzen kann die Zellmembran geschädigt werden. Dies führt dazu, dass Phosphatidylserin externalisiert wird, was dann von Makrophagen erkannt wird [86].

Im Jahr 2000 haben Oldenborg et. al. das Membranprotein **CD47** als weiteren wichtigen Faktor in der Regulation der Erythrophagozytose identifiziert. Im Gegensatz zu den oben genannten „eat me“ Signalen zeigte sich, dass CD47 die Phagozytose durch Makrophagen inhibiert – also ein sogenanntes „don't eat me“ Signal darstellt [87-92]. CD47 ist ein ubiquitär exprimiertes 50kDa großes Transmembranprotein. Es besteht aus einer glykosylierten extrazellulären IgV Domain, hydrophoben fünffachen transmembran Domains und einem zytoplasmatischen Schwanz. CD47 auf Erythrozyten wird von einem Signal-Regulations-Protein-alpha (SIRP-alpha) auf Makrophagen erkannt. Diese Interaktion zwischen CD47 Molekülen auf Erythrozyten und SIRP-alpha Rezeptoren auf Makrophagen, sendet ein negatives Signal an die Makrophage, wodurch der Erythrozyt vor Phagozytose geschützt wird (Abb. 9) [87, 88, 93].



**Abbildung 9:** Negativregulation der Phagozytose durch CD47-SIRP-alpha Bindung. Abbildung aus Matozaki et al 2008 [94].



## 2 Zielsetzung

Pro Jahr werden 75 Millionen Erythrozytenkonzentrate weltweit transfundiert, wobei weniger als 1% der Konserven frisch (< 5 Tage Lagerungszeit) transfundiert werden. Die Lagerung von Erythrozytenkonzentraten kann zu unterschiedlichen Schäden des Blutproduktes führen, möglicherweise einhergehend mit einem schlechteren klinischen Outcome für transfundierte Patienten. Bislang wurden metabolische, biomechanische und oxidative Lagerschäden von Erythrozytenkonzentraten beschrieben. Welche Rolle Komplement bei der Lagerung spielt ist nicht bekannt und wurde bislang kaum untersucht.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollen mögliche Komplement-vermittelte Schäden festgestellt werden. Dies beinhaltet die Messung der Expression von CD35, CD55, CD59 und C3d über die Lagerungszeit mit Hilfe der Durchflusszytometrie. CD35 und C3d wurden zusätzlich vor und nach einer Transfusionssimulation untersucht. Um festzustellen, wodurch eine mögliche beschleunigte Phagozytose gelagerter Erythrozyten vermittelt ist, wurde C3d (Komplementabhängige Phagozytose), CD47 (Loss-of-self-vermittelte Phagozytose) und Antikörper vom Typ IgG, IgM und IgA (Fc-gamma Rezeptor-vermittelte Phagozytose) mituntersucht. Dabei wurden 11 Erythrozytenkonzentrate unter standardisierten Blutbankbedingungen hergestellt und gelagert. Die Untersuchungen erfolgten wöchentlich über einen Zeitraum von 6 Wochen je Konserve.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Antikörper, Antisera und Proteine

**Tabelle 1:** Antikörper, Antisera und Proteine

Material	Farbe	Klon	Konzentration	Reaktivität	CAT/REF	Firma
Anti-C3d	FITC		1:500	human	F0323	DAKO, Glostrup, Denmark
Anti CD35	APC	E11	1:100	human	17-0359-42	eBioscience, San Diego, USA
Anti CD47	PerCP/Cy5.5	CC2C6	1:500	human	323110	BioLegend
Anti CD55	PE	JS11	1:100	human	311308	BioLegend
Anti CD59	Pacific Blue	MEM-43	1:500	human	PB-233-T100	EXBIO, Prag, Tschechien
Anti-IgA			1:1		804541	Bio-Rad Medical Diagnostics GmbH, Dreieich Germany
Anti-IgG			1:1		804501	Bio-Rad
Anti-IgM			1:1		804521	Bio-Rad
Anti-C3d			1:40		A0063	DAKO, Glostrup, Denmark
Beriglobin, 2ml FSP			1:50		PZN 4616086	CSL Behring, Marburg, Germany

##### 3.1.2 Puffer und Medien

**Tabelle 2:** Einzelkomponenten für Puffer und Medien

Produktname	CAT/REF	Firma
PBS Dulbecco, steril	L 1820	Biochrom AG, Berlin, Germany
ID-Diluent 2	009280	DiaMed GmbH, Cressier FR Switzerland
Albumin solution, from bovine Serum (BSA), 22 %	A7034-100 ml	SIGMA-Aldrich, St. Louis, USA

PBS wurde zunächst in 10facher Konzentration hergestellt. Hierzu wurden 80g NaCl, 2 g KCl, 14,1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 2,4 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 800 ml destilliertem Wasser aufgefüllt. Nachdem der pH auf 7,4 eingestellt wurde, erfolgte die endgültige Auffüllung auf 1 Liter. PBS / BSA 0,1% wurde im weiteren Verlauf hergestellt, in dem 497,73 ml einfaches

PBS (100 ml PBS 10fach + 900 ml destilliertes Wasser) und 2,27ml BSA (22 % ) miteinander vermengt wurden.

### 3.1.3 Geräte

**Tabelle 3:** Verwendete Geräte

Gerätetyp	Gerätename	Firma
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments
Zentrifuge	Centrifuge 5415 C	Eppendorf
Diamed Zentrifuge	ID-Centrifuge 24 S, DiaMed-ID Micro Typing System	DiaMed, Ottobrunn, Germany
FACS	BD FACS Canto II FLOW Cytometer (REF: 338962)	BD Bioscience, San Jose, USA
Thermoschüttler	Eppendorf Thermomixer Compact	Eppendorf

### 3.1.4 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 4:** Verbrauchsmaterialien

	Produktname	Katalognummer	Firma
15 ml Tubes	Falcon Blue max Jr. 15ml Polypropylene Conical Tube	352097	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
1,5 ml Tubes	SafeSeal Gefäß 1,5 ml	72.706	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
FACS Röhrchen	BD Falcon 5 ml Polystyrene Round-Bottom-Tube	352052	BD Bioscience, Franklin Lakes USA
2 ml Pipetten	Costar Stripette	4486	Corning incorporated, New York, USA
5 ml Pipetten	Costar Stripette	4487	Corning Incorporated, New York, USA
10 ml Pipetten	Falcon Serolocival Pipet	357551	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
25 ml Pipetten	Falcon Serological Pipet	357525	Becton Dickinson Labware, Franklin Lades, USA
Pipetten	0.5 – 10 µl 10 – 200 µl 100 – 1000 µl		Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	0.5 – 10 µl 10 – 200 µl 100 – 1000 µl		PeqLab GmbH, Deutschland
Coombskarte	NaCl, Enzyme Test and Cold Agglutinins	50520.69.07	Bio-Rad DiaMed GmbH Cressier Switzerland
EDTA Röhrchen	EDTA K2 Vacutainer	367861	BD
Serum Röhrchen	Vacutainer SST II Plus	367953	BD
Transferbeutel	Compoflex	3FR00P4159	Fresenius Kabi AG 61346 Bad Homburg, Germany

### 3.1.5 Zusammensetzung Erythrozytenkonzentrat

Am Institut für Transfusionsmedizin der Charité werden derzeit Vierfach-Beutel DQE 7241LC (MacoPharma International GmbH) mit einem integrierten Vollblutfilter benutzt. Der Vollblutbeutel enthält CPD (Citrat, Phosphat, Dextrose) als Stabilisator, der Erythrozytenkonzentratbeutel PAGGS-M als Additivlösung. Verwendet werden Vierfachbeutel DQE 7241LC (MacoPharma International GmbH) mit integriertem Vollblutfilter. Der Vollblutfilter enthält 70 ml CPD, der Erythrozytenkonzentratbeutel 110 ml PAGGS-M. Human-Erythrozyten aus einer einzelnen Vollblutspende, Hämatokrit 0,50 bis 0,65.

#### Sonstige Bestandteile:

1ml enthält:

0,283-0,397 ml PAGGS-M Additivlösung

0,054-0,083 ml Plasma

0,013-0,020 ml CPD Stabilisator

#### 100 ml Stabilisator CPD (nach Ph Eu) enthalten:

- Citronensäure-Monohydrat 327 mg
- Natriumcitrat x 2H<sub>2</sub>O 2,63 g
- Glukose-Monohydrat 2,55 g
- Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat 251 mg
- Aqua ad iniectabilia ad 100 ml

#### 100 ml Additive Lösung PAGGS-Mannitol enthalten:

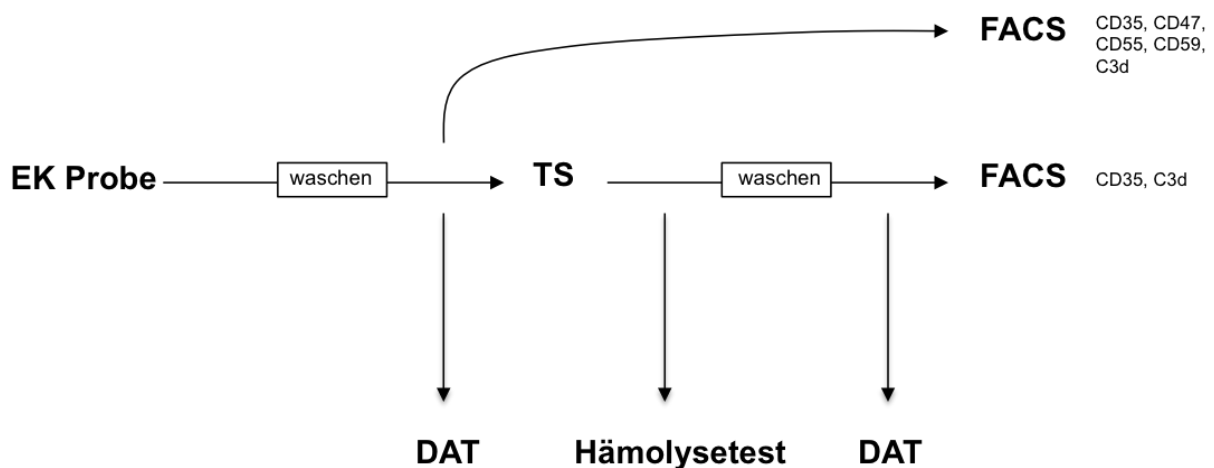
- Glukose-Monohydrat 940 mg
- Natriumdihydrogenphosphat -Dihydrat 125,5 mg
- Dinatriumhydrogenphosphat -Dihydrat 143,2 mg
- Adenin 19,4 mg
- Guanosin 40,8 mg
- Mannitol 1,0 g
- Natriumchlorid 421 mg
- Aqua ad iniectabilia ad 100 ml

Restgehalte an Leukozyten: < 1x10<sup>6</sup> / Einheit

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Prozessübersicht

Um Veränderungen in Erythrozytenkonzentraten eruieren zu können, wurden diese unter standardisierten Blutbankbedingungen gelagert. Im Laufe ihrer Haltbarkeit wurde für Experimente wöchentlich eine kleine Probe durch das sterile Anschweißen eines Transferbeutels von den Konserven entnommen. Die Proben wurden nach immer gleichem Ablauf prozessiert und untersucht. Alle Erythrozyten wurden gewaschen. Anschließend wurden die Proben einer Transfusionssimulation unterzogen (Inkubation mit Serum bei 37°C, 30 Minuten). Sowohl vor als auch nach Transfusionssimulation (TS) wurde ein direkter Agglutinationstest (DAT) auf IgG, IgM, IgA und C3d durchgeführt. Ebenso wurden die Erythrozyten mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS) auf Oberflächenproteine untersucht: CD35, CD55, CD47, CD59 und C3d vor TS und C3d und CD35 nach TS. Eine übersichtliche Darstellung kann Abbildung 10 entnommen werden.



**Abbildung 10:** Dargestellt ist eine zusammenfassende Übersicht über die experimentellen Abläufe, nach Gewinnung der Proben aus Erythrozytenkonzentraten (EK). Transfusionssimulation (TS), Direkter Agglutinationstest (DAT), Durchflusszytometrie (FACS).

### **3.2.2 Gewinnung und Vorbereitung der Proben**

#### **Erythrozytenkonzentrate**

Die Spender der Erythrozytenkonzentrate waren freiwillige Spender, die ausschließlich zum Zweck dieser Studie gespendet haben und die die allgemeine Voraussetzung zur Zulassung zum Spenden erfüllten. Es handelte sich insgesamt um elf Blutspender (drei weiblich, 8 männlich), das durchschnittliche Alter betrug hierbei 27,1 Jahre. Zwei waren AB RhD positiv, drei 0 RhD positiv, drei A RhD positiv, zwei B RhD positiv und einer war 0 RhD negativ.

Die Spender wurden in den normalen Ablauf der Blutspende der Charité eingegliedert und durchliefen den üblichen Vorgang zum Blutspenden. Die Herstellung des Erythrozytenkonzentrates erfolgte in den Laboren der Blutspende der Charité. Die Freigabe durch einen Facharzt der Transfusionsmedizin der Charité erfolgte am darauffolgenden Tag. Die Erythrozytenkonzentrate wurden in dafür vorgesehenen Kühlschränken bei 4°C gelagert. Am Tag 1, Tag 7, Tag 14, Tag 21, Tag 28, Tag 35, und Tag 42 nach der Herstellung wurde, mit Hilfe pädiatrischer Transferbeutel unter sterilen Bedingungen, jeweils eine kleine Menge (ca. 10 – 12 ml) Erythrozytenkonzentrat entnommen. Etwa 500 µl der Erythrozyten wurden in 1,5 ml Eppendorftubes für diese Studie überführt. Der Rest diente anderen hier nicht genannten Studien.

#### **Frischblut**

Frisches Blut wurde von Thrombozytenspendern entnommen, welche schon als gesunde Spender gelistet, und deren Blutgruppen bekannt waren. Die Anzahl der Frischblutproben war immer von der Anzahl der benötigten Blutgruppen eines Versuchstages abhängig. Es wurden Serumröhrchen und EDTA-Röhrchen entnommen. Frischblutproben (FB) dienten zum einen dazu jeweils frisches homologes Serum für die Transfusionssimulation zu haben, zum anderen wurden die Erythrozyten (EDTA) als Kontrollen mitgeführt. Die frischen Blutproben wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gekühlt.

Die Frischblutproben wurden zentrifugiert (10Min, 1500xg), um die Erythrozyten vom Plasma bzw. Serum zu trennen. Für das weitere Vorgehen wurden pro Blutgruppe nun zwei Eppendorftubes vorbereitet:

- reines Serum aus dem Serum-Röhrchen,
- 500 µl Erythrozyten aus dem EDTA-Röhrchen,

Die Erythrozyten aus dem EDTA Röhrchen wurden analog zu den Erythrozyten aus den Blutkonserven drei Mal mit PBS/BSA gewaschen. Es wurde stets darauf geachtet die Kühlkette, auch bei Probeentnahme und Transport der Erythrozytenkonzentrate und Frischblutproben, nicht zu unterbrechen.

### **3.2.3 Hämolysetest und Transfusionssimulation**

Für eine „Transfusionssimulation“ wurden Erythrozyten mit Serum inkubiert. Zu erwähnen ist, dass es sich hierbei nicht um eine physiologische Simulation handelt. Die Erythrozyten wurden mit einem Überangebot an Serum inkubiert, der Hämatokrit lag bei 5%. Zunächst wurde eine 50 % Lösung der zuvor gewaschenen Erythrozyten hergestellt: 50 µl aus den beim Waschgang durch Zentrifugation abpelletierten Erythrozyten wurden mit 50 µl PBS/BSA zu einer homogenen Lösung vermengt.

Zwanzig µl der 50 %-igen Erythrozyten wurden mit 200 µl Serum – homolog zur Erythrozytenkonzentratprobe, autolog zur Frischblutprobe – bei 37°C für 30 Minuten auf einem Schüttler inkubiert. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurden die Proben für 30 Sekunden kurz abzentrifugiert und der Überstand auf mögliche Hämolysereaktionen betrachtet. Setzten sich die Erythrozyten als kleines rotes Pellet vom klaren Serum ab, so war der Hämolysetest *negativ*. Im Anschluss daran wurden die Proben erneut 3 mal gewaschen.

### **3.2.4 Durchflusszytometrie**

In der Durchflusszytometrie passieren Zellen oder andere Partikel einzeln nacheinander eine Lichtquelle, wodurch deren Form und Größe charakterisiert werden können. Des Weiteren können dabei unterschiedliche physikalische und chemische Eigenschaften

analysiert werden. Es können neben der relativen Größe auch Granularität, innere Beschaffenheit und Fluoreszenzintensität bestimmt werden. Bei dem hier verwendeten Gerät handelt es sich um das Gerät BD FACSCANTO II.

Antigene werden auf Zellen durch fluoreszierende Antikörper markiert. Im Flüssigkeitssystem werden die Zellen in einen Flüssigkeitsstrom gebracht, sodass sie nacheinander den Laserstrahl passieren (hydrodynamische Fokussierung). Durch eine Linse wird der Laserstrahl fokussiert, sodass er auf die hydrodynamisch fokussierten Partikel/Zellen trifft, die einzeln durch ihn hindurchwandern. Die Streustrahlung (FSC/SSC) wird durch Filter gelenkt und von Detektoren (FSC Detektor in einem Winkel von 0-10°, SSC bei etwa 90°) erfasst und anschließend in elektrische Signale umgewandelt. Die Fluoreszenz wird ebenfalls durch verschiedene farb-selektive Filter gelenkt und von photosensitiven Detektoren erfasst, den PMTs (Photomultiplertubes). Anschließend wird auch hier das Signal elektronisch umgewandelt [95].

### **Verarbeiten der Proben für die Durchflusszytometrie**

Sowohl die Proben vor der TS als auch nach der TS waren bereits drei Mal gewaschen und somit für die durchflusszytometrischen Untersuchungen vorbereitet. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Aus den Erythrozytenproben wurde eine 10 %-ige Erythrozytensuspensionen mit PBS/BSA hergestellt (10 µl Erythrozyten + 90 µl PBS/BSA). Ebenso wurde für die entsprechend benötigte Menge des Versuchstages ein MasterMix hergestellt, der aus dem jeweiligen fluoreszenzmarkierten Antikörper (AK) und Berliglobin in PBS/BSA bestand.

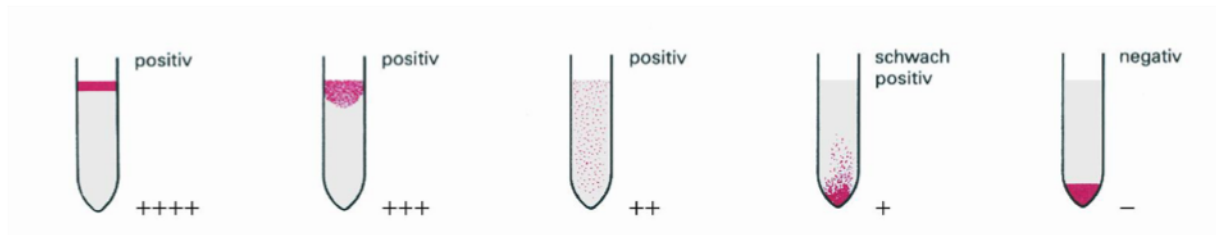
Je 95 µl des AK-Cocktails wurden in FACS-Tubes vorgelegt, anschließend wurden je 5 µl der Erythrozytensuspensionen hinzugegeben und 30 min. lang bei 4°C inkubiert. Dabei wurden für CD35, CD55, CD59, C3d und CD47 Einzelfärbungen durchgeführt. Die Interaktion der Antikörper mit den Erythrozyten wurde gestoppt, indem 2 ml PBS/BSA hinzugegeben wurde. Anschließend wurden die Proben zum Entfernen der überschüssigen Antikörper für 2 Minuten bei 500 x g zentrifugiert, der Überstand abgekippt und das Pellet mit 500 µl PBS/BSA resuspendiert. Die Proben wurden zeitnah (< 2 h) untersucht, wobei sie bis dahin im Dunkeln und auf Eis zwischengelagert wurden.



### 3.2.5 Direkter Coombstest

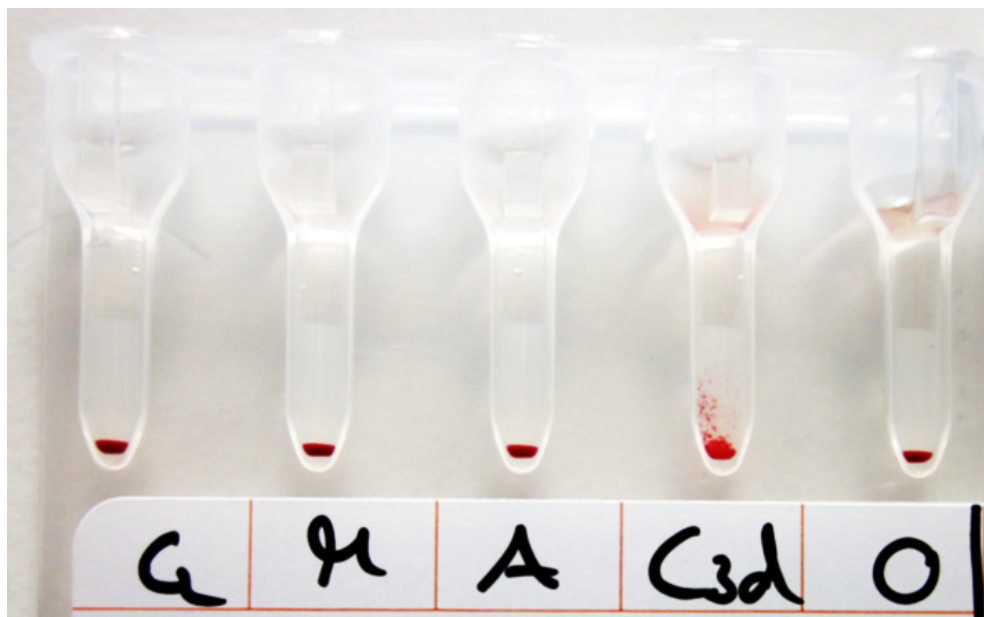
Der direkte Coombstest (Direkter Agglutinations Test, DAT) ist ein Verfahren, in dem membrangebundene Antikörper auf Erythrozyten nachgewiesen werden können. In der Regel handelt es sich hierbei um Antikörper vom Typ IgG. Im Rahmen der Arbeit wurde der Test jedoch angewendet, um sowohl Immunglobuline vom Typ IgG, IgA, IgM als auch membrangebundenes C3d nachzuweisen. Das Prinzip besteht darin, durch Zugabe von anti-humanen Immunglobulinen bzw. anti-humanem C3d die membrangebundenen Immunglobuline, bzw. das C3d zu binden und dadurch die Zellen miteinander zu vernetzen (Agglutination). Durch diesen Vorgang, wird die Reaktion makroskopisch sichtbar. Der Test wurde in neutralen Gelkarten (NaCl-Gelkarten) der Firma DiaMed durchgeführt. Eine Karte enthält 6 Mikroröhrchen mit je einer Reaktionskammer und einer Gelmatrix aus Dextranskugeln in Suspensionsflüssigkeit.

Mit Hilfe einer Einwegpipette wurden die Proben in einem Glasröhrchen mit Diluent-2 aufgeschwemmt, sodass eine 2 %-ige Erythrozytenlösung entstand. Fünfzig µl dieser Erythrozytensuspension wurden nun jeweils in die Reaktionskammer der Gelkarte vorgelegt. Im Anschluss daran wurde in jedes Mikroröhrchen 1 Tropfen eines Antihumanglobulins bzw. 1 Tropfen des Antihuman C3d hinzugefügt. Als Negativkontrolle wurde ein Mikroröhrchen nur mit der Erythrozytenprobe versehen. Die Gelkarten wurden nun in der DiaMed-Zentrifuge für 10 Minuten zentrifugiert. Im Falle vorhandener membrangebundener Immunglobuline oder C3d, würden die Erythrozyten miteinander vernetzen und während der Zentrifugation in Abhängigkeit der Agglutinationsstärke sedimentieren. Sinken alle Erythrozyten auf den Grund des Mikroröhrchens und sind als eindeutiges, glattbegrenztes Sediment zu erkennen, so spricht man von einem negativen direkten Coombstest. Wenn agglutinierte Erythrozyten während der Zentrifugation jedoch von der Gelmatrix aufgehalten werden, so spricht man von einer positiven Reaktion. Hierbei werden unterschiedliche Reaktionsstärken unterschieden (Abb. 11).



**Abbildung 11:** Reaktionsstärken aus der DIaMed-ID Arbeitsanleitung 2010 [96].

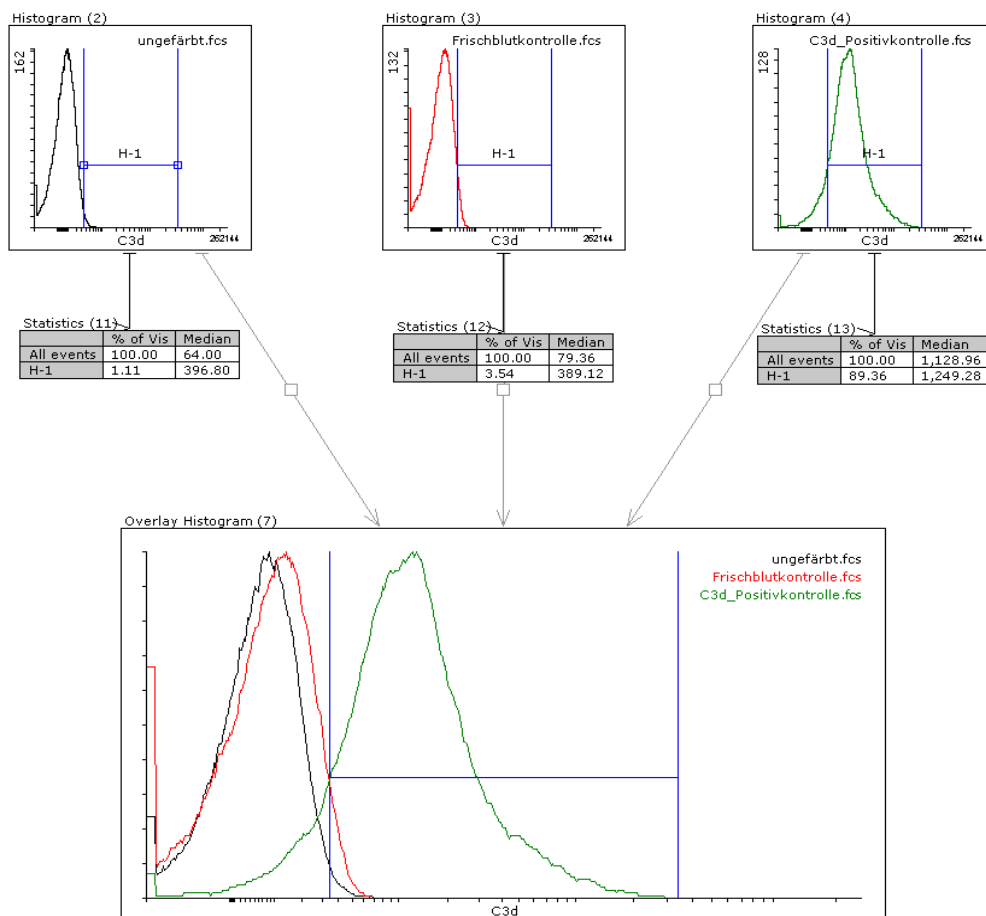
Der direkte Coombstest wurde in den Gesamtablauf eingegliedert (s. Prozessablauf Abb. 10), somit entsprachen die Proben den Erythrozytenkonzentraten, welche auch für die FACS-Untersuchung verwendet wurden. IgG, IgM und IgA wurden am 21. und 42. Tag der Lagerung bestimmt, jeweils vor und nach Transfusionssimulation. C3d wurde hingegen wöchentlich bestimmt und ebenfalls vor und nach Transfusionssimulation. Ein repräsentatives Beispiel stellt Abbildung 12 dar.



**Abbildung 12:** Darstellung einer NaCl-Gelkarte nach Direktem Coombstest. Für IgG (G), IgM (M), IgA (A) und die Negativkontrolle (0) ist ein negatives Ergebnis zusehen. Das Ergebnis für C3d wäre mit + zu bewerten.

### 3.2.6 Statistische Auswertung der FACS Daten

Die Daten, die mit dem FACS Canto II und der dazugehörigen FACS DIVA Software generiert wurden, wurden zunächst auf einen externen Datenträger exportiert und auf dem Server der Arbeitsgruppe abgelegt. Die weitere Auswertung erfolgte dann mit Hilfe der Flowing Software (University of Turku, Finnland). Zuerst wurde die Erythrozytenpopulation im FCS/SSC DotPlot gegatet. Nachfolgend wurden für die jeweiligen Antigene Histogramme erstellt, wobei die Gates mit Hilfe der ungefärbten Negativkontrollen eingestellt wurden (Siehe Abb. 12, „H-1“, links (ca. 1%)). Daran orientiert, sieht man bei den Frischblutkontrollen eines gesunden Spenders einen minimalen Anstieg von C3d-FITC (3,2%), wobei die Positivkontrolle für C3d einen großen Shift nach rechts zeigt (89 %). Eine schematische Darstellung der Auswertung ist in Abbildung 13 gegeben.



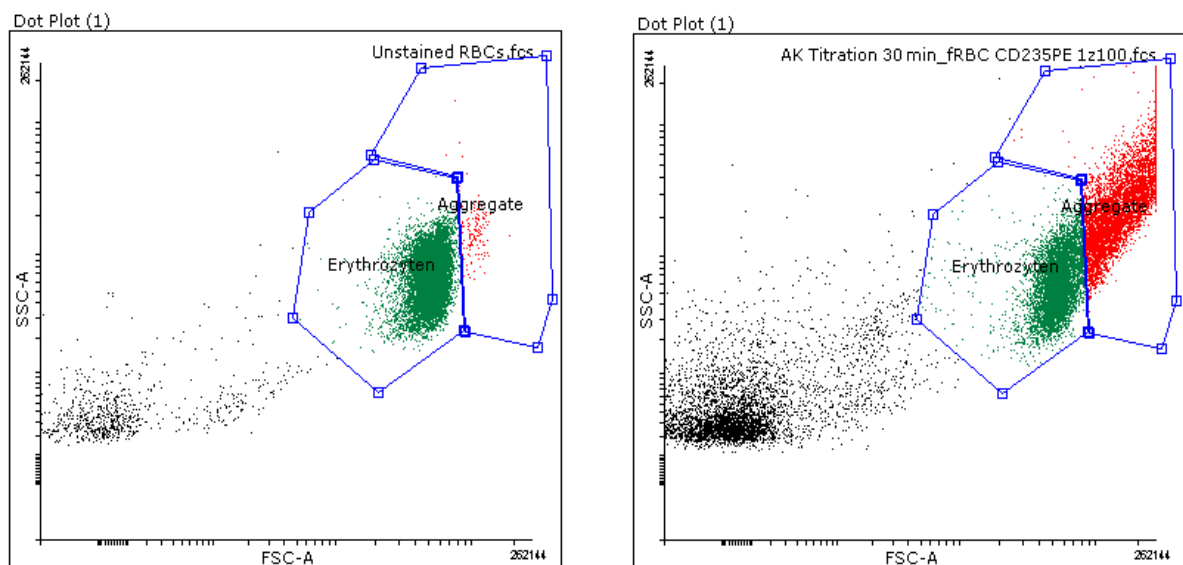
**Abbildung 13:** Darstellung eines Histogramm-Overlays der Erythrozytenprobe gefärbt mit Anti-C3d in FITC. Der schwarze Graph (links oben) repräsentiert die ungefärbten Erythrozyten, der rote Graph (oben mitte) die gefärbten Proben aus den Erythrozytenkonzentraten und der grüne Graph (rechts oben) die C3d Positiv Kontrolle.

Die Ergebnisse wurden zunächst nach MS Excel exportiert, um dort hinsichtlich der entsprechenden EKs und der jeweiligen Zeitpunkte sortiert werden zu können. Die statistische Auswertung erfolgte dann mit GraphPad Prism 6. Vor den statistischen Auswertungen wurde zunächst auf Normalverteilung mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov Tests geprüft. Für alle Vergleiche einzelner Gruppen wurde der gepaarte t-Test angewendet. P-Werte kleiner 0.05 ( $p < 0.05$ ) wurden als statistisch signifikant klassifiziert.

## 4 Ergebnisse

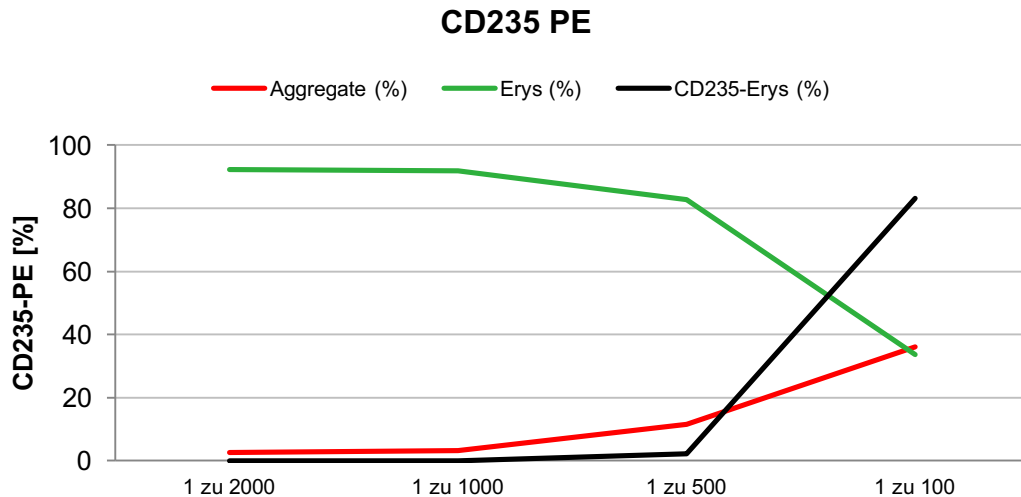
### 4.1 Titration der Antikörper

Im Vorfeld zur Versuchsreihe wurden Titrations der Antikörper durchgeführt. **CD235**, auch Glycophorin A genannt, ist ein Zelllinien-spezifisches Antigen, welches nur von Erythrozyten exprimiert wird. Somit können bei FACS Analysen die Erythrozyten von anderen Zellen separiert werden. Leider kam es zu einer konzentrationsabhängigen Aggregation der Zellen bei Verwendung dieses Antikörpers (Abb. 14).



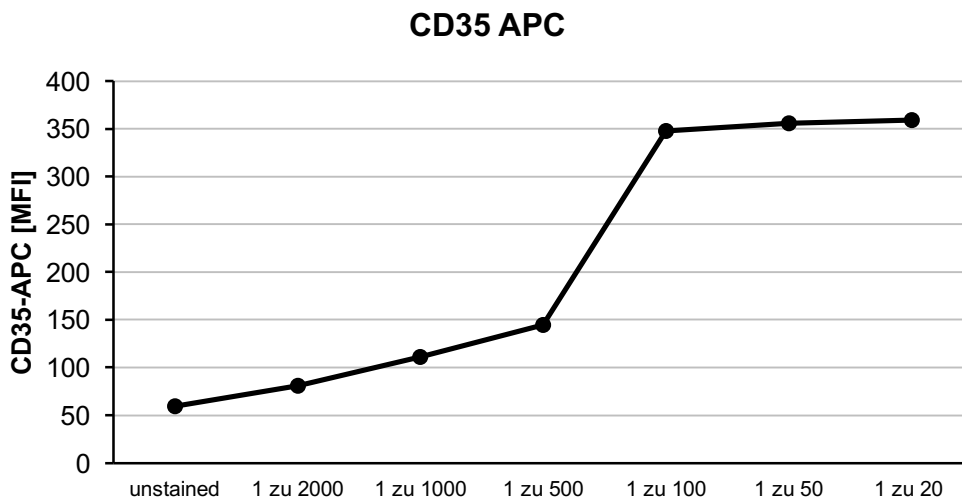
**Abbildung 14:** Aggregation durch CD235. Links ungefärbte Erythrozyten, rechts CD235 positive Zellen, in rot die Aggregation.

Bei sehr starker Verdünnung (1:1000 – 1:2000) kam es zu keiner Aggregation der Proben. Je höher die Antikörper-Konzentration, desto stärker zeigte sich die Aggregation (Abb. 15). Es wurden andere anti-CD235 Antikörper ausgetestet und mit verschiedenen Firmen kommuniziert. Dies scheint ein typisches Phänomen zu sein. Da es in den Erythrozytenkonzentraten fast ausschließlich Erythrozyten gibt, und die Erythrozyten mit Hilfe des FSC/SSC Gates von eventuellen Thrombozyten (kleiner) als eine Population getrennt werden kann, wurde auf die Verwendung eines linienspezifischen Antikörpers verzichtet.



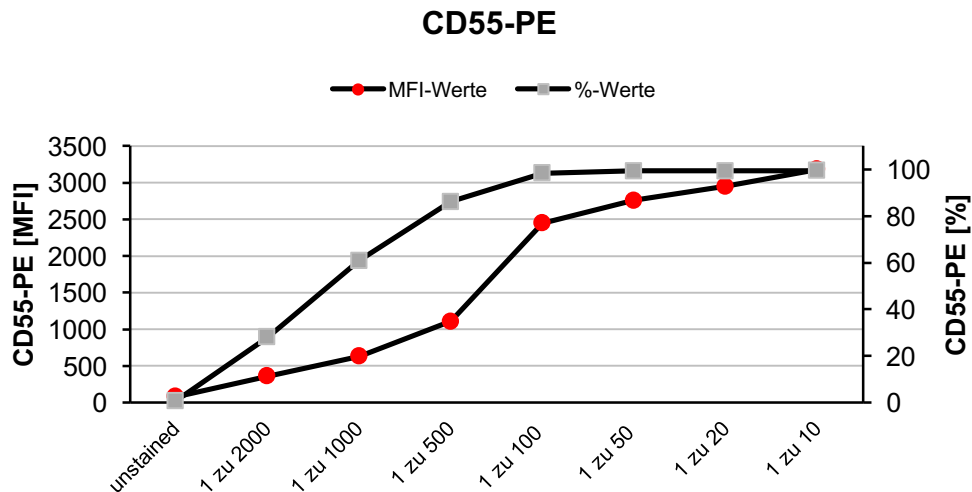
**Abbildung 15:** Gegenüberstellung von Färbung und Aggregation der Erythrozyten CD235 PE.

**CD35**, auch Komplement Rezeptor 1 (CR1) genannt, stellt einen der wichtigsten Komplementregulatoren dar. Eine Verdünnung von 1:100 pro Ansatz war ausreichend, um die Zellen optimal anzufärben. Die Verwendung höherer Antikörper zeigte keinen zusätzlichen Färbefeffekt, sodass 1:100 als optimal betrachtet wurde (Abb. 16).



**Abbildung 16:** Titration von CD35-APC. Ab einer Verdünnung von 1:100 zeigt sich ein Sättigungseffekt.

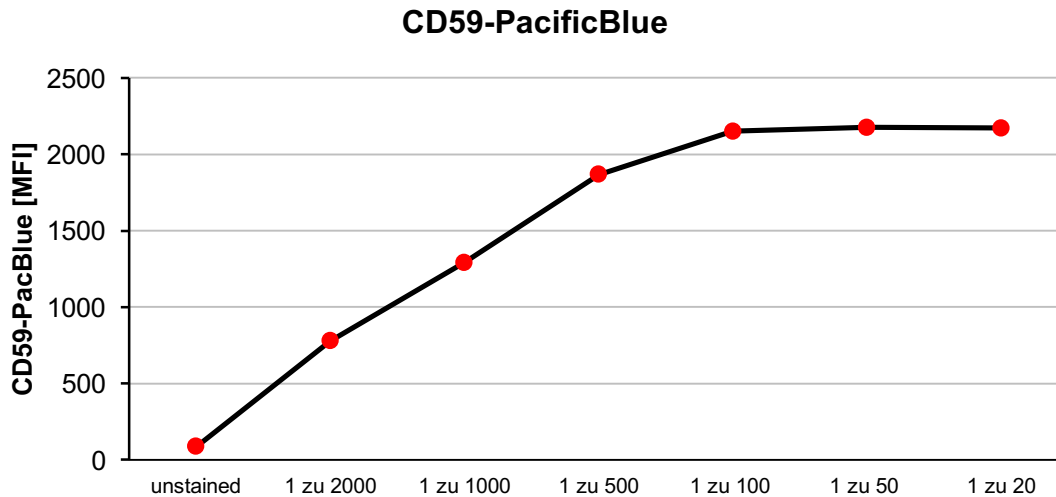
**CD55** ist ähnlich wie CD35 in der Lage die C3 Konvertase und somit die C5 Konvertase zu hemmen. In Abbildung 5 ist die Titration des CD55-PE Antikörpers dargestellt.



**Abbildung 17:** CD55-PE Titration. Eine Sättigungskurve kann ab einer Verdünnung von 1:100 gesehen werden.

Wie aus Abbildung 17 hervorgeht, zeigte die Titration von anti-CD55 bei den %-Werten keine klassische Sättigungskurve. Die MFIs stiegen bis auf 1:10 an, sodass hier zusätzlich die %-Werte dargestellt wurden. Hierbei war bei einer 1:100 Verdünnung eine Sättigungskurve zu sehen. Daher wurde auch mit einer 1:100 Verdünnung gearbeitet. Quantitative Unterschiede in den MFIs zwischen unterschiedlichen Proben und Zeitpunkten können auch bei dieser Verdünnung noch festgestellt werden.

**CD59** ist ein Komplementregulatorprotein, das in letzter Instanz die Formierung des Membrane-Attack-Complex (MAC) verhindern kann, indem es die Anlagerung von C9 blockiert. In Abbildung 18 ist eine klassische Sättigungskurve des anti-CD59 Antikörpers dargestellt. Die minimal notwendige Menge an Antikörper, die noch notwendig ist, um alle CD59 Moleküle auf der Oberfläche der Erythrozyten anzufärben, wurde bereits bei einer Verdünnung von 1:100 beobachtet.

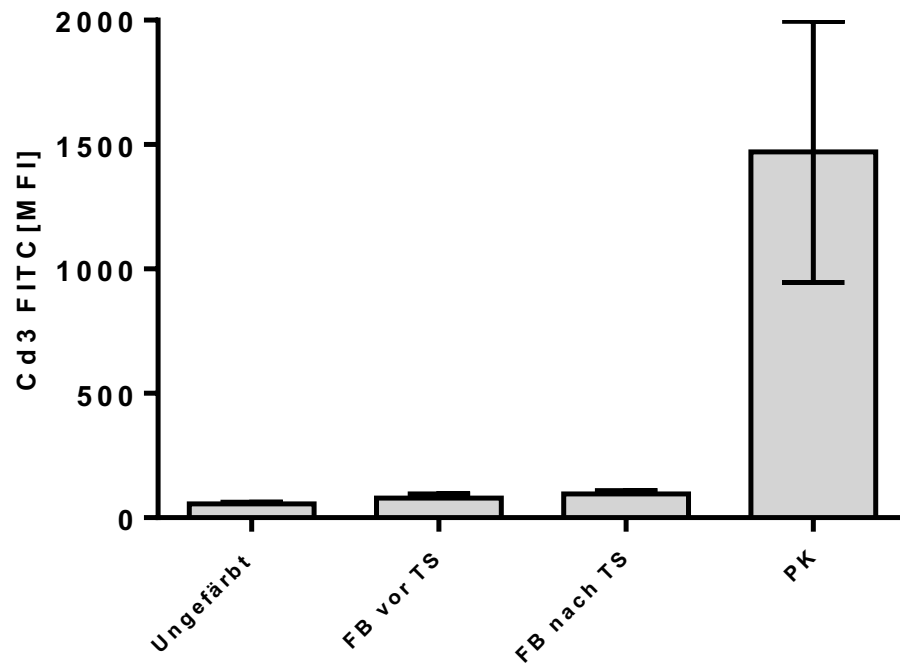


**Abbildung 18:** Titration von CD59 (Pacific Blue). Die MFI-Werte zeigen eine klassische Sättigungskurve ab einer Konzentration von 1:100.

Im Fokus dieser Promotionsarbeit liegen komplementvermittelte Lagerschäden. **C3d** ist ein Marker für eine vorausgegangene Komplementaktivierung. Hier wurde direkt die Verdünnung 1:100 gewählt, da dies der empfohlenen Antikörper-Konzentration entsprach. Abbildung 19 zeigt den Vergleich der MFI-Werte von ungefärbten Erythrozyten zu denen der Frischblutkontrolle (Negativkontrolle) und zu den Erythrozyten, eines zuvor auf C3d positiv getesteten Patienten (vierfach Positivkontrolle). Dieser Vergleich beweist die Funktionsfähigkeit des C3d Antikörpers und macht deutlich, dass zwischen den niedrigen MFIs der Frischblutproben und der sehr hohen MFIs der Positivkontrollen, eine äußerst hohe Spannweite liegt.

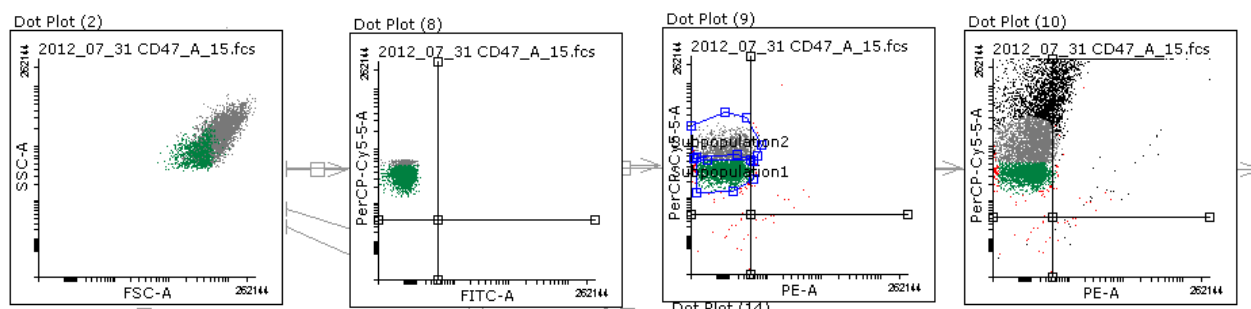


## C3d Kontrollen



**Abbildung 19:** Die durchschnittlichen Mean Fluoreszenz Intensitäten von C3d. Hier im Vergleich, die ungefärbten Erythrozyten (n = 17, Mean ± SD 55.04 ± 7.7, die Frischblutproben (FB) vor TS (n = 46, 79.42 ± 16.4) und nach TS (n = 46, 95.47 ± 14.4) sowie die Postitivkontrollen (n = 17, 1470 ± 524.6).

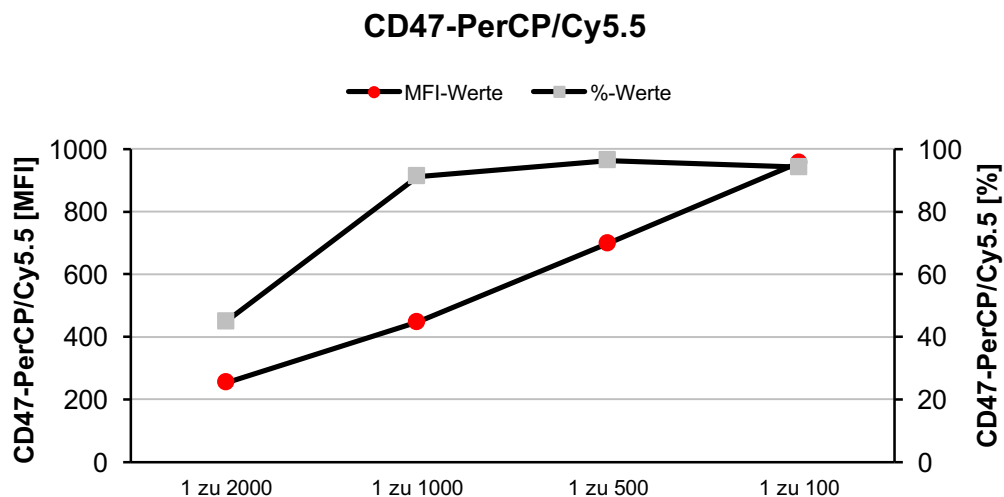
**CD47** kann als „Marker of Self“ bezüglich einer beschleunigten Phagozytose wichtige Hinweise liefern. Bei Anwendung des CD47-PerCP/Cy5.5 Antikörpers kommt es zur Aggregation. Durch eine spezielle Gating Strategie wird zwischen aggregierten und nicht-aggregierten Erythrozyten unterschieden und nur die nicht-aggregierten Erythrozyten wurden für die statistische Auswertung heran gezogen, die im Folgenden beschrieben wird (Abb. 20).



**Abbildung 20:** Gating aggregierter und nicht-aggregierter Erythrozyten.

Im FSC/SSC Dotplot (Abb. 20, links) ist die normale Erythrozytenpopulation dargestellt. Alle anderen Aggregate sind ausgeblendet (vergleiche auch mit Abb. 14). Beim Betrachten der Erythrozytenpopulation im PerCP/Cy5.5 und PE DotPlot (Abb. 20, 3. Bild v.l.), erscheinen zwei Populationen. Die untere Bande wurde Subpopulation 1 genannt (nicht aggregierte Erythrozyten), die darüber liegende Subpopulation 2 (aggregierte Erythrozyten). Im FSC/SSC DotPlot erscheint nun die Subpopulation 1 grün. Diese Events sind kleiner, was darauf hindeutet, dass es sich dabei in der Tat um nicht-aggregierte Zellen handelt. Mit Hilfe des PerCP-Cy5/PE DotPlot war eine Trennung der Erythrozyten möglich. Somit konnten nun die Erythrozyten analysiert werden, die als einzelne Zellen vorlagen.

Die Titrationskurve ist auf Grund auftretender Aggregation nur eingeschränkt beurteilbar. Wie aus Abbildung 21 zu erkennen ist, werden bei einer 1:1000 Verdünnung nahezu alle Erythrozyten gefärbt. Bei den MFI-Werten hingegen steigen die Werte bei einer 1:500 und bei einer 1:100 Verdünnung weiter an. Für die nachfolgenden Experimente wurde mit einer 1:100 Verdünnung gearbeitet.



**Abbildung 21:** Titration von CD47-PerCP/Cy5.5

Insgesamt konnte die Funktionsfähigkeit, der im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten Antikörper gezeigt werden, sodass im Folgenden die Lagerschäden der Erythrozytenkonzentrate untersucht werden konnten.

## 4.2 Ergebnisse zu den Lagerschäden

### 4.2.1 Änderung von C3d über die Lagerungszeit

Es konnte gezeigt werden, dass C3d auf der Oberfläche von Erythrozyten über die Lagerungszeit von Tag 1 ( $71.84 \pm 7.1$  MFI) auf Tag 42 ( $82.31 \pm 5.3$ ) signifikant ansteigt (ANOVA  $p = 0.0103$ ) (Tab. 5). Im Vergleich zur Messbasis (Tag 1) konnte der signifikante Unterschied nur gegen Ende der Messreihe beobachtet werden ( $p = 0.0328$  am Tag 35 und  $p = 0.0001$  an Tag 42).

**Tabelle 5:** Übersicht zu den C3d-Werten vor einer Transfusionssimulation. Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung. Gepaarter T-Test im Vergleich zur Messbasis (Tag 1).

C3d vor TS	MW + STABW	Gepaarter T-Test
Tag 1	$71.8 \pm 7.1$	-
Tag 7	$77.5 \pm 13.0$	$p = 0.1657$
Tag 14	$76.8 \pm 9.7$	$p = 0.1848$
Tag 21	$73.0 \pm 8.6$	$p = 0.6886$
Tag 28	$76.1 \pm 6.8$	$p = 0.1807$
Tag 35	$78.0 \pm 7.3$	$p = 0.0328$
Tag 42	$82.3 \pm 5.3$	$p = 0.0001$

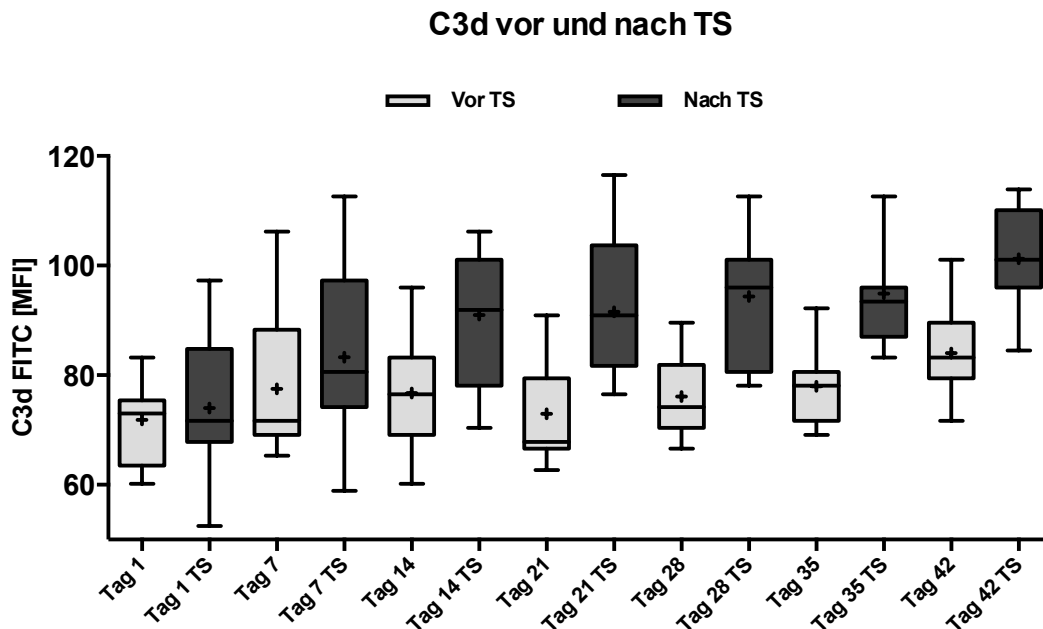
### 4.2.2 Effekt der Transfusionssimulation auf die Komplementaktivierung

Die Erythrozyten wurden sowohl vor als auch nach einer Transfusionssimulation (TS) in identischen Experiment-Settings am selben Tag untersucht, sodass ein direkter Vergleich möglich ist. Hierbei konnte nach der Transfusionssimulation eine signifikante Steigerung von C3d auf Erythrozyten über die Lagerungszeit beobachtet werden (ANOVA  $p < 0.0001$ ). Hierbei stiegen die MFIs von  $74,0 \pm 12.4$  an Tag 1 auf  $101,2 \pm 9,7$  an Tag 42. Verglichen mit Tag 1 bestand bereits nach 14 Tagen ein statistisch signifikanter Unterschied ( $p = 0.0019$ ) (Tab. 6).

**Tabelle 6:** Übersicht zu den C3d-Werten nach einer Transfusionssimulation und Vergleich der Expression zum Tag der Herstellung

C3d nach TS	MW + STABW	Gepaarter T-Test
Tag 1	74.0 ± 12.4	-
Tag 7	83.3 ± 15.2	p = 0.1396
Tag 14	91.0 ± 11.9	p = 0.0019
Tag 21	91.6 ± 12.5	p = 0.0112
Tag 28	94.4 ± 11.1	p = 0.0002
Tag 35	94.9 ± 9.4	p = 0.0006
Tag 42	101.2 ± 9.7	p < 0.0001

Eine graphische Darstellung der Befunde kann Abbildung 22 entnommen werden. In Tabelle 7 wurde der Unterschied zwischen vor und nach Transfusionssimulation miteinander verglichen. Es zeigt sich, dass der Unterschied über die Lagerungszeit zunimmt. Ab Tag 14 ist der Einfluss der Transfusionssimulation statistisch signifikant (Tag 14 gegenüber Tag 14 –TS p < 0.0001).



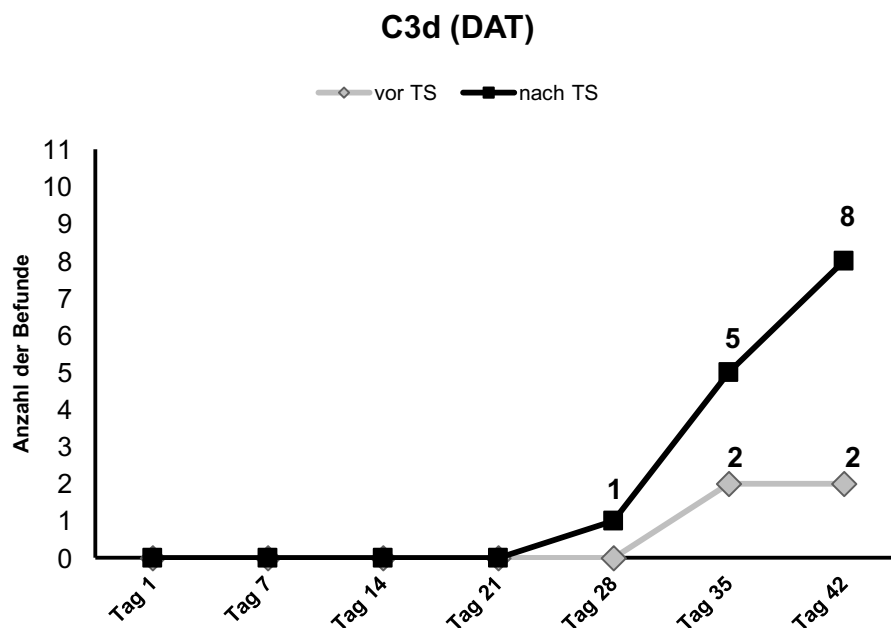
**Abbildung 22:** C3d vor und nach TS über die Lagerungszeit (nach Kamhieh-Milz J., Bartl B., et al 2014 [97]).

**Tabelle 7:** Direkter Vergleich zwischen vor und nach TS über die Lagerungszeit.

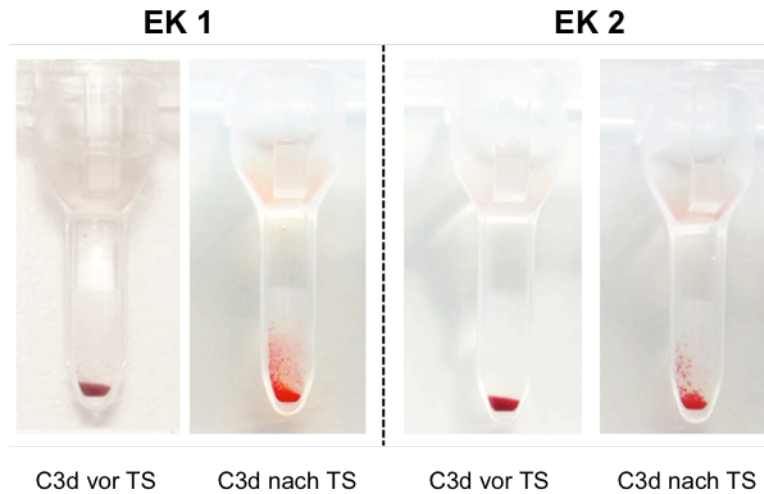
C3d vor und nach Transfusionssimulation	Gepaarter T-Test
Tag 1	p = 0.4253
Tag 7	p = 0.0482
Tag 14	p < 0.0001
Tag 21	p < 0.0001
Tag 28	p < 0.0001
Tag 35	p < 0.0001
Tag 43	p < 0.0001

### 4.2.3 Bestätigung der Ergebnisse durch den DAT

Diese mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelten Ergebnisse konnten durch den direkten Coombstest bestätigt werden. Im Gegensatz zur Auswertung von einfach positiv bis vierfach positiv (siehe Methode DAT) wurden hier auch schwach positive Ergebnisse miteingerechnet. Auch wenn die meisten der beobachteten Positivreaktionen nur schwach waren (+/-), so nahm doch deren Anzahl gegen Ende der Lagerungszeit zu (Abb. 23). Ein Beispiel einer einfach Positivreaktion ist Abbildung 24 zu entnehmen.



**Abbildung 23:** Anzahl schwach positiver Befunde im DAT unabhängig von der positiven Ausprägung(nach Kamhieh-Milz J., Bartl B., et al 2014 [97]).



**Abbildung 24:** Repräsentatives Beispiel eines positiven DAT. In diesen beiden Proben ist ein einfach positives Ergebnis auf C3d nach TS zu sehen(nach Kamhieh-Milz J., Bartl B., et al 2014 [97]).

#### 4.2.4 Änderung von CD35 über die Lagerungszeit

Es konnte gezeigt werden, dass CD35 sowohl vor als auch nach einer Transfusionssimulation über die Lagerungszeit vermindert wird. Die Varianzanalyse (ANOVA) über die Lagerungszeit ergab jeweils einen signifikanten Abfall von CD35 ( $p < 0.0001$ ). Die nachfolgenden Tabellen 8 und 9 zeigen die Durchschnittswerte der MFIs über die Lagerungszeit und den Vergleich zu Tag eins.

**Tabelle 8:** CD35 über die Lagerungszeit, sowie jeweils der Vergleich zu Tag eins im gepaarten T-Test.

	CD35 vor TS MW± SD [MFI]	Gepaarter T-Test
Tag 1	241.6 ± 20.0	-
Tag 7	230.9 ± 18.5	$p < 0.0001$
Tag 14	225.6 ± 18.4	$p < 0.0001$
Tag 21	221.5 ± 13.4	$p < 0.0001$
Tag 28	219.5 ± 13.2	$p < 0.0001$
Tag 35	219.9 ± 13.7	$p < 0.0001$
Tag 42	219.1 ± 13.0	$p < 0.0001$

**Tabelle 9:** CD35 über die Lagerungszeit nach TS und der jeweilige Vergleich mit Tag eins im gepaarten T-Test.

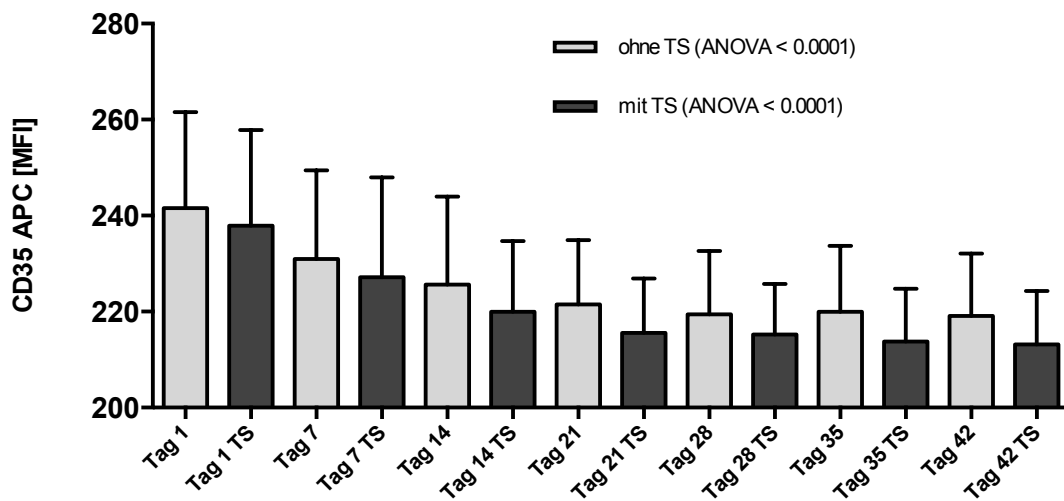
	<b>CD35 nach TS MW±SD [MFI]</b>	<b>Gepaarter T-Test</b>
<b>Tag 1</b>	237.9 ± 19.9	-
<b>Tag 7</b>	227.2 ± 20.8	p = 0.0238
<b>Tag 14</b>	219.9 ± 14.8	p = 0.0001
<b>Tag 21</b>	215.5 ± 11.4	p < 0.0001
<b>Tag 28</b>	215.2 ± 10.5	p < 0.0001
<b>Tag 35</b>	213.8 ± 11.0	p < 0.0001
<b>Tag 42</b>	213.2 ± 11.1	p < 0.0001

Aus Tabelle 10 ist ersichtlich, dass die Transfusionssimulation innerhalb der ersten zwei Wochen keinen signifikanten Einfluss auf CD35 hat. Ab Tag 14 kann jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen vor und nach Transfusionssimulation beobachtet werden (p = 0,0209). Die Graphische Darstellung hierzu ist Abbildung 25 zu entnehmen.

**Tabelle 10:** CD35 vor und nach TS im Vergleich je Tag.

	<b>CD35 vor versus nach TS</b>	<b>Gepaarter T-Test</b>
<b>Tag 1</b>		p = 0.2261
<b>Tag 7</b>		p = 0.1439
<b>Tag 14</b>		p = 0.0209
<b>Tag 21</b>		p < 0.0001
<b>Tag 28</b>		p = 0.0112
<b>Tag 35</b>		p = 0.0004
<b>Tag 42</b>		p = 0.0005

### CD35 vor und nach TS über die Lagerungszeit

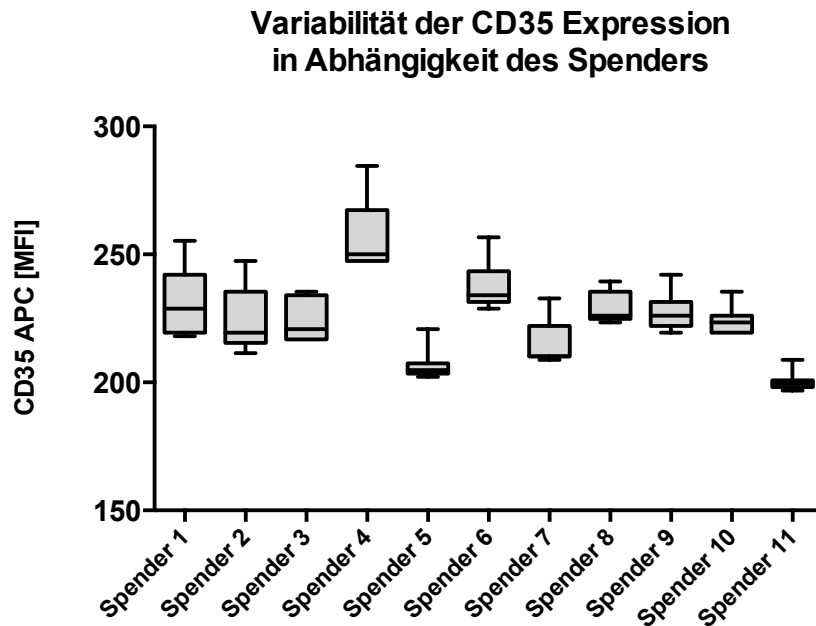


**Abbildung 25:** CD35 über die Lagerungszeit vor und nach TS (nach Kamhieh-Milz J., Bartl B., et al 2014 [97]).

#### 4.2.5 Varianz der CD35 Expression

Im Rahmen dieser Arbeit konnte beobachtet werden, dass die Expression von CD35 unter den Spendern zum Teil stark variiert. Abbildung 26 zeigt die unterschiedliche Expression von CD35 in Abhängigkeit des Spenderindividuums. Die meisten der Spender zeigen ähnliche CD35 Werte. Wohingegen ein Spender besonders hohe Werte (Spender 4) und zwei Spender besonders niedrige Werte (Spender 5 und 11) zeigten. Je Spender sind die Mittelwerte über alle Messzeitpunkte dargestellt. Die Standardabweichung stellt also nicht nur die abweichenden Messungen dar, sondern beinhaltet vor allem die zuvor beschriebene Abnahme von CD35 über die Lagerungszeit. Diese Abweichung liegt für alle Spender zwischen 1,93 und 5,85 %. Dies verdeutlicht, dass die gemessenen Werte über die mehreren Wochen Beobachtungszeitraum robust und reproduzierbar sind.





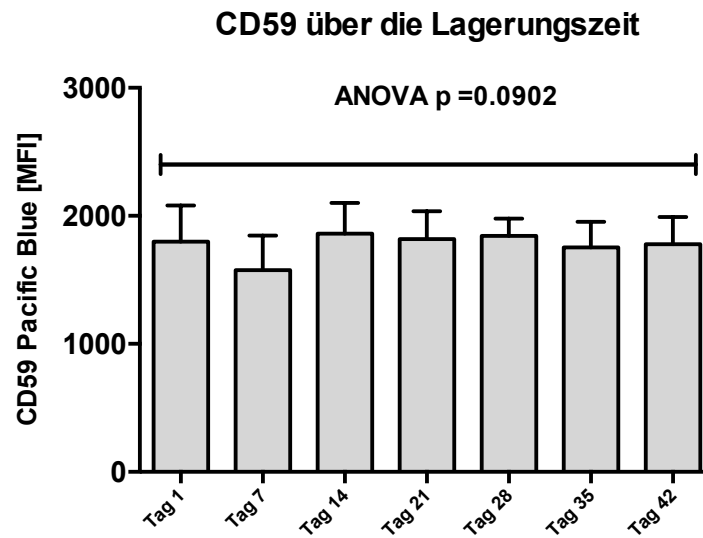
**Abbildung 26:** Varianz der CD35 Expression in Abhängigkeit des Spenders kumulativ über die Lagerungszeit (nach Kamhieh-Milz J., Bartl B., et al 2014 [97]).

#### 4.2.6 Änderung von CD59 über die Lagerungszeit

CD59 ist zwar nicht in der Lage die C3 und die C5 Konvertasen zu inhibieren, kann eine Komplementlyse jedoch in letzter Instanz verhindern, indem es die Anlagerung von C6-9 und somit die Bildung des MACs verhindert. Über die Lagerung konnte keine signifikante Änderung von CD59 gezeigt werden (ANOVA  $p = 0.0902$ , Abb. 27). Auch der jeweilige Vergleich unterschiedlicher Messzeitpunkte zu Tag eins ergab keine signifikanten Unterschiede (Tab. 11).

**Tabelle 11:** Vergleich verschiedener Zeitpunkte zur Messbasis (Tag 1).

CD59	Gepaarter T-Test
Tag 1	-
Tag 7	$p = 0.1107$
Tag 14	$p = 0.5912$
Tag 21	$p = 0.7805$
Tag 28	$p = 0.6222$
Tag 35	$p = 0.6265$
Tag 42	$p = 0.8394$



**Abbildung 27:** Änderung der CD59 Expression über die Lagerungszeit.

#### 4.2.7 Änderung der CD55 Expressionen

CD55 wurde nur über die ersten 14 Tage der Lagerungszeit untersucht. Innerhalb dieser zwei Wochen konnte bereits ein signifikanter Abfall beobachtet werden (ANOVA  $p < 0.0001$ , Abb. 28). Im Vergleich zu Tag eins fiel CD55 nach einer Woche Lagerungszeit um etwa 10 %, nach 14 Tagen um etwa 18 %. Die Mittelwerte sind in Tabelle 12 dargestellt.

**Tabelle 12:** CD55 fällt über 14 Tage Lagerungszeit.

CD55	MW + STABW [MFI]	Gepaarter T-Test
Tag 1	7124 ± 1390	-
Tag 7	6314 ± 919	$p = 0.0083$
Tag 14	5706 ± 851	$p = 0.0002$

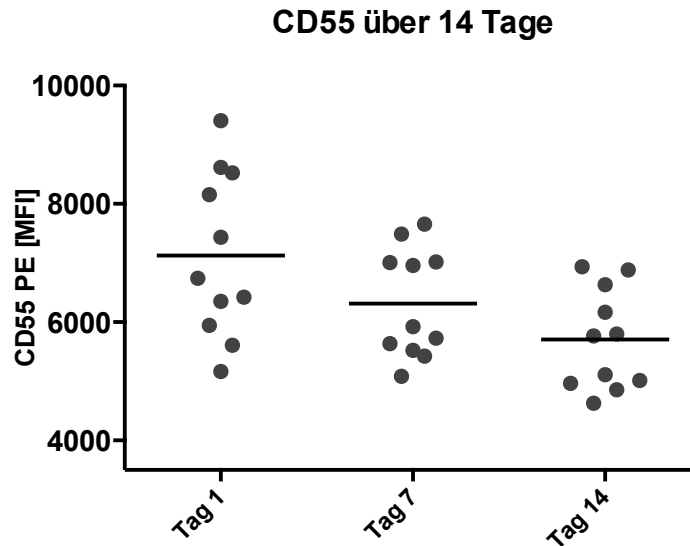


Abbildung 28: Scatter-DotPlot zu den CD55 Expression über die Lagerungszeit.

#### 4.2.8 Änderung der CD47 Expression über die Lagerungszeit

Im Rahmen dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass CD47 bis zum Tag 28 fällt ( $p = 0.0002$ ). Am Tag 35 und 42 kommt es jedoch zu einem signifikanten Anstieg der CD47 Expression ( $p = 0.0281$ ) (Abb. 29).

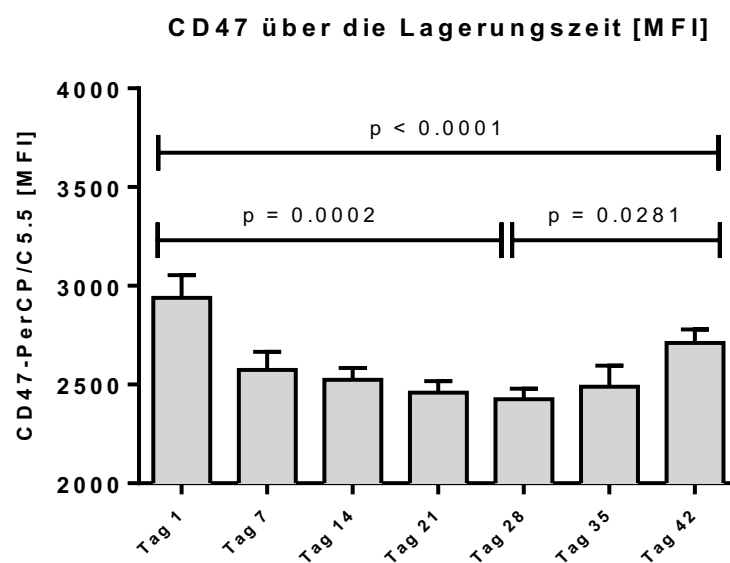


Abbildung 29: Expression von CD47 über die Lagerungszeit. Es zeigt sich ein signifikanter Abfall bis Tag 28, und dann wieder eine signifikanter Anstieg zu Tag 42.

Die Varianzanalyse über die gesamte Lagerungszeit ergab einen p-Wert von  $p < 0.0001$ . In der folgenden Tabelle sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen sowie der gepaarte Vergleich zum Tag der Herstellung dargestellt. Tag 7 bis Tag 28 sind dabei signifikant niedriger im Vergleich zu Tag 1.

**Tabelle 13:** Übersicht zur CD47 Expression über die Lagerungszeit

	MW± SD	Gepaarter T-Test
<b>Tag 1</b>	2940 ± 378	-
<b>Tag 7</b>	2575 ± 303	$p = 0.0002$
<b>Tag 14</b>	2525 ± 197	$p = 0.0027$
<b>Tag 21</b>	2459 ± 195	$p < 0.0001$
<b>Tag 28</b>	2425 ± 179	$p = 0.0006$
<b>Tag 35</b>	2489 ± 357	$p = 0.0304$
<b>Tag 42</b>	2711 ± 225	$p = 0.0584$

#### 4.2.9 Zusammenfassung der FACS Ergebnisse

**Tabelle 14:** MFI Werte zu CD35, CD55, CD59, C3d und CD47 ohne Transfusionssimulation (aus Kamhieh-Milz J., Bartl B., et al 2014 [97]).

	Day 1	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28	Day 35	Day 42	ANOVA
C3d	71.8 ± 7.1 -	77.5 ± 13.0 p = 0.1657	76.8 ± 9.7 p = 0.1848	73.0 ± 8.6 p = 0.6886	76.1 ± 6.8 p = 0.1807	78.0 ± 7.3 p = 0.0328	82.3 ± 5.3 p = 0.0001	<b>p = 0.0103</b>
CD35	241.6 ± 20.0 -	230.9 ± 18.5 p < 0.0001	225.6 ± 18.4 p < 0.0001	221.5 ± 13.4 p < 0.0001	219.5 ± 13.2 p < 0.0001	219.9 ± 13.7 p < 0.0001	219.1 ± 13.0 p < 0.0001	<b>p &lt; 0.0001</b>
CD55	7124 ± 1390 -	6314 ± 919 p = 0.0083	5706 ± 851 p = 0.0002	- -	- -	- -	- -	<b>p &lt; 0.0001</b>
CD59	1799 ± 283 -	1577 ± 268 p = 0.1107	1858 ± 241 p = 0.5912	1820 ± 217 p = 0.7805	1843 ± 185 p = 0.6222	1753 ± 200 p = 0.6265	1778 ± 212 p = 0.8394	<b>p = 0.0902</b>
CD47	2940 ± 378 -	2575 ± 303 p = 0.0002	2525 ± 197 p = 0.0027	2459 ± 195 p < 0.0001	2425 ± 179 p = 0.0006	2489 ± 357 p = 0.0304	2711 ± 225 p = 0.0584	<b>p &lt; 0.0001</b>

**Tabelle 15:** MFI Werte zu C3d und CD35 vor und nach Transfusionssimulation (aus Kamhieh-Milz J., Bartl B., et al 2014 [97]).

		Day 1	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28	Day 35	Day 42	ANOVA
C3d	<b>Prior-TS</b>	71.8 ± 7.1	77.5 ± 13.0	76.8 ± 9.7	73.0 ± 8.6	76.1 ± 6.8	78.0 ± 7.3	82.3 ± 5.3	<b>p = 0.0103</b>
	<b>Post-TS</b>	74.0 ± 12.4	83.3 ± 15.2	91.0 ± 11.9	91.6 ± 12.5	94.4 ± 11.1	94.9 ± 9.4	101.2 ± 9.7	<b>p &lt; 0.0001</b>
	<b>Paired T-Test</b>	<b>p = 0.4253</b>	<b>p = 0.0482</b>	<b>p &lt; 0.0001</b>	<b>p &lt; 0.0001</b>	<b>p &lt; 0.0001</b>	<b>p &lt; 0.0001</b>	<b>p &lt; 0.0001</b>	-
CD35	<b>Prior-TS</b>	241.6 ± 20.0	230.9 ± 18.5	225.6 ± 18.4	221.5 ± 13.4	219.5 ± 13.2	219.9 ± 13.7	219.1 ± 13.0	<b>p &lt; 0.0001</b>
	<b>Post-TS</b>	237.9 ± 19.9	227.2 ± 20.8	219.9 ± 14.8	215.5 ± 11.4	215.2 ± 10.5	213.8 ± 11.0	213.2 ± 11.1	<b>p &lt; 0.0001</b>
	<b>Paired T-Test</b>	<b>p = 0.2261</b>	<b>p = 0.1439</b>	<b>p = 0.0209</b>	<b>p &lt; 0.0001</b>	<b>p = 0.0112</b>	<b>p = 0.0004</b>	<b>p = 0.0005</b>	-

## 5 Diskussion

Weltweit werden derzeit ca. 75 Millionen Erythrozytenkonzentrate pro Jahr transfundiert [98]. In den letzten 20 Jahren verdoppelte sich in den USA der jährliche Bedarf von 12 Millionen [99] auf ca. 24 Millionen [98]. In Deutschland werden ca. 4,5 Millionen Erythrozytenkonzentrate und allein an der Charité ca. 60 Tausend pro Jahr transfundiert. Der hohe Bedarf an Erythrozytenkonzentraten stellt eine logistische Herausforderung dar, die durch die relativ lange Lagerungszeit von bis zu 42 Tagen zumindest teilweise kompensiert werden kann. Während der Lagerungszeit durchlaufen die Erythrozyten der Erythrozytenkonzentrate jedoch Veränderungen, die die Morphologie und die Funktionalität der Zellen betreffen. Diese sogenannten Lagerschäden sind zum Teil reversibel, zum Teil jedoch auch irreversibel. Ein direkter Zusammenhang der Lagerschäden mit einem schlechten klinischen Outcome wird vermutet, aber bis heute in der Literatur kontrovers diskutiert [3, 15, 26, 32, 41, 46-50]. Es wird kontinuierlich versucht, die Lagermedien zu optimieren, um Lagerschäden zu verhindern. Somit sind die Charakterisierungen der Lagerschäden immer wieder Gegenstand von Untersuchungen. Ob komplementvermittelte Lagerschäden aktuell ebenfalls festzustellen sind, ist unklar. Daher war die durchflusszytometrische Untersuchung von Komplementfaktoren und Komplementrezeptoren über die Lagerungszeit von Erythrozytenkonzentraten bis zu 42 Tagen Gegenstand dieser Forschungsarbeit.

Von zentraler Bedeutung zur Untersuchung komplementabhängiger Lagerschäden ist die Untersuchung von C3d als Marker einer vorrausgegangenen Komplementaktivierung. Das Spaltprodukt C3d auf der Erythrozytenmembran erlaubt der Zelle zu überleben, denn Makrophagen besitzen vermutlich keinen C3d-Rezeptor (Komplementrezeptor 2) [100]. Doch kürzlich wurde beschrieben, dass der Complement Rezeptor 3 (CR3) auch das C3dg Endprodukt binden, und so möglicherweise die Phagozytose ermöglichen könnte [101]. Bereits in den 1970er und 1980er Jahren wurde in Studien gezeigt, dass Erythrozyten eine gewisse Grundbeladung an C3d aufwiesen [102-104]. Dies entspricht auch den Ergebnissen der hiesigen, da niedrige Fluoreszenzsignale von Anfang an in allen Konditionen gemessen werden konnten.

Dies ist jedoch die erste Studie, in der C3d in leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten in Abhängigkeit der Lagerungszeit untersucht wurde. Ein schwacher, aber signifikanter Anstieg von C3d konnte in der Tat über die Lagerungszeit festgestellt werden. Die MFI-Werte am ersten Tag der Messung betragen im Mittel  $71,8 \pm 7,1$  und stiegen am Tag 42 auf  $82,3 \pm 5,3$  an ( $p = 0.0103$ ). Freedman et al zeigten unter anderem ähnliche Ergebnisse [105]. Über einen Beobachtungszeitraum von 21 Tagen hatten sie 21 Mal Proben aus Konserven (Blut in CPD) entnommen und auf C3d untersucht. Hierbei konnten sie keinen signifikanten Unterschied zwischen kurz und länger gelagerten Erythrozytenkonzentraten feststellen. Andererseits zeigten sie jedoch auch, dass bei zeitgleicher Versuchsdurchführung von jungen und alten Erythrozytenkonzentraten unter simultanen Bedingungen durchaus ein signifikanter Anstieg von C3d in älteren Erythrozytenkonzentraten festzustellen war [105]. Vergleichbare Ergebnissen zeigten Szymanski et al 1983 mit einem kleinen, aber doch signifikanten Anstieg von C3d auf Erythrozyten in 10ml in CPD-Röhrchen über einen Zeitraum von 29 Tagen [106]. In beiden Fällen war der Beobachtungszeitraum im Vergleich zu unserer Studie kürzer, es wurde nicht mit leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten gearbeitet, und die Lagermedien wurden in den letzten 15 Jahren kontinuierlich weiter optimiert, sodass die Ergebnisse dieser Studien nur stark eingeschränkt vergleichbar sind. Es scheint, dass eine Komplementaktivierung auch bei leukozytendepletierten Konserven eine Rolle spielt.

Die Besonderheit dieser Arbeit beinhaltet auch die Untersuchung von C3d nach einer Transfusionssimulation. Das bedeutet, die Proben wurden an den jeweiligen Entnahmetagen für 30 Minuten mit homologem Serum bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert und dann mit den Erythrozyten ohne Transfusionssimulation parallel prozessiert und direkt miteinander verglichen. So konnte beobachtet werden, dass C3d nach einer Transfusionssimulation in Abhängigkeit der Lagerungszeit signifikant anstieg (ANOVA  $p < 0.0001$ ). Die MFI-Werte stiegen dabei über die Lagerungszeit von  $74,0 \pm 12,4$  auf  $101,2 \pm 9,7$  an. Ein erster deutlich statistisch signifikanter Unterschied zwischen Erythrozyten vor und nach Transfusionssimulation konnte bereits nach 14 Tagen festgestellt werden ( $p < 0.0001$ ). Dieser Unterschied nimmt mit Zunahme der Lagerungszeit weiter zu (siehe auch Abbildung 22). Diese Beobachtung ist einer der Hauptbefunde dieser Arbeit und beweist, dass länger gelagerte Erythrozyten eine größere Empfindlichkeit gegenüber einer Komplementaktivierung aufweisen als frische

Erythrozytenkonzentrate. Dies kann auch von klinischer Bedeutung sein. Dieser Befund wurde inzwischen unter dem Titel „Storage of RBCs results in an increased susceptibility for complement-mediated degradation“ in der Zeitschrift *Transfusion Medicine* publiziert [97].

Es stellt sich jedoch die Frage, wie die beobachtete Komplementaktivierung möglich ist. Diese sollte eigentlich durch den Zusatz von Citrat im Lagermedium vollständig inhibiert sein. Bereits im Jahr 1979 wurde gezeigt, dass die Komplementaktivierung in Erythrozytenkonzentraten in Citrat-haltigen Medien (CPD) möglich ist, nicht jedoch in EDTA-haltigen Medien [107]. Es ist bekannt, dass zwar die Koagulation von Erythrozyten in Anwesenheit von 6,2 mM Citrat inhibiert werden kann, eine Komplementaktivierung jedoch nicht in Anwesenheit von 25mM, sondern erst ab 50mM verhindert werden kann [108]. CPD-SAGEM, sowie das hier verwendete PAGGSM Medium, beinhalten ca. 100mM Citrat. Dies hätte zur Folge, dass eine Komplementaktivierung und somit die C3 Spaltung (C3d) vollständig inhibiert sein müsste. Der Anstieg von C3d kann daher auf eine Verminderung der Citratkonzentration über die Lagerungszeit zurückgeführt werden. Diese Annahme wird durch eine Studie bestätigt, in der mit Hilfe von Metabolomics festgestellt werden konnte, dass es in Erythrozytenkonzentraten zu einem drastischen Abfall der Citratkonzentration innerhalb der ersten drei Wochen kommt [109]. Interessant ist die Beobachtung, dass ein signifikanter Unterschied zwischen vor- und nach Transfusionssimulation erst nach zwei Wochen festgestellt werden konnte. Somit scheint die Verringerung der Citratkonzentration in der Tat die Komplementaktivierung zu ermöglichen.

Neben der Citratkonzentration kann die zunehmende Empfindsamkeit der Erythrozyten gegenüber Komplementschäden auch durch Eigenschaften der Erythrozyten selbst vermittelt sein. Die Erythrozyten sind mit verschiedenen Proteinen zur Komplementregulation ausgestattet. Dazu zählen unter anderem der Komplementrezeptor 1 (CD35), CD55 und CD59, die im Rahmen dieser Studie ebenfalls auf ihre Expression über die Lagerungszeit untersucht wurden. Die Anfälligkeit von Erythrozyten für komplementvermittelte Schäden könnte daher auch in Zusammenhang mit einer Verminderung dieser Komplement-Regulator-Proteine



stehen. In der Tat konnte eine Verminderung von CD35 und CD55, nicht jedoch von CD59 über die Lagerungszeit festgestellt werden (Tabelle 14 und 15).

CD35 und CD55 zählen zu den wichtigsten Komplementrezeptoren und sind in der Lage die Komplementaktivierung bereits auf Ebene der C3 und C5 Konvertase zu inhibieren, um die Zelle zu schützen. Im Rahmen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass CD35 und CD55 über die Lagerungszeit auf Erythrozyten signifikant abnehmen (ANOVA  $p < 0.0001$  und  $p < 0.0001$ ).

Mehrere Studien zeigten bereits, dass die Expression von CD35 in Abhängigkeit des Alters der Erythrozyten um bis zu 50 % fallen kann [65, 110-113]. Diese Studien haben alle gemein, dass die Erythrozyten durch Dichtegradientenzentrifugation in verschiedene Alterskategorien separiert wurden. Es handelt sich somit um *in vivo* Beobachtungen, die daher kaum mit dieser Studie vergleichbar sind. Vergleichbare Studien, die den Verlust von CD35 bei Erythrozyten unter dem Einfluss der Lagerung untersuchten, konnten in der Literatur nicht gefunden werden.

Im Gegensatz zu CD35 und CD55 konnte im Rahmen dieser Studie keine signifikante Minderung von CD59 beobachtet werden. Dies ist im Widerspruch zu der Studie von Long et al 1993 [114], in der eine Minderung der CD59 Expression um bis zu 37 % beschrieben ist. Hierbei wurden zwar gelagerte, jedoch nicht leukozytendepletierte Erythrozyten über 6 Wochen hinweg in CPDA1 oder Adsol als Lagermedium beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass die Leukozytendepletion möglicherweise einen positiven Einfluss auf den Erhalt der CD59 Expression hat. Dieser Fragestellung gingen auch Antonelou et al nach. In deren neuerer Arbeit aus dem Jahr 2012 ging es um den direkten Einfluss der Leukozytendepletion von Erythrozytenkonzentraten im Hinblick auf verschiedene Parameter, inkl. CD59, und ebenfalls über einen Beobachtungszeitraum von 42 Tagen [39]. Zunächst wurde hier der Einfluss der Leukozytendepletion an sich deutlich, da der Ausgangswert von CD59 bei nicht-leukozytendepletierten Proben bereits am ersten Tag der Untersuchung um 13% niedriger war als in leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass sowohl in nicht-leukozytendepletierten, wie auch in leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten CD59 nur am Ende der Lagerungszeit (Tag 42) statistisch

signifikant vermindert war. Unsere Beobachtung zu CD59 unterstützen die Ergebnisse dieser Studie.

In den Untersuchungen zeigte sich neben CD35 auch eine starke Minderung von CD55. Prozentual ausgedrückt konnte sogar festgestellt werden, dass CD55 stärker abnimmt als CD35 (18 % gegenüber 9-10%). Doch können solche Änderungen zwischen der Expression von CD35, CD55 und CD59 durch die Lagerungszeit beeinflusst sein?

Zum einen geht man davon aus, dass ein nicht unwesentlicher Anteil von CD35 durch Vesikelbildung verloren geht. Vesikelbildung gehört zum normalen Alterungsprozess eines Erythrozyten. Hierbei kann das Volumen des Erythrozyten über die Lebensspanne hinweg *in vivo* dadurch um bis zu 20 % reduziert werden [37, 115]. Auch durch Stressoren, wie Hitze, ATP-Verlust, Kalziumverschiebung oder auch Komplement werden vermehrt Vesikel von den Erythrozyten freigesetzt [107, 116]. Pascual et al zeigten, dass diese Vesikel auch mit CD35 beladen sind [117] und Dervillez et al gingen sogar davon aus, dass bis zu einem Drittel von CD35 durch Exozytose verloren geht [118]. Auch wenn im Rahmen dieser Studien die Anzahl an Mikropartikeln nicht untersucht wurde, konnte sowohl für SAGM als auch für PAGGSM ein signifikanter Anstieg an Mikropartikeln über die Lagerungszeit beobachtet werden [119]. Dabei wurde jedoch gezeigt, dass in PAGGSM die Anzahl an Mikropartikeln ab Tag 28 signifikant niedriger war.

Zum anderen kann der Verlust von Oberflächenmolekülen durch proteolytische Spaltung erklärt werden. Pascual et al zeigten in deren Studie nicht nur eine Abnahme verschiedener Membranproteine auf alten Erythrozyten, sondern untersuchten auch die Empfindsamkeit der Membranproteine (CD35, CD55 und CD59) gegenüber proteolytischer Spaltung [111]. Aus dieser Studie geht hervor, dass die Membranproteine unterschiedlich sensitiv auf eine Inkubation mit Trypsin oder Papain reagierten. Sie konnten zeigen, dass CD35 schneller und intensiver auf den Einfluss der Proteasen reagierte als die Membranproteine mit GPI-Anker (CD55 und CD59). CD59 war z.B. völlig unverändert gegenüber einer Behandlung mit Trypsin, wobei CD35 schon bei der niedrigsten Konzentrationen signifikant vermindert wurde. Da in Humanserum auch Proteasen in gelöster Form vorkommen, ist es möglich, dass erniedrigte CD35 und CD55 Werte nach Transfusionssimulation durch proteolytische

Spaltung vermittelt sind. Da CD35 nach Transfusionssimulation mit Zunahme der Lagerungszeit fällt, wäre es möglich, dass die Empfindlichkeit von CD35 gegenüber Serumproteasen über die Lagerungszeit ebenfalls zunimmt.

Des Weiteren ist natürlich nicht auszuschließen, dass in dem für die Transfusionssimulation verwendeten Serum freies C3b und C4b vorhanden ist. CD35 ist ein C3b/C4b Rezeptor, sodass freies C3b und C4b während des Inkubationsprozesses binden, und somit die Bindungsstellen für den CD35 Antikörper blockieren könnte. Dies wäre ebenso eine Erklärung für die stets erniedrigten CD35 Werte nach Transfusionssimulation.

Die Wirklichkeit liegt jedoch wahrscheinlich zwischen den hier vorgestellten und diskutierten Erklärungsansätzen, denn schließlich werden auch in dem hier verwendeten Lagermedium moderat Vesikel gebildet, was den gemäßigten Abfall von CD35 vor Transfusionssimulation erklären könnte. Für den zweiten Erklärungsansatz spräche, dass CD35 nach einer Transfusionssimulation deutlich stärker fällt, als vor einer Transfusionssimulation und dass das „Trypsin-resistente“ CD59 sich nicht über die Lagerungszeit vermindert. Ähnlich wie bei C3d nimmt der Unterschied von CD35 vor vs. nach Transfusionssimulation über die Lagerungszeit kontinuierlich zu (gepaarter T-Test, Tag 42  $p < 0.0001$ ), was auf eine zunehmende Proteasesensibilisierung hindeutet.

Als Nebenbefund dieser Studie wurde eine deutliche Varianz der CD35 Expression zwischen den untersuchten Spendern festgestellt. Bereits seit 1965 wird von Polymorphismen und verschiedenen genetischen Varianten berichtet [120-122]. Bis heute ist die CD35 Expression immer wieder Gegenstand von Studien [57, 123, 124]. Es ist daher nicht überraschend, dass die CD35-Werte unter den untersuchten Spendern ebenfalls variieren (siehe Abbildung 26). In dieser Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen Lagerungszeit und Komplement-vermittelten Lagerschäden gezeigt werden. CD35 ist möglicherweise der wichtigste und effektivste Mediator, Erythrozyten vor komplement-vermittelten Schäden zu schützen. Inwiefern eine Berücksichtigung der CD35 Expression unter den Spender zu einer Verbesserung der Qualität von Blutprodukten führt, können nur klinische Studien in der Zukunft zeigen. Aufgrund der rückgängigen Bereitschaft Blut zu spenden und der damit verbundenen

Knappheit dieses wichtigen Medizinproduktes, wird sich eine Testung der CD35 Expression zur Selektion und Charakterisierung der Blutspender wohl nicht in den klinischen Alltag etablieren lassen. Ein weiterer Aspekt ist die Klassifizierung der CD35 Expression zwischen Spender und Empfänger. Es ist nicht auszuschließen, dass besonders niedrige CD35 Expressionen des Spenders in einem Empfänger mit normalen oder gar hohen CD35 Werten möglicherweise einen negativen Einfluss haben.

Neben den Komplement-Regulator-Proteinen wurde auch das Membranprotein CD47 im Rahmen dieser Studie untersucht. Dabei handelt es sich um ein „Don't eat me“ Signal, das den Erythrozyten als „eigen“ markiert und so vor Phagozytose schützt. Kommen Erythrozyten mit Makrophagen in Kontakt, so kann das Protein CD47 an SIRP-alpha der Makrophagen binden und die Phagozytose verhindern (Siehe auch Punkt 1.4). Burger et al postulierten, dass CD47 als eine Art molekularer Schalter agiert. Dieser Schalter kann nach dem Kontakt von Makrophagen mit alten Erythrozyten von „Unterdrückung“ auf „Unterstützung“ zur Phagozytose umschalten [125]. In der hiesigen Studie konnte gezeigt werden, dass CD47 über die Lagerungszeit signifikant abnimmt (ANOVA  $p = 0.0002$ ). Von Tag 1 zu Tag 42 fallen die Werte im Mittel um 12 %. Im Vergleich zu Tag eins konnte bereits nach einer Woche eine signifikante Minderung von CD47 festgestellt werden ( $p = 0.0082$ ). Dieser Befund wird durch andere Studien gestützt:

So beobachteten Stewart et al in leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten eine Minderung von CD47 um 65% in einem Beobachtungszeitraum von 31 Tagen. Diese Studie wurde jedoch lediglich mit drei Erythrozytenkonzentraten durchgeführt und ist daher statistisch eher schwach [34]. Kamel et al beschrieben eine Verringerung von CD47 um 35% in nicht-leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten über einen Beobachtungszeitraum von 28 Tagen [93]. Einen wesentlich geringeren Abfall von CD47 als die bisher genannten wurde von Anniss et al veröffentlicht [126]. Hier wurden 13 nicht-leukozytendepletierte Erythrozytenkonzentrate über 42 Tage untersucht. Die Expression von CD47 nahm über diesen Zeitraum um 6% ab, während gleichzeitig eine statistisch signifikante Zunahme von CD47 im Überstand beschrieben wurde. Anontelou et al konnten einen Abfall von CD47 in 8 Erythrozytenkonzentraten über 42 Tage zeigen, wobei hier sowohl nicht-leukozytendepletierte als auch leukozytendepletierte

Präparate untersucht und verglichen wurden. Der CD47-Wert beider Präparate war an Tag 1 gleich hoch, im Verlauf fiel CD47 in nicht-leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten um 39%, während er in leukozytendepletierten Erythrozytenkonzentraten nur um 21% sank [39]. Auch Karon et al zeigten eine statistisch signifikante Abnahme von CD47 an Tag 14 und 21 jedoch nicht an Tag 42. Allerdings fehlen dabei Untersuchungen im Zeitraum zwischen Tag 21 und Tag 42 [127]. In den aufgeführten Studien wurden vornehmlich CPDA, Adsol und SAGM als Lösung verwendet und auch die Methodik ist immer leicht abweichend von der hier verwendeten Untersuchung, sodass ein direkter Vergleich nur eingeschränkt möglich ist.

Ferner ist die Aggregation der Erythrozyten durch das Immunostaining mit anti-CD47 Antikörpern ein bekanntes Phänomen. Kamel et al und Anniss et al nutzten eine 25 gauge Nadel um die Zellsuspension zu „vereinheitlichen“ und beschrieben auch beim Gating eine spezielle Strategie um Debris und Agglutinate zu exkludieren [93, 126]. Da der Effekt dieses physikalischen Stresses auf das Endergebnis ungewiss ist, wurde im Rahmen dieser Studie auf so ein Vorgehen verzichtet. Es wurde jedoch ebenfalls eine spezielle Gating-Strategie angewandt (siehe dazu Punkt 4.1 und Abbildung 20)

Paradoxer Weise konnte ein leichter Anstieg von CD47 gegen Ende der Lagerungszeit (Tag 35 und Tag 42) beobachtet werden. Dies wurde auch bereits von anderen Autoren beschrieben [34, 127]. Sie vermuteten, dass CD47 über Zytoskelet-assoziierte Moleküle gebunden wird und nicht freigesetzt werden könnte. Darüber hinaus vermuteten Karon et al, dass verbliebene CD47 Moleküle einer Oxidation, einer Proteolyse oder einem Konformationswechsel unterzogen werden, was zur Ausprägung weiterer CD47 Antigene gegen Ende der Lagerungszeit führt. Ebenso wie in der Studie von Karon et al konnten auch in den hier gezeigten Ergebnissen die niedrigsten CD47 Expressionen zwischen Tag 21 und 28 festgestellt werden.

Was ist jedoch die klinische Bedeutung der CD47 Minderung während der Lagerungszeit? In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass erst ein CD47-Verlust von mehr als 50% zu einer gesteigerten Phagozytose führt [88, 89]. Der stärkste Verlust an CD47 eines Individuums lag im Rahmen dieser Studie bei 37,7 %, wobei die durchschnittliche Minderung in den ersten 21 Tagen bei 15 % und an Tag 28 bei ca.

21% lag. Auch wenn die Abnahme von CD47 unter 50% liegt und die Wahrscheinlichkeit der Phagozytose daher eher gering ist, sollte der Erhalt dieses Oberflächenmoleküls für das Überleben transfundierter Erythrozyten im transfusionsmedizinischen Kontext in der Zukunft nicht an Bedeutung verlieren.

Gealterte Erythrozyten werden *in vivo* aus der Zirkulation entfernt, indem autologe Antikörper diese opsonieren. Konformationsänderungen von Band-3 und damit einhergehende Hämoglobin-Membran-Bindungen stellen ein spezielles „Alterungs-Antigen“ dar. Hier binden autologe Immunglobuline und leiten Fc-rezeptorvermittelt die Erythrophagozytose ein [128]. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit die Beladung der Erythrozyten mit Hilfe des direkten Coombstests untersucht. In diesem Test konnte sowohl vor als auch nach Transfusionssimulation zu keinem der Untersuchungszeitpunkte eine Bindung von Immunglobulinen (IgG, IGM oder IgA) nachgewiesen werden. Das deutet darauf hin, dass eine Immunglobulin-vermittelte Phagozytose in Abhängigkeit der Lagerungszeit eher unwahrscheinlich ist.

Durch den Einsatz einer Transfusionssimulation, die im Vergleich zu anderen Studien zu den Lagerschäden von Erythrozytenkonzentraten erstmals angewendet wurde, konnten wichtige Erkenntnisse gewonnen werden. Insgesamt lässt sich als Hauptbefund dieser Arbeit ableiten, dass die Erythrozyten über die Lagerungszeit zunehmend empfindlicher gegenüber einer spontanen Komplementaktivierung werden. Dies ist durch die signifikante Minderung von CD35 und CD55 vermittelt. Basierend auf den Befunden dieser Arbeit, und durch die Tatsache, dass das Komplementsystem mit Inflammation, Koagulation und oxidativem Stress assoziiert ist [129-131], könnten durch die zunehmende Sensibilisierung der Erythrozyten gegenüber komplementvermittelten Schäden ungewünschte negative Effekte bei Patienten verursacht werden. Da die beobachteten Veränderungen mit der Lagerungszeit korrelieren, wären solche unerwünschten Effekte bei älteren Konserven eher wahrscheinlich. Die Frage, ob diese transfusionsvermittelten Immunmodulationen eine Folge der Komplementaktivierung, Schäden der Erythrozyten per se oder ihrer Phagozytose durch Makrophagen über C3b-depositionen sind, bleiben vorerst ungewiss. Die vollständige Beantwortung dieser Frage bedarf großangelegter, pragmatischer klinischer Studien. In der Zwischenzeit sollten Blutbanken Strategien entwickeln, die die Blutversorgung sicherstellen, wobei die Verwendung ältester Konserven möglichst weit reduziert werden sollte [132]. Im

Rahmen dieser Doktorarbeit wurde u.a. beschrieben, wie rasant sich die Qualität der Erythrozytenkonzentrate entwickelt hat. Dennoch konnten viele Veränderungen über die Lagerungszeit im Rahmen dieser Studie festgestellt werden, wie die zunehmende Empfindsamkeit für komplementvermittelte Schäden oder die Verminderung wichtiger Komplement-Regulator-Proteine (CD35, CD55) und CD47, die eine beschleunigte Phagozytose der Erythrozyten nach einer Transfusion begünstigen könnten. Diese Ergebnisse deuten auch darauf hin, dass z.B. die Erhöhung- oder der Erhalt der Citratkonzentration über die Lagerungszeit eine Optimierungsmöglichkeit darstellt, um möglicherweise komplementvermittelte Schäden in der Zukunft zu vermindern oder gar zu verhindern. Welche neuen und spannenden Weiterentwicklungen im Bereich der Lagermedien in den nächsten Jahren erfolgen werden, bleibt abzuwarten.

## Literaturverzeichnis

1. Organization, W.H. *Blood safety and availability* 2013 June 2013 [cited 2014 14.01.2014]; Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs279/en/>.
2. Klinke, R.P., H.-C.; Silbernagel, S., *Physiologie*. 2005, Thieme. p. 229.
3. van de Watering, L.M. and A. Brand, *Effects of storage of red cells*. *Transfus Med Hemother*, 2008. **35**(5): p. 359-67.
4. Willekens, F.L., et al., *Quantification of loss of haemoglobin components from the circulating red blood cell in vivo*. *Eur J Haematol*, 1997. **58**(4): p. 246-50.
5. Rassow J, H.K., Netzker R, Deutzmann R, *Biochemie*. Duale Reihe. Vol. 1. 2006, Stuttgart: Thieme.
6. Learoyd, P., *The history of blood transfusion prior to the 20th century--part 1*. *Transfus Med*, 2012. **22**(5): p. 308-14.
7. Learoyd, P., *The history of blood transfusion prior to the 20th century--part 2*. *Transfus Med*, 2012. **22**(6): p. 372-6.
8. Bergmann, v.E., *Die Schicksale der Transfusion im letzten Decennium. Rede vom 2. August 1883.*, 1974, Springer: Berlin/Heidelberg/New York.
9. Landsteiner, K., *Zur Kenntnis der antifermentativen, lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserums und der Lymphe*. Vol. 27. 1900: *Zentralbl Bakteriol*. 357-362.
10. Wiebeckea, D., et al., *Zur Geschichte der Transfusionsmedizin in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts (unter besonderer Berücksichtigung ihrer Entwicklung in Deutschland)*. *Transfus Med Hemother*, 2004.
11. Pelis, K., *Moving blood*. *Vox Sang*, 1997. **73**(4): p. 201-6.
12. Torpy, J.M., *Blood Transfusion*. *The Journal of the American Medical Association*, 2004. **292**(13): p. 1646.
13. Rous, P. and J.R. Turner, *The Preservation of Living Red Blood Cells in Vitro : I. Methods of Preservation*. *J Exp Med*, 1916. **23**(2): p. 219-37.
14. Rous, P. and J.R. Turner, *The Preservation of Living Red Blood Cells in Vitro : II. The Transfusion of Kept Cells*. *J Exp Med*, 1916. **23**(2): p. 239-48.
15. Zimrin, A.B. and J.R. Hess, *Current issues relating to the transfusion of stored red blood cells*. *Vox Sang*, 2009. **96**(2): p. 93-103.
16. Robertson, O.H., *A Method of Citrated Blood Transfusion*. *Br Med J*, 1918. **1**(2991): p. 477-9.
17. Robertson, O.H., *Transfusion with Preserved Red Blood Cells*. *Br Med J*, 1918. **1**(2999): p. 691-5.
18. Crile GW, B.T., Cannon WB, Moss WL, Vincent B, Hussey RG, Lee BJ, *A Report Upon Transfusion of Blood for the Recently Injured in the US Army*. 1918, Paris: American Red Cross.
19. Hess, J.R., *An update on solutions for red cell storage*. *Vox Sang*, 2006. **91**(1): p. 13-9.
20. Janetzko, K., W. Ebell, and M. Welte, *Rationale Indikation zur Transfusion von Erythrozytenkonzentraten*. *Transfusionsmedizin - Immunhämatologie, Hämotherapie, Immungenetik, Zelltherapie*, 2013. **3**(01): p. 31-48.
21. Bundes, G.d. *Verbrauch von Blutprodukten durch Transfusionen*. 2014; Available from: [http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd\\_init?gbe.isgbetol/xs\\_start](http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start)



22. Ritter, S., et al., [*Demography and donation frequencies of blood and plasma donor populations in Germany*]. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz, 2008. **51**(8): p. 915-25.
23. Bundesärztekammer, *Querschnitts-Leitlinien (BÄK) zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten*, 2008, der Vorstand der Bundesärztekammer auf Empfehlung des Wissenschaftlichen Beirats.
24. Bundesärztekammer, *Richtlinien zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie)*. 2010.
25. Paul-Ehrlich-Institut (PEI, L.B.f.I.u.b.A., *Hämovigilanz-Bericht des Paul-Ehrlich-Instituts* 2010: Langen
26. Aubron, C., et al., *Age of red blood cells and transfusion in critically ill patients*. Ann Intensive Care, 2013. **3**(1): p. 2.
27. Hess, J.R. and T.G. Greenwalt, *Storage of red blood cells: new approaches*. Transfus Med Rev, 2002. **16**(4): p. 283-95.
28. Bennett-Guerrero, E., et al., *Evolution of adverse changes in stored RBCs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(43): p. 17063-8.
29. Beutler, E. and L. Wood, *The in vivo regeneration of red cell 2,3 diphosphoglyceric acid (DPG) after transfusion of stored blood*. J Lab Clin Med, 1969. **74**(2): p. 300-4.
30. Petz, L.D., Swisher, S.N., *Clinical practice of transfusion medicine* 1989: Churchill Livingstone. 271-296.
31. Sharifi, S., W.H. Dzik, and S.M. Sadrzadeh, *Human plasma and tirilazad mesylate protect stored human erythrocytes against the oxidative damage of gamma-irradiation*. Transfus Med, 2000. **10**(2): p. 125-30.
32. Ho, J., W.J. Sibbald, and I.H. Chin-Yee, *Effects of storage on efficacy of red cell transfusion: when is it not safe?* Crit Care Med, 2003. **31**(12 Suppl): p. S687-97.
33. Bessos, H. and J. Seghatchian, *Red cell storage lesion: the potential impact of storage-induced CD47 decline on immunomodulation and the survival of leucofiltered red cells*. Transfus Apher Sci, 2005. **32**(2): p. 227-32.
34. Stewart, A., et al., *The application of a new quantitative assay for the monitoring of integrin-associated protein CD47 on red blood cells during storage and comparison with the expression of CD47 and phosphatidylserine with flow cytometry*. Transfusion, 2005. **45**(9): p. 1496-503.
35. Kriebardis, A.G., et al., *Progressive oxidation of cytoskeletal proteins and accumulation of denatured hemoglobin in stored red cells*. J Cell Mol Med, 2007. **11**(1): p. 148-55.
36. Gifford, S.C., et al., *A detailed study of time-dependent changes in human red blood cells: from reticulocyte maturation to erythrocyte senescence*. Br J Haematol, 2006. **135**(3): p. 395-404.
37. Willekens, F.L., et al., *Erythrocyte vesiculation: a self-protective mechanism?* Br J Haematol, 2008. **141**(4): p. 549-56.
38. Antonelou, M.H., A.G. Kriebardis, and I.S. Papassideri, *Aging and death signalling in mature red cells: from basic science to transfusion practice*. Blood Transfus, 2010. **8 Suppl 3**: p. s39-47.
39. Antonelou, M.H., et al., *Effects of pre-storage leukoreduction on stored red blood cells signaling: a time-course evaluation from shape to proteome*. J Proteomics, 2012. **76 Spec No.**: p. 220-38.
40. D'Alessandro, A., et al., *Red blood cell storage: the story so far*. Blood Transfus, 2010. **8**(2): p. 82-8.

41. van de Watering, L., *Red cell storage and prognosis*. Vox Sang, 2011. **100**(1): p. 36-45.
42. Hogman, C.F. and H.T. Meryman, *Storage parameters affecting red blood cell survival and function after transfusion*. Transfus Med Rev, 1999. **13**(4): p. 275-96.
43. Klein, H.G., D.R. Spahn, and J.L. Carson, *Red blood cell transfusion in clinical practice*. Lancet, 2007. **370**(9585): p. 415-26.
44. Weiskopf, R.B., et al., *Extracellular potassium concentrations in red blood cell suspensions after irradiation and washing*. Transfusion, 2005. **45**(8): p. 1295-301.
45. Bansal, I., et al., *A comparative study of reducing the extracellular potassium concentration in red blood cells by washing and by reduction of additive solution*. Transfusion, 2007. **47**(2): p. 248-50.
46. van de Watering, L.M., *Age of blood: does older blood yield poorer outcomes?* Curr Opin Hematol, 2013. **20**(6): p. 526-32.
47. Wang, D., et al., *Transfusion of older stored blood and risk of death: a meta-analysis*. Transfusion, 2012. **52**(6): p. 1184-95.
48. Raghavan, M. and P.E. Marik, *Anemia, allogenic blood transfusion, and immunomodulation in the critically ill*. Chest, 2005. **127**(1): p. 295-307.
49. Vandromme, M.J., G. McGwin, Jr., and J.A. Weinberg, *Blood transfusion in the critically ill: does storage age matter?* Scand J Trauma Resusc Emerg Med, 2009. **17**: p. 35.
50. Gilson, C.R., et al., *A novel mouse model of red blood cell storage and posttransfusion in vivo survival*. Transfusion, 2009. **49**(8): p. 1546-53.
51. Ram, S., L.A. Lewis, and P.A. Rice, *Infections of people with complement deficiencies and patients who have undergone splenectomy*. Clin Microbiol Rev, 2010. **23**(4): p. 740-80.
52. Rassow J, H.K., Netzker R, Deutzmann R, *Biochemie*. Duale Reihe. Vol. 1. 2006, Stuttgart: Thieme. 696-698.
53. Klinker, R.P., H.-C.; Silbernagel, S., *Physiologie*. Vol. 5. 2005: Thieme. 202.
54. Ricklin, D., et al., *Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis*. Nat Immunol, 2010. **11**(9): p. 785-97.
55. Janssen, B.J., et al., *Structure of C3b reveals conformational changes that underlie complement activity*. Nature, 2006. **444**(7116): p. 213-6.
56. Kim, W.d., Song, W.C., *Membrane complement regulatory proteins*. Clinical Immunology, 2006. **118**(2-3): p. 127-136.
57. Liu, D. and Z.X. Niu, *The structure, genetic polymorphisms, expression and biological functions of complement receptor type 1 (CR1/CD35)*. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2009. **31**(4): p. 524-35.
58. Furtado, P.B., et al., *The partly folded back solution structure arrangement of the 30 SCR domains in human complement receptor type 1 (CR1) permits access to its C3b and C4b ligands*. J Mol Biol, 2008. **375**(1): p. 102-18.
59. Sedlacek, H.-H., *Die Immunabwehr des Menschen*. 2009, Schweiz, Altendorf: Skript Verlag Kühnel. 261-162.
60. Cohen, J.H., et al., *Peripheral catabolism of CR1 (the C3b receptor, CD35) on erythrocytes from healthy individuals and patients with systemic lupus erythematosus (SLE)*. Clin Exp Immunol, 1992. **87**(3): p. 422-8.
61. Wilson, J.G., et al., *Decreased expression of the C3b/C4b receptor (CR1) and the C3d receptor (CR2) on B lymphocytes and of CR1 on neutrophils of patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1986. **29**(6): p. 739-47.

62. Khera, R. and N. Das, *Complement Receptor 1: disease associations and therapeutic implications*. Mol Immunol, 2009. **46**(5): p. 761-72.
63. Birmingham, D.J., et al., *Consumption of erythrocyte CR1 (CD35) is associated with protection against systemic lupus erythematosus renal flare*. Clin Exp Immunol, 2006. **143**(2): p. 274-80.
64. Kumar, A., A.N. Malaviya, and L.M. Srivastava, *Lowered expression of C3b receptor (CR1) on erythrocytes of rheumatoid arthritis patients*. Immunobiology, 1994. **191**(1): p. 9-20.
65. Ripoche, J. and R.B. Sim, *Loss of complement receptor type 1 (CR1) on ageing of erythrocytes. Studies of proteolytic release of the receptor*. Biochem J, 1986. **235**(3): p. 815-21.
66. Iida, K. and V. Nussenzweig, *Complement receptor is an inhibitor of the complement cascade*. J Exp Med, 1981. **153**(5): p. 1138-50.
67. Ross, G.D., et al., *Generation of three different fragments of bound C3 with purified factor I or serum. I. Requirements for factor H vs CR1 cofactor activity*. J Immunol, 1982. **129**(5): p. 2051-60.
68. Medof, M.E. and V. Nussenzweig, *Control of the function of substrate-bound C4b-C3b by the complement receptor Cr1*. J Exp Med, 1984. **159**(6): p. 1669-85.
69. Ghiran, I., et al., *Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannan-binding lectin*. J Exp Med, 2000. **192**(12): p. 1797-808.
70. Yoshida, K., Y. Yukiama, and T. Miyamoto, *Interaction between immune complexes and C3b receptors on erythrocytes*. Clin Immunol Immunopathol, 1986. **39**(2): p. 213-21.
71. Craig, M.L., A.J. Bankovich, and R.P. Taylor, *Visualization of the transfer reaction: tracking immune complexes from erythrocyte complement receptor 1 to macrophages*. Clin Immunol, 2002. **105**(1): p. 36-47.
72. Fearon, D.T., I. Kaneko, and G.G. Thomson, *Membrane distribution and adsorptive endocytosis by C3b receptors on human polymorphonuclear leukocytes*. J Exp Med, 1981. **153**(6): p. 1615-28.
73. Ehlenberger, A.G. and V. Nussenzweig, *The role of membrane receptors for C3b and C3d in phagocytosis*. J Exp Med, 1977. **145**(2): p. 357-71.
74. Schorlemmer, H.U., T. Hofstaetter, and F.R. Seiler, *Phagocytosis of immune complexes by human neutrophils and monocytes: relative importance of Fc and C3b receptors*. Behring Inst Mitt, 1984(76): p. 88-97.
75. uniprot. *P08174 (DAF\_HUMAN)*. 2013 [cited 2014; 163:[Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P08174>.
76. William, E.P., *Fundamental Immunology*. Vol. 7. 2013, Philadelphia, US: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business. 688.
77. Lukacik, P., Roversi, P., White, J. *Decay Accelerating Factor (CD55): The structure of an intact human complement regulator*. . [cited 2014; Available from: <http://pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1OJV>.
78. uniprot. *P13987 (CD59\_HUMAN)*. 2013 Dez 2013 [cited 2014; Available from: <http://www.uniprot.org/uniprot/P13987>.
79. Leath, K.J., et al., *High-resolution structures of bacterially expressed soluble human CD59*. Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun, 2007. **63**(Pt 8): p. 648-52.
80. Ruiz-Delgado, G.J., et al., *Abnormalities in the expression of CD55 and CD59 surface molecules on peripheral blood cells are not specific to paroxysmal nocturnal hemoglobinuria*. Hematology, 2009. **14**(1): p. 33-7.

81. Arese, P., F. Turrini, and E. Schwarzer, *Band 3/complement-mediated recognition and removal of normally senescent and pathological human erythrocytes*. Cell Physiol Biochem, 2005. **16**(4-6): p. 133-46.
82. Pantaleo, A., et al., *Naturally occurring anti-band 3 antibodies and red blood cell removal under physiological and pathological conditions*. Autoimmun Rev, 2008. **7**(6): p. 457-62.
83. Lutz, H.U., *Innate immune and non-immune mediators of erythrocyte clearance*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2004. **50**(2): p. 107-16.
84. Kay, M., *Immunoregulation of cellular life span*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1057**: p. 85-111.
85. Zhang, D., et al., *Crystallographic structure and functional interpretation of the cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3*. Blood, 2000. **96**(9): p. 2925-33.
86. Gottlieb, Y., et al., *Physiologically aged red blood cells undergo erythrophagocytosis in vivo but not in vitro*. Haematologica, 2012. **97**(7): p. 994-1002.
87. Oldenborg, P.A., H.D. Gresham, and F.P. Lindberg, *CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPalpha) regulates Fcgamma and complement receptor-mediated phagocytosis*. J Exp Med, 2001. **193**(7): p. 855-62.
88. Oldenborg, P.A., *Role of CD47 as a Marker of Self on Red Blood Cells*. Science, 2000. **288**(5473): p. 2051-2054.
89. Olsson, M., A. Nilsson, and P.A. Oldenborg, *Dose-dependent inhibitory effect of CD47 in macrophage uptake of IgG-opsonized murine erythrocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **352**(1): p. 193-7.
90. Olsson, M. and P.A. Oldenborg, *CD47 on experimentally senescent murine RBCs inhibits phagocytosis following Fcgamma receptor-mediated but not scavenger receptor-mediated recognition by macrophages*. Blood, 2008. **112**(10): p. 4259-67.
91. Tsai, R.K., P.L. Rodriguez, and D.E. Discher, *Self inhibition of phagocytosis: the affinity of 'marker of self' CD47 for SIRPalpha dictates potency of inhibition but only at low expression levels*. Blood Cells Mol Dis, 2010. **45**(1): p. 67-74.
92. Okazawa, H., et al., *Negative regulation of phagocytosis in macrophages by the CD47-SHPS-1 system*. J Immunol, 2005. **174**(4): p. 2004-11.
93. Kamel, N., et al., *Effects of storage time and leucocyte burden of packed and buffy-coat depleted red blood cell units on red cell storage lesion*. Blood Transfus, 2010. **8**(4): p. 260-6.
94. Matozaki, T., et al., *Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPalpha signalling pathway*. Trends Cell Biol, 2009. **19**(2): p. 72-80.
95. Misha Rahman, P.D., *<Introduction to Flow Cytometry>*. AbD seroTec.
96. Kuhlmann, W.D., *Standard Arbeitsanweisung Blutgruppenbestimmung AB0 und Rh-Faktor*, 2010: Koblenz.
97. Kamhieh-Milz, J., et al., *Storage of RBCs results in an increased susceptibility for complement-mediated degradation*. Transfus Med, 2014. **24**(6): p. 392-9.
98. Goldman L, S.A., . *GOLDMAN-CICIL MEDICINE*. ELSEVIER. **1-2**(TRANSFUSION MEDICINE): p. 1191.
99. Wallace, E.L., et al., *Collection and transfusion of blood and blood components in the United States, 1989*. Transfusion, 1993. **33**(2): p. 139-44.
100. Garratty, G., *Immunobiology of Transfusion Medicine*. 1993, New York: Marcel Dekker, Inc.
101. Lin, Z., et al., *Complement C3dg-mediated erythrophagocytosis: implications for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria*. Blood, 2015. **126**(7): p. 891-4.

102. Chaplin, H., M. Nasongkla, and M.C. Monroe, *Quantitation of red blood cell-bound C3d in normal subjects and random hospitalized patients*. Br J Haematol, 1981. **48**(1): p. 69-78.
103. Szymanski, I.O. and P.R. Odgren, *Studies on the preservation of red blood cells. Attachment of the third component of human complement to erythrocytes during storage at 4 degrees C*. Vox Sang, 1979. **36**(4): p. 213-24.
104. Freedman, J. and C. Barefoot, *Red blood cell-bound C3d in normal subjects and in random hospital patients*. Transfusion, 1982. **22**(6): p. 511-4.
105. Freedman, J., *Membrane-bound immunoglobulins and complement components on young and old red cells*. Transfusion, 1984. **24**(6): p. 477-81.
106. Szymanski, I.O., R.E. Swanton, and P.R. Odgren, *Quantitation of the third component of complement on stored red cells*. Transfusion, 1984. **24**(3): p. 194-7.
107. Freedman, J. and A. Massey, *Complement components detected on normal red blood cells taken into EDTA and CPD*. Vox Sang, 1979. **37**(1): p. 1-8.
108. Kobayashi, E., et al., *[Complement activation in citrate plasma--inhibitory effect of anticoagulants on serum complement activation]*. Rinsho Byori, 1999. **47**(2): p. 160-4.
109. Gevi, F., et al., *Alterations of red blood cell metabolome during cold liquid storage of erythrocyte concentrates in CPD-SAGM*. J Proteomics, 2012. **76 Spec No.**: p. 168-80.
110. Moldenhauer, F., M. Botto, and M.J. Walport, *The rate of loss of CR1 from ageing erythrocytes in vivo in normal subjects and SLE patients: no correlation with structural or numerical polymorphisms*. Clin Exp Immunol, 1988. **72**(1): p. 74-8.
111. Pascual, M., et al., *Proteolytic cleavage of CR1 on human erythrocytes in vivo: evidence for enhanced cleavage in AIDS*. Eur J Immunol, 1994. **24**(3): p. 702-8.
112. Fishelson, Z. and Y. Marikovsky, *Reduced CR1 expression on aged human erythrocytes: immuno-electron microscopic and functional analysis*. Mech Ageing Dev, 1993. **72**(1): p. 25-35.
113. Lutz, H.U., et al., *Density separation of human red blood cells on self forming Percoll gradients: correlation with cell age*. Biochim Biophys Acta, 1992. **1116**(1): p. 1-10.
114. Long, K.E., et al., *Time-dependent loss of surface complement regulatory activity during storage of donor blood*. Transfusion, 1993. **33**(4): p. 294-300.
115. Rubin, O., et al., *Red blood cell microparticles: clinical relevance*. Transfus Med Hemother, 2012. **39**(5): p. 342-7.
116. Solheim, B.G., et al., *Improved preservation of coagulation factors after pre-storage leukocyte depletion of whole blood*. Transfus Apher Sci, 2003. **29**(2): p. 133-9.
117. Pascual, M., et al., *Release of vesicles enriched in complement receptor 1 from human erythrocytes*. J Immunol, 1993. **151**(1): p. 397-404.
118. Dervillez, X., et al., *Catabolism of the human erythrocyte C3b/C4b receptor (CR1, CD35): vesiculation and/or proteolysis?* Immunopharmacology, 1997. **38**(1-2): p. 129-40.
119. Veale, M.F., G. Healey, and R.L. Sparrow, *Effect of additive solutions on red blood cell (RBC) membrane properties of stored RBCs prepared from whole blood held for 24 hours at room temperature*. Transfusion, 2011. **51 Suppl 1**: p. 25S-33S.

120. Klopstock, A., et al., *Hereditary Nature of the Behaviour of Erythrocytes in the Immune Adherence Haemagglutination Phenomenon*. Vox Sang, 1965. **10**: p. 177-87.
121. Wilson, J.G., et al., *Identification of a restriction fragment length polymorphism by a CR1 cDNA that correlates with the number of CR1 on erythrocytes*. J Exp Med, 1986. **164**(1): p. 50-9.
122. Walport, M.J., et al., *Family studies of erythrocyte complement receptor type 1 levels: reduced levels in patients with SLE are acquired, not inherited*. Clin Exp Immunol, 1985. **59**(3): p. 547-54.
123. Krych-Goldberg, M., J.M. Moulds, and J.P. Atkinson, *Human complement receptor type 1 (CR1) binds to a major malarial adhesin*. Trends Mol Med, 2002. **8**(11): p. 531-7.
124. Krych-Goldberg, M. and J.P. Atkinson, *Structure-function relationships of complement receptor type 1*. Immunol Rev, 2001. **180**: p. 112-22.
125. Burger, P., et al., *CD47 functions as a molecular switch for erythrocyte phagocytosis*. Blood, 2012. **119**(23): p. 5512-21.
126. Anniss, A.M. and R.L. Sparrow, *Expression of CD47 (integrin-associated protein) decreases on red blood cells during storage*. Transfus Apher Sci, 2002. **27**(3): p. 233-8.
127. Karon, B.S., et al., *Temporal sequence of major biochemical events during blood bank storage of packed red blood cells*. Blood Transfus, 2012. **10**(4): p. 453-61.
128. Bosman, G.J., et al., *Erythrocyte ageing in vivo and in vitro: structural aspects and implications for transfusion*. Transfus Med, 2008. **18**(6): p. 335-47.
129. Markiewski, M.M. and J.D. Lambris, *The role of complement in inflammatory diseases from behind the scenes into the spotlight*. Am J Pathol, 2007. **171**(3): p. 715-27.
130. Amara, U., et al., *Interaction between the coagulation and complement system*. Adv Exp Med Biol, 2008. **632**: p. 71-9.
131. Collard, C.D., et al., *Complement activation after oxidative stress: role of the lectin complement pathway*. Am J Pathol, 2000. **156**(5): p. 1549-56.
132. Flegel, W.A., C. Natanson, and H.G. Klein, *Does prolonged storage of red blood cells cause harm?* Br J Haematol, 2014. **165**(1): p. 3-16.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Bettina Uta Bartl, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

*Der Einfluss der Lagerung von Erythrozytenkonzentraten auf die  
Komplementaktivierung*

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Bettina Uta Bartl hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Publikation 1: Kamhieh-Milz J\*, **Bartl B\***, Sterzer V, Kamhieh-Milz S, Salama A, Storage of RBC results in an increased susceptibility for complement-mediated degradation. Transfus Med, 2014.

Beitrag im Einzelnen

Teilhabe an der Patientenrekrutierung und der Etablierung der Methoden. Eigenständige Durchführung des DAT, der Transfusionssimulation, des Hämolysetests und der Vorbereitung der Proben für die FACS Analyse. Hauptanteil der FACS Analyse. Mitwirkung bei der statistischen Analyse der Primärdaten und Interpretation der Daten. Eigenständige Literaturrecherche und Teilhabe an der Verfassung des Manuskripts.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin



## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Publikationsliste

Kamhieh-Milz J\*, **Bartl B\***, Sterzer V, Kamhieh-Milz S, Salama A, Storage of RBC results in an increased susceptibility for complement-mediated degradation. Transfus Med, 2014. 24 (6): p. 392-9.

\*geteilte Erstautorschaft