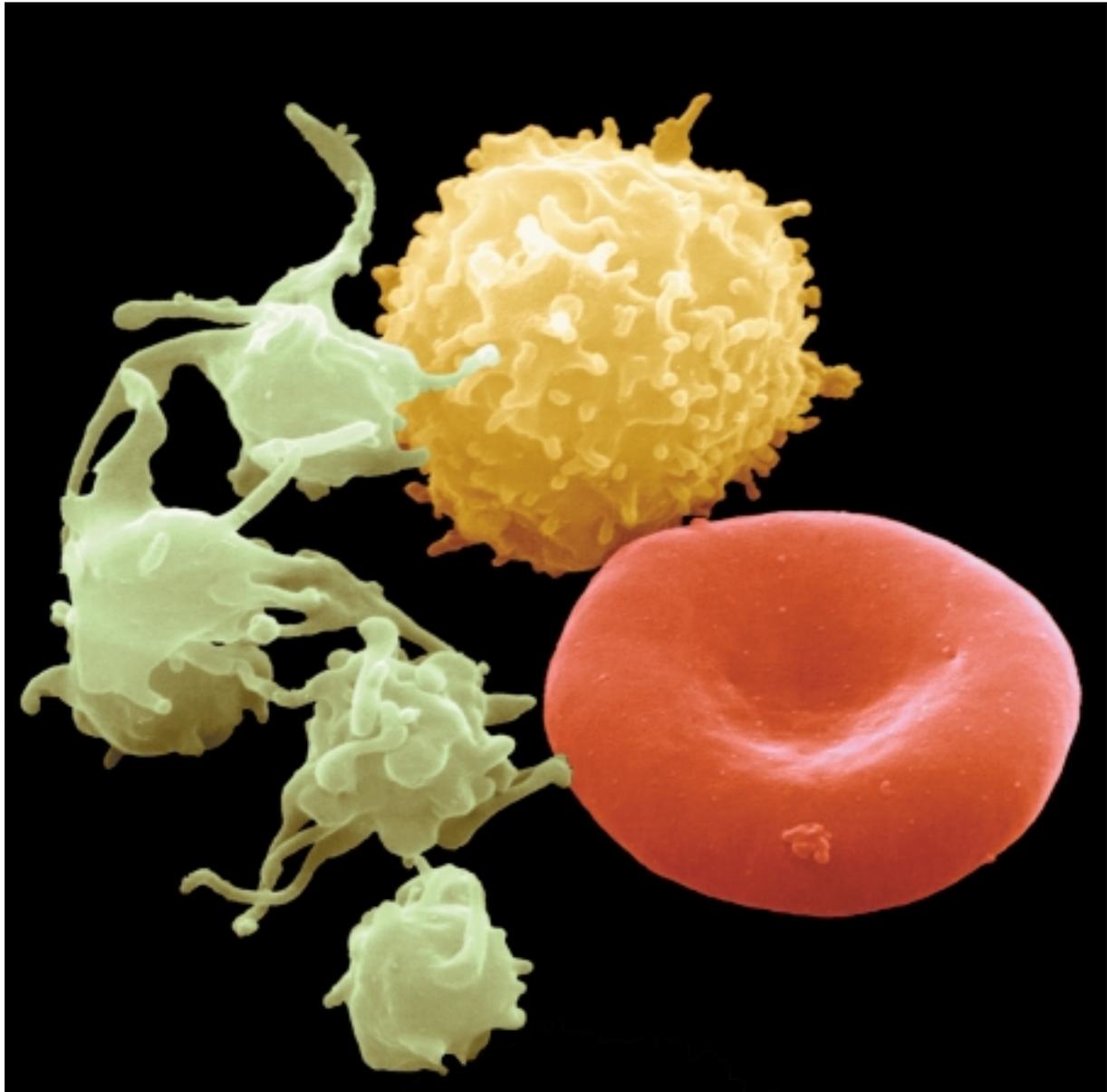


Forschungsbericht 200 I/2002 des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen gGmbH



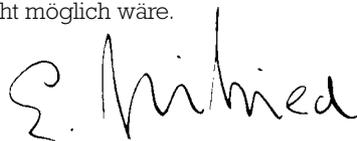
Forschung ist kein Selbstzweck. Sie ist vielmehr dem Menschen und der Erhaltung und Verbesserung seiner Lebensbedingungen verpflichtet. Durch die Entwicklung neuer Technologien der Diagnostik und Therapie von Erkrankungen sowie fundamentale Erkenntnissprünge etwa durch die Entschlüsselung des menschlichen Genoms nehmen insbesondere die medizinischen Wissenschaften in dieser Hinsicht heute wie kaum eine andere Disziplin eine zentrale Rolle ein. Dies wird auch durch die Tatsache reflektiert, dass die medizinische Forschung heute mehr denn je im Mittelpunkt des öffentlichen Interesses steht.

Mit der wachsenden Bedeutung der medizinischen Forschung wächst aber gleichzeitig auch die Verpflichtung, ihre Ergebnisse transparent und zugänglich zu machen und dafür zu sorgen, dass sie effizient und schnell in wirksame therapeutische Konzepte zur Behandlung von schwerwiegenden Erkrankungen umgesetzt werden. Die Implementierung und Einbindung der gewonnenen Erkenntnisse in die diagnostische und therapeutische Praxis muss ein zentrales Anliegen der anwendungsorientierten Forschung sein und stellt daher auch einen wichtigen Fokus der Forschung des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen an seinen Forschungsstandorten Frankfurt, Ulm, Mannheim und Baden-Baden dar. So sind beispielsweise die epidemiologischen Forschungen und Arbeiten zur Erhöhung der Sicherheit in der Transfusionsmedizin im Themenschwerpunkt Hämotherapie des DRK-Blutspendedienstes in international anerkannte Sicherheitsstandards eingeflossen und haben diese wesentlich mit geprägt. Durch die Arbeiten zur Stammzelltransplantation und Immunzytotherapie konnte unsere Forschung substantielle Beiträge zur Verbesserung der onkologischen Therapie leisten und hat wichtige Erkenntnisse zum Verständnis der Stammzellbiologie geliefert. In den Themenschwerpunkten Gentherapie angeborener Erkrankungen des Blutes, Immunhämatologie, Transplantationsimmunologie und Hämostaseologie konnten schließlich wichtige Erkenntnisse zur Therapie verschiedener Bluterkrankungen wie der Hämophilie A, zur Aufklärung von Genstrukturen oder zur Optimierung serologischer und molekularbiologischer Diagnostik gewonnen werden. Über diese Arbeiten und ihre Ergebnisse möchten wir mit dem vorliegenden Forschungsbericht informieren.

Viele der Arbeiten sind als Kooperationsprojekte mit universitären Arbeitsgruppen, außeruniversitären Forschungsgruppen, etwa dem Georg-Speyer-Haus, oder in Industriekooperationen durchgeführt worden. Dies ist insbesondere deshalb von Bedeutung, da Kooperationsbereitschaft und Kooperationen in unserem Verständnis ein zentrales Element einer modernen Forschungspolitik und -struktur darstellt. Nur so können Synergien genutzt, Effizienzpotenziale ausgeschöpft und für die medizinische Therapie optimal nutzbar gemacht werden.

Nicht zuletzt gibt der Forschungsbericht aber auch Rechenschaft über die verwendeten Forschungsmittel. Mit über 3.000.000 Euro konnte im Berichtszeitraum ein beträchtlicher Betrag an Drittmitteln an den Forschungsstandorten Frankfurt, Ulm und Mannheim eingeworben werden. Daneben wurden erhebliche Forschungsinvestitionen von den Universitäten und aus eigenen Mitteln finanziert, die der DRK-Blutspendedienst aus seiner Geschäftstätigkeit erwirtschaftet hat. Der vorliegende Forschungsbericht des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen umfasst die Kalenderjahre 2001 und 2002. Er ist Teil des wissenschaftlichen Berichtswesens und wird in dieser Form zum ersten Mal veröffentlicht. Da der Forschungsbericht nicht nur die Fachkollegen, sondern auch eine interessierte Öffentlichkeit erreichen und über unsere Forschung informieren soll, werden die einzelnen Forschungsarbeiten neben der wissenschaftlichen Darstellung auch in einer dem Laien verständlichen Zusammenfassung präsentiert. Ein ausführliches Glossar am Ende des Forschungsberichts bildet eine weitere wichtige Informationshilfe.

Allen Wissenschaftlern und Mitarbeiterinnen sei für die Erarbeitung, die Bereitstellung und Zusammenfassung ihrer Forschungsergebnisse an dieser Stelle sehr herzlich gedankt. Ein besonderer Dank gilt auch allen ungenannten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern in den Instituten, ohne deren Engagement die Darstellung der hier gesammelten Ergebnisse nicht möglich wäre.



Prof. Dr. Erhard Seifried



**Prof. Dr. med.
Erhard Seifried**

**Ärztlicher Direktor
des DRK-
Blutspendedienstes
Baden-Württemberg –
Hessen**

	Seite
Editorial	3
Inhalt	4
Vorwort	6
Standort-Portraits	7
Institutsleiter	10
Science-Site-Map	12
Forschungsstruktur	14

Forschungsprojekte

Hämotherapie - Sicherheit von Blutprodukten	16
• Einführung	16
• Arbeitsgruppen	18
• Hepatitis-C-Virus: Einfluss von Core-Varianten bei der Entstehung von Hepatitis-C-Virus-assoziierten hepatozellulären Karzinomen	20
• Kompetenznetz Hepatitis: Hepatitis C bei Blutspendern: Epidemiologie, Eigenschaften und Prognosen	22
• Entwicklung eines automatisierbaren, auf Magnetic-Beads basierenden Verfahrens zur Nukleinsäure-Extraktion	24
• Multizentrische Studie zur Überprüfung der Wirksamkeit von virusinaktivierten Thrombozyten-Konzentraten	26
• Epidemiologie von HIV- und Hepatitisinfektionen bei Blutspendern	28
• Anwendungsorientierte Forschung und Entwicklung zur Optimierung der Testung und Herstellung von Blutprodukten	30
Transplantationsimmunologie	34
• Einführung	34
• Arbeitsgruppen	36
• Interaktion des KIR- und HLA-Rezeptorsystems bei Autoimmunerkrankungen und Transplantationen und Aufbau einer molekularbiologischen Untersuchungsmethode für die Bestimmung des KIR-Rezeptorsystems	38
• Feto-maternaler Mikrochimärismus und Regulation immunologischer Toleranz bei Autoimmunität	40
• Klinisch diagnostische Bedeutung von Zelllinien-spezifischem Chimärismus für den Verlauf nach Blutstammzelltransplantation	42
• Bedeutung von retroviralen Insertionen im Bereich des HLA-Systems für die Autoimmunität	44
• Bedeutung von HLA-Alleldifferenzen für die allogene Blutstammzelltransplantation	46
Immunhämatologie	48
• Einführung	48
• Arbeitsgruppen	49
• TANGO-Studie zur vollautomatischen Blutgruppenbestimmung Mikrotiterplatten-Agglutinations-Methode zur Bestimmung der irregulären Antikörper (Antikörpersuchtest)	52
• ABO-Genotypisierung kritischer Blutproben in der Transfusionsmedizin	54
• Aufklärung des Allel-Polymorphismus im Rhesus-Blutgruppensystem	56
• Charakterisierung des RH-Genortes auf dem menschlichen Chromosom	58
• Nationale Qualitätssicherung der derzeit empfohlenen Rhesus-Typisierungsstrategie	60
• Molekulare Basis von Blutgruppen-Systemen	62
• Entwicklung praxisgerechter Verfahren zur Genotypisierung von Blutgruppen	64
• Durchflusszytometrie zur Beschreibung des Erythrozyten-Phänotyps	66
Stammzelltransplantation und experimentelle Zelltherapie	68
• Einführung	68
• Arbeitsgruppen	70
• Grundlagen des Organ-Homings transplantiertter Blutstammzellen	74
• Interaktionen des hämostatischen Systems mit Blutvorläuferzellen	76
• Aktivierung der Migration von Stamm- und Vorläuferzellen für mesenchymale Gewebe und Endothel	78

• Adoptive Immuntherapie maligner Erkrankungen	80
• Adoptive Immuntherapie bei Mammakarzinom: Retargeting von NK-Zellen	82
• Gewinnung und Prozessierung von Blutstammzellen aus Nabelschnurblut	84
• Vergleich der Kriterien zur Qualitätskontrolle von Stammzellpräparationen aus Nabelschnurblut	86
• Optimierung der Zellausbeute in getauten Stammzellpräparationen durch Einsatz von rekombinanter humaner DNase	88
• Aufreinigungsverfahren zur Anreicherung von CD34 ⁺ - Zellen aus Plazentaresstblut-Transplantaten	90
• Dendritische Zellen (DC) aus CD34 ⁺ - und CD14 ⁺ -Zellen zur Immunvakzinierung	92
• Adoptive Immuntherapie mit NK-Zellen nach haploidenter Blutstammzelltransplantation	94
• Immuntherapie mit Removall TM : Untersuchung der antitumoralen Wirkung eines bispezifischen trifunktionellen Antikörperkomplexes im Chorioallantois-Modell	96
• Charakterisierung von immunogenen leukämieassoziierten Antigenen zur Entwicklung einer Vakzine	98
• Autologe dendritische Zellen zur Behandlung therapierefraktärer akuter myeloischer Leukämie	100
• Transdifferenzierung genetisch markierter adulter humaner Stammzellen zu Kardiomyozyten	102
Gentherapie angeborener Erkrankungen des Blutes	104
• Einführung	104
• Arbeitsgruppen	106
• Entwicklung eines gentherapeutischen Behandlungsansatzes zur Behandlung der Hämophilie A	108
• Untersuchung des Sekretionsweges von rekombinantem FVIII-Protein	110
• Analyse molekularbiologischer Ursachen angeborener Immundefekte	112
• Etablierung von Modellsystemen zur Genkorrektur	114
• Genkorrektur-Experimente am mEGFP-Locus	116
• Zell-Microarray-Technologie zum Hochdurchsatz-Screening von Transfektanten	118
Hämostaseologie	120
• Einführung	120
• Arbeitsgruppen	122
• Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Hämophilie A	124
• Immunogenetik der Hemmkörper-Hämophilie-A	126
• Molekulare Grundlagen hoher Faktor-VIII-Spiegel bei venöser Thrombembolie	128
• Molekulare Diagnostik von erblich bedingten hämorrhagischen und thromboembolischen Krankheitsbildern der Blutgerinnung	130
• Polymorphismenkarte von Genen der Blutgerinnung	132
• Identifizierung eines neuen Proteins aus dem Vitamin-K-Zyklus	134
• Klonierung und Expression von Proteinen der Blutgerinnung als Modell für die Entwicklung eines Mikrowaagen-Array/Massenspektrometrie (MAMS) für die funktionelle Proteomanalyse	136
• Genotyp-Phänotyp-Korrelation beim Hereditären Angioödem	138
• Molekulare Immunogenetik von Thrombozyten	140
• Sequenzpolymorphismen in P-Selektin und PSGL-1	142
• Gentranskripte und aktive Proteinbiosynthese in Thrombozyten	144
• Einfluss von Thrombozyten und thrombozytären Wachstumsfaktoren auf Wundheilung und Geweberegeneration	146
• Thrombozyten-Diagnostik bei Neonataler Immunthrombozytopenie	148
Publikationen	150
Vorträge	155
Veranstaltungen	156
Mitgliedschaften/Funktionen	162
Gesellschaftsstruktur	164
Förderer	165
Stichwortverzeichnis	166
Glossar	171
Impressum	174

1

2

3

4

5

6



**Prof. Dr. med.
Reinhard Kurth**
**Präsident des
Robert Koch-
Instituts, Berlin**

Die Bedeutung der anwendungsorientierten Humanforschung wie auch der medizinischen Grundlagenforschung hat in den vergangenen zwei Dekaden erheblich zugenommen. Die Erkenntnisse der medizinischen Wissenschaften etwa aus den Bereichen der Genomforschung, der Therapie onkologischer Erkrankungen oder der Entwicklung von Technologien der prä- und neonatalen Diagnostik und Therapie haben neue Perspektiven für die Gesundheitsversorgung und den begleitenden gesellschaftlichen Diskurs eröffnet. Wissenschaftliche Leistungsfähigkeit ist auch zu einem ökonomisch relevanten Faktor geworden, der wesentlich zur Profilierung des Forschungsstandortes Deutschland im internationalen Wettbewerb beiträgt und so gewährleistet, dass der hiesigen Forschung eine Schlüsselstellung bei der Beantwortung dringender globaler Fragen der Krankheitsbekämpfung und Gesundheitserhaltung zukommt.

Leistungsfähigkeit und Effizienz der wissenschaftlichen Arbeit sind direkte Funktionen der strukturellen Organisation von Forschung. An eben diesem Punkt setzen auch die Empfehlungen des Wissenschaftsrats zur künftigen Entwicklung des Wissenschaftssystems in Deutschland an und verweisen auf die noch bestehenden strukturellen und organisatorischen Defizite in der deutschen Forschungslandschaft. Um die vorhandenen Leistungspotenziale der Forschung in Deutschland noch besser als bisher ausschöpfen zu können, müssen neue Wege der Forschungsorganisation gefunden werden. Kooperationen, Vernetzung und leistungsorientierten strukturellen Reformen kommen hierbei eine besondere Bedeutung zu. Nicht nur, weil so die Qualität des Forschungsausoutputs gesteigert werden kann, sondern weil die Forschungsergebnisse unmittelbar auch der Qualität der medizinischen Versorgung zugute kommen.

Diesen Zusammenhang zwischen struktureller Organisation, wissenschaftlicher Leistungsfähigkeit und Qualität der diagnostischen und therapeutischen Versorgung dokumentiert die Forschung des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen eindrucksvoll. Der strategische Ansatz der Kooperation mit Universitäten, mit außeruniversitären Forschungseinrichtungen wie dem Georg-Speyer-Haus und mit Wirtschaftsunternehmen in Kombination mit der Struktur eines wirtschaftlich geführten Unternehmens und dem intelligenten und wirtschaftlichen Einsatz der Mittel aus der Geschäftstätigkeit des Blutspendedienstes in seiner Forschung zählt sich aus. Er setzt Potenziale frei, die sich in wissenschaftlicher Leistung höchsten Standards sowie in wegweisenden Konzepten der medizinischen Versorgung und Epidemiologie niederschlagen.

Die Arbeiten und Erkenntnisse aus den verschiedenen Forschungsbereichen des DRK-Blutspendedienstes haben wesentlich zum fundamentalen Verständnis verschiedener Erkrankungen, zur Entwicklung neuer und Verbesserung bestehender therapeutischer Ansätze sowie zur signifikanten Erhöhung der Sicherheit in der Transfusionsmedizin beigetragen und hier internationale Standards gesetzt.

Der vorliegende Forschungsbericht dokumentiert den qualitativ hochwertigen Leistungsstand dieser Arbeiten eindrucksvoll.

Auf der Basis des bisherigen beachtlichen wissenschaftlichen Fortschritts sind aber auch weiterhin große Anstrengungen in der Forschung notwendig, um neue künftige Herausforderungen mit qualifizierten Lösungen zu meistern. Hierfür bedarf es flexibler Strukturen, eines hohen Vernetzungsgrades und eines modernen Verständnisses von Forschung und Wissenschaft, wie es sich in der wissenschaftlichen Arbeit des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen widerspiegelt.

Professor Dr. Reinhard Kurth

Portrait des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen gGmbH

Der DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gehört zu den großen transfusionsmedizinischen Einrichtungen Deutschlands. Mit seiner regulären Geschäftstätigkeit, der Entgegennahme von Blutspenden und Versorgung der Krankenhäuser mit Blutprodukten, stellt das Unternehmen heute ca. 90% der Versorgung beider Bundesländer sicher. Im Berichtszeitraum waren in der Muttergesellschaft über 800 Mitarbeiter/-innen für das Unternehmen tätig. Gesellschafter des Unternehmens in der Rechtsform einer gGmbH sind die DRK-Landesverbände Baden-Württemberg und Hessen sowie die Stadt Frankfurt und das Klinikum Kassel. Seit 2002 gehören die DRK-Blutspendedienste Sachsen, seit 2003 zusätzlich die DRK-Blutspendedienste Berlin und Land Brandenburg als 100-prozentige Tochterunternehmen zum Unternehmen. Ehrenamtliche Mitglieder bilden den Aufsichts-

rat des Unternehmens, das seinen Sitz in Mannheim hat. An den Standorten Baden-Baden, Frankfurt, Kassel, Mannheim und Ulm unterhält das Unternehmen eigene Institute. In Frankfurt, Mannheim und Ulm sind neben den zentralen Versorgungsaufgaben auch die Forschungstätigkeiten des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen angesiedelt. Diese Institute werden von Universitätsprofessoren (Lehrstuhlinhabern) geleitet, die eine universitäre Forschung gewährleisten sollen. In den vergangenen Jahren wurde zusätzlich zu den Versorgungsaufgaben konsequent der Aufbau einer Infrastruktur für die Forschung betrieben und wissenschaftliche Arbeitsgruppen an den Instituten etabliert. Heute stellt die Forschungstätigkeit einen festen Bestandteil der Unternehmensstrategie im Sinne einer Zukunftssicherung des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen dar.

Das Institut Baden-Baden

Das Institut in Baden-Baden stellt die Versorgung von über 130 Krankenhäusern in Baden-Württemberg mit Blutprodukten sicher. Insgesamt sind hier 241 Mitarbeiter/-innen beschäftigt.

Das Institut wird seit 1999 von Herrn Dr. med. Ekkehard Richter geleitet und ist primär ein Versorgungsstandort. Die ausschließlich anwendungsorientierten Forschungsprojekte betreffen die Optimierung der Herstellung von Blutkomponenten und die Untersuchung immunhämatologischer Fragestellungen. Es besteht eine Kooperation mit Arbeitsgruppen der Internationalen Gesellschaft für Bluttransfusion (ISBT), des Internationalen Referenzlabors für Blutgruppen in Bristol (United Kingdom) und dem New York Blood Center (USA).



Das Institut Frankfurt

Das Institut in Frankfurt nimmt die Versorgung des Universitätsklinikums Frankfurt am Main in allen transfusionsmedizinischen Belangen wahr und stellt in Mittel- und Südhessen die Versorgung von insgesamt 100 Krankenhäusern mit Blutprodukten sicher. Ferner ist die hessische Knochenmark- und Stammzelldatei mit knapp 40.000 registrierten Spendern in Frankfurt angesiedelt. Das Institut ist Referenzzentrum für die Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO) für den Bereich Deutschland Mitte, d. h. alle Organspender und -empfänger in diesem Bereich werden hier untersucht. Insgesamt arbeiten am Institut 340 Mitarbeiter/-innen. Das Frankfurter Institut wird seit 1993 von Herrn Prof. Dr. med. Erhard Seifried geleitet, der auch eine Professur (Lehrstuhl) für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie am Fachbereich Medizin (Universitätsklinikum) der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, innehat. Mit der Etablierung mehrerer wissenschaftlicher Arbeitsgruppen in den letzten Jahren und dem Bezug eines modernen Neubaus im Jahr 2002 wurden die Forschungsaktivitäten kontinuierlich auf- und ausgebaut. Die Forschungsprojekte umfassen die Bereiche der Infektionssicherheit von Blutprodukten durch Weiterentwicklung der NAT-Testung, der Entwicklung neuer experimenteller Tumorthérapien mittels NK-Zellen und neuer Genterapieansätze zur Behandlung der Hämophilie A sowie der Transplantationsimmunologie, Stammzellbiologie und Blutgerinnung.



Das Institut Kassel

Das Institut in Kassel stellt als eine 100-prozentige Tochter des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen die Versorgung von 43 Krankenhäusern in Nordhessen mit Blut und Blutprodukten sicher. Das Kasseler Institut wird von Herrn Dr. med. Gerhard Holzberger geleitet und beschäftigt derzeit über 70 Mitarbeiter/-innen. Der Standort Kassel hat ausschließlich Versorgungsaufgaben und führt keine eigenen Forschungsprojekte durch.



Das Institut Mannheim

Das Institut in Mannheim versorgt das Universitätsklinikum Mannheim in allen transfusionsmedizinischen Belangen sowie über 25 Krankenhäuser im Norden Baden-Württembergs und im Rhein-Neckar-Raum mit Blutprodukten. Neben der Verwaltung einer regionalen Knochenmark-Spenderdatei gehört auch die bundesweit zweitgrößte Nabelschnurblutbank dem Institut an. Das Institut wird seit 1999 von Herrn Prof. Dr. med. Harald Klüter geleitet, der auch eine C4-Professur für Transfusionsmedizin und Immunologie an der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg innehat. Am Institut wurden ein GMP-Reinraum sowie neue Laborräume eingerichtet. Die in den letzten Jahren neu etablierten Forschungsschwerpunkte umfassen u. a. die Zell- und Immuntherapie mittels Blutstammzellen aus Nabelschnurblut, die Untersuchung der Signaltransduktion von Thrombozyten, die Thrombozytenimmunologie, die Inaktivierung von viralen und bakteriellen Pathogenen in Blutprodukten sowie die Entwicklung neuer, vollautomatisierbarer Verfahren für die Blutgruppenserologie.



Das Institut Ulm

In Ulm wird die gesamte transfusionsmedizinische Versorgung des Universitätsklinikums und von über 130 Krankenhäusern in der Region durch das Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immunogenetik Ulm (IKT) wahrgenommen. Das IKT ist ein Gemeinschaftsunternehmen des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen und des Universitätsklinikums Ulm. Die Forschung stellt am Ulmer Institut durch die enge Verzahnung mit der Abteilung Transfusionsmedizin der Universität traditionell einen Schwerpunkt dar. Die Leitung des IKT wurde 2002 von Herrn Prof. Dr. med. Hubert Schrezenmeier übernommen, der damit die Nachfolge von Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Kubanek antrat. Der jetzige Institutsleiter hat eine neu etablierte C4-Professur für Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Ulm inne. Die Forschungsaktivitäten umfassen u. a. die molekulare Genetik von Blutgruppen- und HLA-Antigenstrukturen, die molekularbiologische Analyse und Genterapie angeborener Immundefektsyndrome sowie die Stammzelltransplantation und experimentelle Zelltherapie. Große Bedeutung hat das als eigenständige Tochtergesellschaft des Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen angegliederte Zentrale Knochenmarkspender-Register (ZKRD). Von hier werden die Daten für 2 Millionen Spender verwaltet und jährlich etwa 11.500 Suchanfragen von Patienten aus dem In- und Ausland bearbeitet. Hier ist in Kooperation mit dem IKT auch die Datenzentrale des Deutschen Registers für Stammzelltransplantation (DRST) angesiedelt.



Adressen-Liste

DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gGmbH
Friedrich-Ebert-Straße 107
D-68167 Mannheim
Telefon: +49 (0)621 – 3706 - 0
Telefax: +49 (0)621 – 3706 - 805
E-Mail: info@bsd-hessen.de
Internet: www.bsdhessen.de

Sitz der Gesellschaft: Mannheim

Registergericht: AG Mannheim
HRB 8992
Umsatzsteuer-Identifikationsnummer: DE143461467

Zweigniederlassungen und zusätzliche Tochtergesellschaften in Baden-Baden, Frankfurt am Main, Kassel und Ulm

Aufsichtsratsvorsitzender:
Dr. Menz, Staatsminister a. D.

Geschäftsführer:
Prof. Dr. E. Seifried, G. Soedel,
M. Stähle

Institut Baden-Baden, DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gGmbH
Gunzenbachstraße 35
D-76530 Baden-Baden
Telefon: +49 (0)7221 – 214 - 0
Telefax: +49 (0)7221 – 214 - 435

Institut Frankfurt, DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gGmbH
Sandhofstraße 1
D-60528 Frankfurt
Telefon: +49 (0)69 – 6782 - 0
Telefax: +49 (0)69 – 6782 - 160

Institut Kassel, DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gGmbH
Mönchebergstraße 57
D-34125 Kassel
Telefon: +49 (0)561 – 8793 - 0
Telefax: +49 (0)561 – 8753 - 96

Institut Mannheim, DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gGmbH
Friedrich-Ebert-Straße 107
D-68167 Mannheim
Telefon: +49 (0)621 – 3706 - 0
Telefax: +49 (0)621 – 3706 - 818

Institut Ulm, DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gGmbH und IKT Ulm gGmbH
Helmholtzstraße 10
D-89081 Ulm
Telefon: +49 (0)731 – 150 - 0
Telefax: +49 (0)731 – 150 - 575



**Institutsleitung:
Prof. Dr. med.
Erhard Seifried**

**Professor Dr. med. Erhard Seifried
Institutsleiter Frankfurt**

Studium

1972 – 1978 Studium der Humanmedizin in Tübingen

1978 Staatsexamen

1979 – 1993 Medizinische Universitätsklinik Ulm

1980 Dissertation

1989 Habilitation

Berufliche Tätigkeit

seit 1993 Ärztlicher Direktor des Institutes für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie Frankfurt, Geschäftsführer des Blutspendedienstes Hessen des DRK

seit 1996 (außerplanmäßig) Professur für Innere Medizin Universität Ulm

seit 2001 Ärztlicher Direktor und Geschäftsführer des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen

seit 2002 Professur (C4) für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie an der Universität Frankfurt

Sonstiges

Arzt für Innere Medizin, Hämatologie und Internistische Onkologie, Transfusionsmedizin

Mitglied des Arbeitskreises Blut am Robert-Koch-Institut Berlin

1997 Vorstand der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostase-Forschung e. V. (GTH), Schatzmeister

2002 Stellv. Vorsitzender der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie e. V. (DGTI)



**Institutsleitung:
Prof. Dr. med.
Harald Klüter**

**Professor Dr. med. Harald Klüter
Institutsleiter Mannheim**

Studium

1979 – 1982 Studium der Pharmazie in Mainz

1982 – 1989 Studium der Medizin in Mainz und Lübeck

1991 Dissertation

1997 Habilitation

Berufliche Tätigkeit

1989 – 1999 Mitarbeit am Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, im Transplantationszentrum und in der hämatologischen Abteilung der Medizinischen Universität Lübeck

1996 Facharzt für Transfusionsmedizin

seit 1999 Lehrstuhl (C4) für Transfusionsmedizin und Immunologie an der Fakultät Klinische Medizin Mannheim der Universität Heidelberg und Ärztlicher Leiter des Instituts für Transfusionsmedizin und Immunologie des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen

Sonstiges

1998 Fritz-Schiff-Preis der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie e. V. (DGTI)

2002 Vorstand der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie e. V. (DGTI), Beisitzer

2001 2. Vorsitzender der Arbeitsgemeinschaft der Knochenmarkspender-Dateien Deutscher Blutspendedienste e. V.



**Institutsleitung:
Prof. Dr. med.
Hubert Schrezenmeier**

**Professor Dr. med. Hubert Schrezenmeier
Institutsleiter Ulm**

Studium

1980 – 1986 Studium der Humanmedizin in Ulm

1986 Staatsexamen

1988 Dissertation

1995 Habilitation

Berufliche Tätigkeit

1988 – 1996 Assistent in der Inneren Medizin, Universitätsklinik Ulm

1996 – 1999 Oberarzt in der Inneren Medizin, Universitätsklinik Ulm

1999 – 2002 Professor (C3) an der Klinik für Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin, Universitätsklinik Benjamin Franklin, Berlin

seit 2002 Professor für Transfusionsmedizin (C4), Leitung der Abteilung Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Ulm und ärztliche Leitung des Instituts für Klinische Transfusionsmedizin und Immunogenetik Ulm

Sonstiges

seit 1998 Vorsitzender der „Working Party on Severe Aplastic Anemia“ der EBMT

Vorsitzender des Deutschen Registers für Stammzelltransplantation (DRST)

Facharztqualifikationen

Arzt für Innere Medizin, Hämatologie und Internistische Onkologie, Transfusionsmedizin



**Institutsleitung:
Prof. Dr. med.
Bernhard Kubanek**

**Professor Dr. med. Bernhard Kubanek
Institutsleiter Ulm (bis 2002)**

Studium

1954 – 1960 Studium der Humanmedizin an den Universitäten München und Freiburg

1960 Staatsexamen

1961 Promotion

1971 Habilitation

Berufliche Tätigkeit

1975 Außerplanmäßiger Professor

1979 – 06/2002 Ärztlicher Direktor des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg und der

Abteilung Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Ulm

Sonstiges

Mitglied des Nationalen AIDS-Beirats des Bundesgesundheitsministeriums

Mitglied des Redaktionskomitees „Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion (Hämotherapie)“ des Wissenschaftlichen Beirats der Bundesärztekammer

Facharztqualifikationen

Arzt für Innere Medizin, Hämatologie und Internistische Onkologie, Transfusionsmedizin

**Dr. med. Ekkehard Richter
Institutsleiter Baden-Baden**

Studium

1974 – 1980 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät (Charité) der Humboldt-Universität zu Berlin

1980 Staatsexamen

1981 Dissertation

1985 Facharzt für Blutspende- und Transfusionswesen

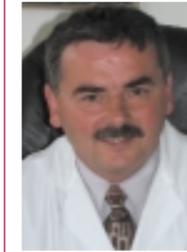
1988 Facultas docendi

Berufliche Tätigkeit

1980 – 1993 Assistenzarzt und Abteilungsleiter am Institut für Transfusiologie und Transplantologie am Bereich Medizin (Charité) der Humboldt-Universität zu Berlin

1993 – 1999 Abteilungsleiter und Herstellungsleiter am Institut Mannheim des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg

seit 1999 Institutsleiter am Institut Baden-Baden des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen



**Institutsleitung:
Dr. med.
Ekkehard Richter**

**Dr. med. Gerhard Holzberger
Institutsleiter Kassel**

Studium

1972 – 1977 Studium der Biologie und Chemie in Frankfurt

1977 – 1983 Studium der Humanmedizin in Frankfurt

Berufliche Tätigkeit

1984 – 1988 Assistenzarzt DRK-Blutspendedienst Hessen, Frankfurt

1990 Anerkennung Facharzt für Transfusionsmedizin

1988 – 1993 Leiter des Labors für Transplantationsimmunologie und Immunogenetik, DRK-Blutspendedienst Hessen, Frankfurt

seit 1993 Ärztlicher Leiter DRK-Blutspendedienst Hessen, Institut Kassel

Sonstiges

1995-1997 Vertreter Deutschlands bei Eurotransplant im Tissue Typing Advisory Board

Vorstand der Deutschen Gesellschaft für Immunogenetik e. V. (DGI), Schatzmeister

Vorstand der Arbeitsgemeinschaft der Knochenmark- und Stammzellspender-Dateien Deutscher Blutspendedienste e. V. (ARGE-KMSB)



**Institutsleitung:
Dr. med.
Gerhard Holzberger**

Forschungsstandorte und ihre Projekte

Deutsches Rotes Kreuz

	Frankfurt	Mannheim	Ulm	Baden-Baden	
1 Hämotherapie- Sicherheit von Blutprodukten	<p>Hepatitis-C-Virus: Einfluss von Core-Varianten bei der Entstehung von Hepatitis-C-Virus-assoziierten hepatozellulären Karzinomen</p> <p>Kompetenznetz Hepatitis: Hepatitis C bei Blutspendern: Epidemiologie, Eigenschaften und Prognosen</p> <p>Entwicklung eines automatisierbaren, auf Magnetic-Beads basierenden Verfahrens zur Nukleinsäure-Extraktion</p>	<p>Multizentrische Studie zur Überprüfung der Wirksamkeit von virusinaktivierten Thrombozytenkonzentraten</p>	<p>Epidemiologie von HIV- und Hepatitisinfektionen bei Blutspendern</p>	<p>Anwendungsorientierte Forschung und Entwicklung zur Optimierung der Testung und Herstellung von Blutprodukten</p> <p>Ansonsten primärer Versorgungsstandort</p>	1 Hämotherapie- Sicherheit von Blutprodukten
2 Transplantations- immunologie	<p>Interaktion des KIR- und HLA-Rezeptorsystems bei Autoimmunerkrankungen und Transplantationen und Aufbau einer molekularbiologischen Untersuchungsmethode für die Bestimmung des KIR-Rezeptorsystems</p> <p>Feto-maternaler Mikrochimärismus und Regulation immunologischer Toleranz bei Autoimmunität</p> <p>Klinisch-diagnostische Bedeutung von Zelllinien-spezifischem Chimärismus für den Verlauf nach Blutstammzelltransplantation</p> <p>Bedeutung von retroviralen Insertionen im Bereich des HLA-Systems für die Autoimmunität</p>		<p>Bedeutung von HLA-Alleldifferenzen für die allogene Blutstammzelltransplantation</p>		2 Transplantations- immunologie
3 Immunhämatologie		<p>TANGO-Studie zur vollautomatischen Blutgruppenbestimmung</p> <p>Mikrotiterplatten-Agglutinations-Methode zur Bestimmung der irregulären Antikörper (Antikörpersuchtest)</p> <p>AB0-Genotypisierung kritischer Blutproben in der Transfusionsmedizin</p>	<p>Aufklärung des Allel-Polymorphismus im Rhesus-Blutgruppensystem</p> <p>Charakterisierung des RH-Genorts auf dem menschlichen Chromosom</p> <p>Nationale Qualitätssicherung der derzeit empfohlenen Rhesus-Typisierungsstrategie</p> <p>Molekulare Basis von Blutgruppensystemen</p> <p>Entwicklung praxisingerechter Verfahren zur Genotypisierung von Blutgruppen</p> <p>Durchflusszytometrie zur Beschreibung des Erythrozytenphänotyps</p>		3 Immunhämatologie
4 Stammzelltransplantation und experimentelle Zelltherapie	<p>Grundlagen des Organ-Homings transplantierte Blutstammzellen</p> <p>Interaktion des hämostatischen Systems mit Blutvorläuferzellen</p> <p>Aktivierung der Migration von Stamm- und Vorläuferzellen für mesenchymale Gewebe und Endothel</p> <p>Adoptive Immuntherapie maligner Erkrankungen</p> <p>Adoptive Immuntherapie bei Mammakarzinom: Retargeting von NK-Zellen</p>	<p>Gewinnung und Prozessierung von Blutstammzellen aus Nabelschnurblut</p> <p>Vergleich der Kriterien zur Qualitätskontrolle von Stammzellpräparation aus Nabelschnurblut</p> <p>Optimierung der Zellausbeute in getauten Stammzellpräparationen durch Einsatz von rekombinanter humaner DNase</p> <p>Aufreinigungsverfahren zur Anreicherung von CD34⁺-Zellen aus Plazentarestblut-Transplantaten</p> <p>Dendritische Zellen (DC) aus CD34⁺- und CD14⁺-Zellen zur Immunvaksinierung</p>	<p>Adoptive Immuntherapie mit NK-Zellen nach haploidenter Blutstammzelltransplantation</p> <p>Immuntherapie mit RemovalTM: Untersuchung der antitumoralen Wirkung eines bispezifischen trifunktionalen Antikörperkomplexes im Chorioallantois-Modell</p> <p>Charakterisierung von immunogenen leukämieassoziierten Antigenen zur Entwicklung einer Vakzine</p> <p>Autologe dendritische Zellen zur Behandlung therapierefraktärer akuter myeloischer Leukämie</p> <p>Transdifferenzierung genetisch markierter adulter humaner Stammzellen zu Kardiomyozyten</p>		4 Stammzelltransplantation und experimentelle Zelltherapie
5 Gentherapie angeborener Erkrankungen des Blutes	<p>Entwicklung eines gentherapeutischen Behandlungsansatzes zur Behandlung der Hämophilie A</p> <p>Untersuchung des Sekretionsweges von rekombinantem FVIII-Protein</p>		<p>Analyse molekularbiologischer Ursachen angeborener Immundefekte</p> <p>Etablierung von Modellsystemen zur Genkorrektur</p> <p>Genkorrektorexperimente am EGFP-Locus</p> <p>Zell-Mikroarray-Technologie zum Hochdurchsatz-Screening von Transfektanten</p>		5 Gentherapie angeborener Erkrankungen des Blutes
6 Hämostasologie	<p>Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Hämophilie A</p> <p>Immungenetik der Hemmkörper-Hämophilie A</p> <p>Molekulare Grundlagen hoher Faktor-VIII-Spiegel bei venöser Thrombembolie</p> <p>Molekulare Diagnostik von erblich bedingten hämorrhagischen und thrombembolischen Krankheitsbildern der Blutgerinnung</p> <p>Polymorphismuskarte von Genen der Blutgerinnung</p> <p>Identifizierung eines neuen Proteins aus dem Vitamin-K-Zyklus</p> <p>Klonierung und Expression von Proteinen der Blutgerinnung als Modell für die Entwicklung eines Mikrowaagen-Array / Massenspektrometrie (MAMS) für die funktionelle Proteomanalyse</p> <p>Genotyp-Phänotyp-Korrelation beim Hereditären Angioödem</p>	<p>Molekulare Immungenetik von Thrombozyten</p> <p>Sequenzpolymorphismen in P-Selektin und PSGL-1</p> <p>Gentranskripte und aktive Proteinbiosynthese in Thrombozyten</p> <p>Einfluss von Thrombozyten und thrombozytären Wachstumsfaktoren auf Wundheilung und Geweberegeneration</p> <p>Thrombozytendiagnostik bei neonataler Immunthrombozytopenie</p>			6 Hämostasologie

Forschungsstruktur und wissenschaftliche Leistungen des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen

Der DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen bearbeitet wissenschaftliche Projekte an den vier Standorten Baden-Baden, Frankfurt, Mannheim und Ulm. Die Institute in Frankfurt, Mannheim und Ulm haben, da sie gleichzeitig universitäre Einrichtungen darstellen, einen direkten Forschungsauftrag, während das Institut in Baden-Baden in erster Linie einen Versorgungsauftrag hat. Dies gilt auch für das Institut in Kassel, an dem derzeit keine Forschungsprojekte durchgeführt werden. Entsprechend dieser Struktur sind an den universitären Instituten zahlreiche Projekte aus der Grundlagenforschung vertreten, während in Baden-Baden vor allem anwendungsorientierte Forschung betrieben wird.

Der DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen vertritt mit über 60 Forschungsprojekten aus den sechs Themenbereichen Hämotherapie – Sicherheit von Blutprodukten, Transplantationsimmunologie, Immunhämatologie, Stammzelltransplantation und experimentelle Zelltherapie, Gentherapie von Erkrankungen des Blutes und Hämostaseologie das gesamte Spektrum der modernen und zukunftsorientierten Transfusionsmedizin.

Finanzierung der Forschung

Die Finanzierung der Forschung wird von eingeworbenen Drittmitteln, den Universitäten und Eigenmitteln des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen getragen. Insgesamt wurden in den Jahren 2001 und 2002 mit Forschungsmitteln jährlich etwa 40 Arbeitsplätze für Wissenschaftler/innen und Technische Assistenten/-innen (TAn) geschaffen. Für die Durchführung der über 60 Forschungsprojekte standen im genannten Zeitraum ca. 3.000.000 Euro an Sachmitteln zur Verfügung. Der größte Teil der Personal- und Sachmittel (ca. 55%) wurde von BMBF, DFG, EU, Stiftungen oder ähnlichen Institutionen sowie der Industrie eingeworben. Etwa 45 % der Mittel kamen zu ungefähr gleichen Teilen von den Universitäten und aus Eigenmitteln des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen.

Hinsichtlich der Unterstützung durch die Universitäten gab es regionale Unterschiede. Während bei den baden-württembergischen Instituten in Ulm und Mannheim die Universitäten etwa ein Drittel der Forschungsmittel beitrugen, spielte diese Förderung beim hessischen Institut in Frankfurt keine Rolle. Hier wurden über 80 % der Forschungsmittel von den Arbeitsgruppen als Drittmittel eingeworben.

Forschungsleistung

Die Forschungsaktivitäten an den Instituten des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen haben zu zahlreichen Publikationen in international renommierten wissenschaftlichen Fachzeitschriften und zu mehreren Patenten geführt.

Ein allgemein angewendetes, wenn auch nicht ganz unumstrittenes Maß für die Bedeutung wissenschaftlicher Publikationen sind die Impact-Faktoren (im Deutschen Einflussfaktoren), welche sich auf die Zitierhäufigkeit von Publikationen beziehen und als Indikator für die Beachtung oder Reputation der Zeitschrift und damit auch für die darin veröffentlichten Arbeiten gelten. Da Impact-Faktoren häufig in Forschungsberichten und -evaluationen herangezogen werden, wurden die wissenschaftlichen Arbeiten ebenfalls danach ausgewertet.

Impact-Faktoren sind nur ein sehr bedingtes Maß, welches die Einschätzung des Stellenwerts einer Publikation erleichtern kann. Sie sind nicht geeignet, den zum Teil erheblichen Aufwand für die Etablierung von neuen Forschungsrichtungen darzustellen, welche die Arbeitsgruppe oftmals erst nach Jahren in die Lage versetzt, kompetitive Publikationen und damit Impact-Faktoren zu generieren, d.h., dass insbesondere junge und im Aufbau befindliche Arbeitsgruppen durch Impact-Faktor basierende Auswertungen benachteiligt sind. Während in den Instituten in Frankfurt und Ulm seit vielen Jahren international etablierte wissenschaftliche Arbeitsgruppen tätig sind, wird am Institut in Mannheim nach der neuen Besetzung des Lehrstuhls derzeit eine neue Forschungsstruktur aufgebaut. Im Berichtszeitraum 2001 und 2002 wurden von den bereits genannten Instituten des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg–Hessen insgesamt

106 wissenschaftliche Arbeiten veröffentlicht, die zusammen eine Impact-Faktoren-Summe von 370.7 erreichten (Einzelheiten s. Tabelle 1).

Tab. 1: Übersicht zu der Zahl der Publikationen und den damit erreichten Impact-Faktoren

Institut	Publikationen 2001	IF 2001	Publikationen 2002	IF 2002	Publikationen 2001/2002	IF Gesamt	IF pro Arbeit
Baden-Baden	1	0.3	3	4.6	4*	4.9	1.2**
Frankfurt	25	91.2	22	82.6	47*	173.8	3.8**
Mannheim	14	20.7	10	24.7	24*	45.4	2.1**
Ulm	18	63.7	13	82.9	31*	146.6	5.9**
Summe	58	175.9	48	194.8	106*	370.7	3.9**

* davon Publikationen mit gelistetem Impact-Faktor (IF): Baden-Baden 4, Frankfurt 45, Mannheim 21, Ulm 25
 ** nur Publikationen mit gelistetem IF

Die Publikationstätigkeit erstreckte sich weitgehend gleichmäßig über den ganzen Berichtszeitraum. Etwa 60 % der Impact-Faktoren wurden durch Publikationen erzielt, bei denen Arbeitsgruppen des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen die Federführung hatten. Bei etwa 40 % der Impact-Faktoren handelt es sich um Publikationen mit Co-Autorenschaften. Die durchschnittliche Impact-Faktorenzahl pro Publikation betrug 3.9, was angesichts der Tatsache, dass die besten Zeitschriften des Faches Transfusionsmedizin einen Impact-Faktor zwischen 2 und 4.5 aufweisen, ein ganz ausgezeichnetes Ergebnis ist. Hierdurch wird die wissenschaftliche Kompetenz der Institute des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen belegt.

Schlussbemerkung

Der Anteil des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen an der Finanzierung der Forschung des Unternehmens betrug in den Jahren 2001 und 2002 etwa 20-25 % der insgesamt für die Forschung aufgewendeten Mittel. Hiermit werden an den Instituten in erster Linie Infrastrukturen geschaffen und Arbeitsgruppen unterstützt, die dann in der Lage sind, den größten Teil der Forschungsmittel für die Durchführung der Projekte selbst einzuwerben. Dies ist ein außerordentlich effizienter Einsatz der wirtschaftlichen Ressourcen des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen.

Die Forschung ist eine wichtige Säule des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen geworden. Sie leistet einen großen Beitrag zu der stetigen Weiterentwicklung und Verbesserung der bestehenden Produkte des Unternehmens und ist damit ein Garant für eine gleichbleibend hohe Produkt- und Therapiequalität. Weiterhin werden gegenwärtig neue, zum Teil hochspezialisierte Therapieformen mit Blutbestandteilen entwickelt. Die aktive Forschung ermöglicht es dem DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen, diese neuen Entwicklungen mit zu gestalten und die erforderliche Kompetenz für die therapeutische Anwendung dieser Präparate in der Zukunft zu erwerben.

Grundlage für die Impact-Faktoren bildet der Science Citation Index (SCI), in dem derzeit etwa 3.500 wissenschaftliche Zeitschriften registriert und ausgewertet werden. Als ein wichtiges Nebenprodukt des Science Citation Index erscheinen seit 1976 die Journal Citation Reports (JCR). Sie bilden die wissenschaftlichen Zeitschriften in einer Rangfolge ab, die sich auf die Häufigkeit der Zitierungen von in dieser Zeitschrift erschienenen Publikationen bezieht und als Impact-Faktor dieser Zeitschrift ausgedrückt wird. Ins Deutsche lässt sich der Begriff mit Einflussfaktor oder Zeitschriften-Reichweite übersetzen und gilt als Indikator für die Beachtung oder Reputation der Zeitschrift. Grundlagenorientierte wissenschaftliche Disziplinen können in der Regel in Zeitschriften mit höheren Impact-Faktoren publizieren als mehr klinisch orientierte Disziplinen. Die Spanne der Impact-Faktoren für Zeitschriften reicht von < 0.5 bis über 30, wobei weniger als 20% der Zeitschriften Impact-Faktoren > 2 aufweisen. In der Transfusionsmedizin erreichen die besten Zeitschriften einen Impact-Faktor von 2 bis 4.5 (z. B. Transfusion Medicine oder Vox Sanguinis), was einem eher klinisch orientierten Fach, wie es die Transfusionsmedizin darstellt, entspricht.

„Die Fortschritte auf dem Gebiet der Virussicherheit der Blutprodukte in den letzten beiden Jahrzehnten sind eindrucksvoll. Das Restrisiko einer Virusübertragung ist äußerst gering geworden, vor allem wenn man den Vergleich zu Risiken in anderen Lebensbereichen zieht. Diese durchaus erfreuliche Bilanz sollte allerdings keinesfalls zum Anlass genommen werden, die Anstrengungen zu reduzieren. Es sei hier nur darauf hingewiesen, dass kontinuierlich neue Erkenntnisse über neuartige Erreger oder ein geändertes Verhalten bekannter Erreger gewonnen werden. Bei biologischen Arzneimitteln wie den Blutprodukten wird Wachsamkeit auch in Zukunft erforderlich sein.“

Professor Dr. med. Rainer Seitz,
Leiter der Abteilung Hämatologie und Transfusionsmedizin,
Paul-Ehrlich-Institut, Langen
Fachtagung zum Weltgesundheitstag 2000

Hämotherapie – Sicherheit von Blutprodukten

In Deutschland werden jährlich etwa 4,2 Millionen Blutspenden zu über 6 Millionen Blutprodukten verarbeitet. Da es sich bei den aus Blut gewonnenen Produkten um biologische Produkte handelt, ist mit deren therapeutischer Nutzung zwangsläufig immer ein natürliches Restrisiko etwa hinsichtlich allergischer Reaktionen oder hinsichtlich der Übertragung von (bisher unbekannt) Erkrankungen verbunden. Eine der wesentlichen Aufgaben der hämatologischen Forschung besteht folglich darin, die verschiedenen Risiken zu erfassen und zu charakterisieren, um durch die Entwicklung von Präventionsstrategien die Sicherheit dieser Produkte für die Empfänger zu gewährleisten. Durch die Entwicklung neuer Verfahrenstechniken zur Aufarbeitung von Blutspenden, die Weiterentwicklung der immunhämatologischen Diagnostik sowie durch die Einführung molekularbiologischer Testverfahren konnten auf diesem Gebiet in den vergangenen Jahren beachtliche Erfolge erzielt werden.

Im Bereich der Infektionssicherheit hat hier vor allem die Einführung der PCR-gestützten Nukleinsäure-Testung (NAT: Nucleic Acid Testing) zur signifikanten Verringerung des Infektionsrisikos mit bekannten viralen und bakteriellen Pathogenen geführt. So konnte in einer multizentrischen prospektiven Studie der DRK-Blutspendedienste gezeigt werden, dass sich das Restrisiko einer Infektion mit dem Hepatitis-B-Virus durch Einführung der NAT von ca. 1:20.000-50.000 auf 1:500.000 senken lies. Für HCV ließ sich eine Absenkung des Restrisikos von ca. 1:50.000 auf < 1:20 Millionen und für HIV von 1:300.000 auf 1:18 Millionen erreichen. Die Testung der Blutspenden auf HBV, HCV und HIV wird daher in allen DRK-Blutspendediensten durchgeführt. Neben der Hepatitis-B- und -C- und HIV-Testung wird in einigen Blutspende-

diensten darüber hinaus auch auf Parvoviren sowie Hepatitis A getestet.

Neben viralen spielen aber auch bakterielle Pathogene für die Übertragung von Erkrankungen durch Blutprodukte eine Rolle. Insbesondere bei der Verwendung von Thrombozytenkonzentraten stellt dies ein gewisses Risiko dar, da diese Proben bei 22°C gelagert werden müssen und somit keinen bakteriostatischen Lagerungsbedingungen unterliegen. In Deutschland werden jährlich etwa 350.000 Einheiten Thrombozytenkonzentrate von etwa 1 Million Spendern gewonnen. Therapeutisch werden sie bei Blutungskomplikationen und in der Therapie onkologischer Patienten eingesetzt. Nach statistischen Annäherungen muss davon ausgegangen werden, dass etwa 0,4 % dieser Thrombozyten-Präparate bakteriell kontaminiert sind. Bei einer von 500.000 Transfusionen kann diese Kontamination zu schwerwiegenden Nebenwirkungen führen.

Zusätzlich zu den bekannten viralen und bakteriellen Erregern stellt auch die wirksame Reduktion bisher unbekannter und damit nicht identifizierbarer Pathogene ein wichtiges Problem dar. In jüngster Zeit wurde an der Entwicklung von Verfahren gearbeitet, mit denen potentielle Pathogene durch photochemisch induzierte Quervernetzung von DNA und RNA inaktiviert werden können. Die bisher zur Verfügung stehenden Agenzien waren jedoch nicht reaktiv genug für eine Routineanwendung oder zeigen unerwünschte Nebeneffekte. Eines dieser neuen Verfahren verwendet photoreaktives Psolare. Bereits durch sehr schwache UV-Bestrahlung erlaubt dieses Verfahren, potentielle virale, bakterielle und parasitäre Pathogene effizient zu inaktivieren. Die physiologische Funktion der Thrombozyten und anderer Blutbestandteile, die keine Nukleinsäuren enthalten, bleibt davon unberührt. Der

klinische Einsatz dieser photochemisch behandelten Produkte wird derzeit in einer Studie am Universitätsklinikum Mannheim untersucht.

Prinzipiell macht die große Zahl der anfallenden Proben rationalisierte Nukleinsäureisolierungs- und -testverfahren z. B. auf automatisierten Plattformen notwendig. Die Entwicklung und Erprobung solcher Verfahren bildet daher einen Schwerpunkt der Forschungsarbeit des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen. Die Ergebnisse dieser Arbeiten haben die Sicherheit und Kosteneffizienz der Nukleinsäuretestung in Deutschland wesentlich mit beeinflusst und zur Implementierung eines Verfahrens geführt, mit dem heute etwa die Hälfte aller Blutspenden in Deutschland untersucht wird.

Die Verfügbarkeit einer großen Zahl von Blutproben unterschiedlicher Spender eröffnet aber auch Perspektiven für die epidemiologische Forschung. So können Daten über Häufigkeit und Verteilung der verschiedenen Infektionsmarker in der Bevölkerung gesammelt werden. Von besonderem Interesse ist die Untersuchung asymptomatischer Hepatitis-Infektionen. Ein geringer Prozentsatz der Bevölkerung ist Träger von Hepatitis-B (HBV) oder Hepatitis-C-Viren (HCV), ohne dass sich zunächst eine Symptomatik ausbildet. In einigen Fällen kommt es erst Jahre nach der primären Infektion zur Ausprägung des klinischen Bildes der Hepatitis mit entsprechenden Veränderungen der Leberzellmorphologie. Die Auswertung der gewonnenen Daten erlaubt epi-

demologische Aussagen zur Häufigkeit asymptomatischer Hepatitis-Infektionen und ermöglicht es, diese Infektionen früh zu identifizieren und Erkenntnisse zu dem optimalen Einsatz der Therapien und den davon abhängigen Prognosen zum Krankheitsverlauf zu erlangen.

Im Bereich der Prävention immunhämatologischer Transfusionsreaktionen bei der Übertragung zellulärer Blutprodukte hat die in 2001 erfolgte Einführung der Leukozytendepletion inzwischen zum Rückgang der Transfusionszwischenfälle um etwa 50 % geführt und so wesentlich zur Erhöhung der Transfusionsicherheit beigetragen. Daneben wird von dieser Methode auch erwartet, dass sie das potentielle Risiko der Übertragung der neuen Variante der Creutzfeld-Jacob-Erkrankung (vCJK) mindert, auch wenn hierfür der endgültige wissenschaftliche Nachweis noch aussteht.

Neben der Entwicklung und Anwendung wissenschaftlich-technischer Verfahren stellt natürlich die strenge Spenderauswahl eine wichtige Säule zur Gewährleistung der Sicherheit von Blutprodukten dar. So werden Personen bestimmter Risikogruppen grundsätzlich oder zeitweise von der Blutspende ausgeschlossen. Dazu gehören nicht nur potentielle Spender, die akut an einer Erkrankung leiden, sondern beispielsweise auch Personen, die aus Staaten eingereist sind, in denen sich Infektionskrankheiten stark ausgebreitet haben.

Sicherheit von Blutprodukten/Virale Pathogenese



Projektleitung:
Prof. Dr. med.
Willi Kurt Roth

Standort: Frankfurt

Projektleitung: Prof. Dr. med. Willi Kurt Roth

Studium

1978 – 1984 Studium der Humanmedizin in München	seit 1996 Laborleiter des DRK-Blutspendedienstes Hessen, Arbeiten auf den Gebiet PCR Screening von Blutprodukten
1984 Staatsexamen	
1984 Dissertation	1997 Etablierung der NAT für Blutprodukte als Freigabekriterium
1992 Habilitation	seit 1998 Apl. Professur für Medizin

Berufliche Tätigkeit

1984 – 1991 Post-doc und Forschungsleiter MPI	seit 2002 Stellvertretender Institutsleiter Frankfurt
1991 – 1996 Leiter einer Forschungsgruppe über HCV, Chemotherapeutisches Forschungsinstitut Frankfurt	seit 2003 Bereichsleiter „Blutspender-Screening“ des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen
1994 wissenschaftlicher Berater im HIV-Untersuchungsausschuss des Deutschen Bundestages	Sonstiges 1995 Facharzt für Labormedizin
1994 – 1996 Stellvertretender Direktor des Chemotherapeutischen Forschungsinstituts Frankfurt	

Die Arbeitsgruppe - Sicherheit von Blutprodukten - um Prof. Seifried, geleitet von Prof. Roth, und die Arbeitsgruppe - Virale Pathogenese - (Prof. Roth) arbeitet seit Jahren an der Verbesserung der Sicherheit von Blutprodukten durch die Einführung und Entwicklung neuer nukleinsäurebasierter Testverfahren für die Blutspenderdiagnostik. Mit dem auf der PCR-Technologie beruhenden, von der Arbeitsgruppe entwickelten Pool-Testverfahren werden mittlerweile 2,4 Millionen Blutspenden jährlich getestet. Sie war maßgeblich an der Einführung dieser Methodik in Deutschland beteiligt, die zu einer 10-fachen Erhöhung der Sicherheit von Blutprodukten bezüglich einer Übertragung transfusionsassoziiertes Hepatitis- und Aids-Viren geführt hat. Konsequenterweise wird versucht, die Technologie weiter auszubauen und auf andere transfusionsrelevante Krankheitserreger, insbesondere Bakterien, zu übertragen. Darüber hinaus werden große Anstrengungen unternommen, die Prozesse des Spenderscreenings mit der Nukleinsäuretechnik zu automatisieren, so dass potentielle Fehler durch manuelle Bearbeitung künftig ausgeschlossen werden. Bezüglich der viralen Pathogenese stehen die Hepatitis-C- und -B-Viren im Vordergrund, wobei sowohl die akuten Folgen einer Infektion als auch die chronischen Auswirkungen (Leberzellkarzinom) im Mittelpunkt des Interesses stehen.

Working Group: Safety of Blood Products/Viral Pathogenesis Prof. Dr. Willi-Kurt Roth, Group Leader

The study group - Safety of Blood Products/Viral Pathogenesis - has been working for years on the improvement of the safety of blood products through the introduction and development of current nucleic acid-based testing methods in blood diagnostics. The PCR-technology-based pooling method developed by the study group has become the most widely used blood donor screening method in Germany. Meanwhile 2,4 million blood donations are tested each year using this method. The advent of this testing method in Germany has led to a 10-fold increase in the safety of blood products. Efforts are being consistently made to improve this technology in order to implement it for other transfusion relevant infectious agents especially bacteria. Moreover, endeavors are being continuously undertaken to increase automation of the donor screening processes using nucleic acid technology so that potential errors due to manual handling methods can be ruled out in the future. With regard to viral pathogenesis, the Hepatitis C and B viruses are of central interest, whereby the major focus is on the issues of both acute and chronic pathogenesis (liver cell cancer).

Molekulare Virusdiagnostik

Standort: Ulm

Projektleitung: Dr. rer. nat. Klaus Koerner

Stv. Leitung: Dr. hum. biol. Uschi Mayr-Wohlfart

Studium

1967 - 1972 Studium der Biologie in Hohenheim	seit 1983 Leiter der Abteilung Infektionsserologie des Instituts Ulm
1972 Diplomexamen	seit 1998 Leiter des Bereichs Qualitätssicherung des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg
1975 Dissertation	seit 2002 Kontroll-Leiter nach § 14 AMG, Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immunogenetik Ulm

Berufliche Tätigkeit

1975 - 1977 Wissenschaftlicher Mitarbeiter des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg, Institut Ulm	Sonstiges Mitglied der Deutschen Gesellschaft für Bluttransfusion und Immunhämatologie
seit 1978 Kontroll-Leiter nach § 14 AMG im Institut Ulm	



Projektleitung:
Dr. rer. nat.
Klaus Koerner

Die Arbeitsgruppe - Molekulare Virusdiagnostik -, Ulm, besteht aus dem Leiter der Abteilung Infektionsserologie Dipl.-Biologe Dr. rer. nat. Klaus Koerner sowie der Dipl.-Biologin Dr. hum. biol. Uschi Mayr-Wohlfart und sechs MTAs.

Neben der Routine-Diagnostik bei fast 500.000 Blutspenden pro Jahr auf die Viren HBV, HCV, HIV, Parvovirus B 19 und HAV ist es Zielsetzung der Arbeitsgruppe, die Sensitivität und Spezifität der zurzeit verwendeten Tests zu erhöhen und neue Methoden zur Nukleinsäuretestung bei Blutspendern zu evaluieren.

Working Group: Molecular Virus Diagnostics Dr. rer. nat. Klaus Koerner, head

The working group - Molecular Virus Diagnostics - consists of the head of the department infection serology Dipl.-biol. Dr. rer. nat. Klaus Koerner as well as Dipl.-biol. Dr. hum. biol. Uschi Mayr-Wohlfart and 6 technical assistants.

Besides the routine-testing of the virus genom of HBV, HCV, HIV, Parvovirus B19 and HAV of nearly 500.000 blood donations per year the aim of the working group is to increase the sensitivity and specificity of the tests currently in use and to evaluate new methods of nucleic acid testing of blood donors.

Hepatitis-C-Virus: Einfluss von Core-Varianten bei der Entstehung von Hepatitis-C-Virus-assoziierten hepatozellulären Karzinomen

Ziel des Projektes:

Durch die Expression des HCV-Core-Proteins in verschiedenen Zellsystemen soll dessen Einfluss auf die Pathogenese der Virusinfektion näher aufgeklärt werden.

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC) ist einer der weltweit häufigsten Tumoren mit infauster Prognose. Die Prävalenz von anti-HCV-Antikörpern bei Patienten mit HCC liegt zwischen 13 und 84 %. Über die molekularen Mechanismen der HCV-assoziierten Entstehung von hepatozellulären Karzinomen ist zur Zeit noch wenig bekannt. Einige Daten sprechen jedoch für einen Zusammenhang zwischen morphologischen Veränderungen bzw. Veränderungen in der Proliferation von Zellen und der Expression des HCV-Core-Proteins.

Effiziente Zellkultursysteme für HCV bzw. ein leicht zugängliches Tiermodell fehlen derzeit. Um den Einfluss des HCV-Core-Proteins auf die Pathogenese der Virusinfektion zu untersuchen, wurden das HCV-Core-Protein in verschiedenen Zellsystemen exprimiert und anschließend die Veränderungen der Wirtszellen untersucht. Die direkte Transfektion bzw. Transduktion primärer Hepatozyten ist sehr ineffizient. Daher wurde zusätzlich versucht, Hepatozyten aus adulten multipotenten Stammzellen zu differenzieren.

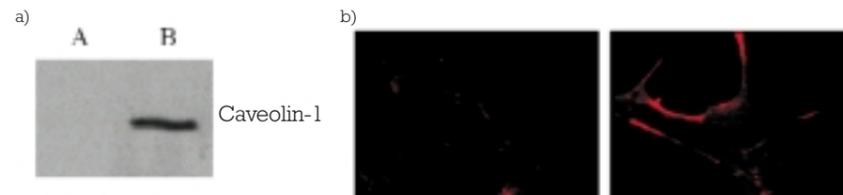


Abb. 1: Verringerte Expression von Caveolin-1 in HCV-Core exprimierenden AML-15-Zellen
(a) Westernblot-Analyse von Caveolin-1 in AML-15-Zellen, welche das HCV-Core-Protein stabil exprimieren (A) und Kontrollzellen (B) (nur mit dem Vektor transfiziert).
(b) Immunzytochemische Untersuchung von Caveolin-1 in AML-15-Zellen, welche das HCV-Core-Protein stabil exprimieren (A) und Kontrollzellen (B). Die Auswertung erfolgte mittels konofaler Laserscan-Mikroskopie.

Die wichtigsten Ergebnisse

In Verbindung mit der Expression des HCV-Core-Proteins in immortalisierten murinen Hepatozyten konnten Veränderungen in der Morphologie und der fokalen Adhäsion der Zellen ebenso wie Veränderungen in der Transkription und Expression zellulärer Proteine, darunter Caveolin-1, aufgezeigt werden (Abb. 1). Band-Shift-Assays zeigten eine direkte Bindung des HCV-Core-Proteins an einen Bereich der Caveolin-1-Promotorregion (Abb.2).

Untersuchungen ergaben, dass zu den Proteinen, die in den Hepatozyten herunterreguliert werden, der Transkriptionsfaktor ATF6 zählt, der auch in Leberbiopsien HCV-infizierter Patienten eine HCV-Subtypen abhängige veränderte Expression zeigt.

Die Auswertung der Expression verschiedener Epithel- bzw. Hepatozyten-spezifischer Proteine nach Behandlung von humanen Stammzellen aus dem Knochenmark zeigte erste Erfolge in der Differenzierung dieser Zellen (Abb. 3).

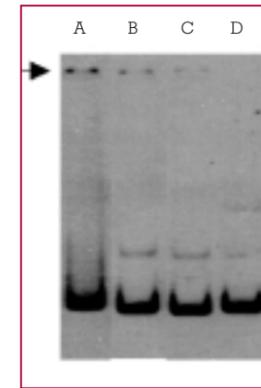


Abb. 2: Konkurrenz des Caveolin-1-Promotor-Shifts durch Zugabe von unmarkierter Caveolin-1-Promotor-DNA. Die mit Biotin markierte Promotorsequenz von Caveolin-1 wurde ohne (A), mit der gleichen (B) und mit der doppelten Menge (C) unmarkierter Promotorsequenz gemischt und mit dem in vitro transkribierten und translatierten HCV-Core-Protein inkubiert. Als Negativkontrolle wurde die Caveolin-1-Promotorsequenz mit dem Translationsprodukt des leeren Vektors inkubiert (D). Der Pfeil markiert das Band-Shift-Produkt der Caveolin-1-Promotorsequenz.

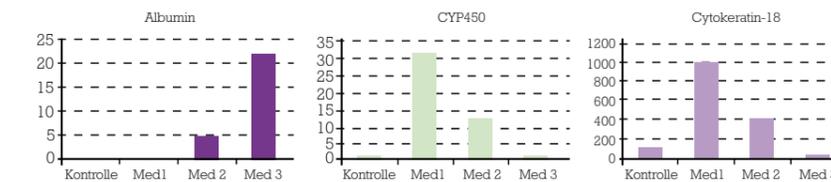


Abb. 3: Expression von Albumin, Cytochrom P450 und Cytokeratin-18 in humanen Stammzellen aus dem Knochenmark nach 10 Tagen Behandlung mit drei verschiedenen Medien. Als Kontrolle dienten Zellen, die die gleiche Zeit in Expansionsmedium ohne spezielle Wachstumsfaktoren (jedoch mit PDGF und EGF) kultiviert wurden. Die Expression der verschiedenen Proteine wurde durch relative Quantifizierung mittels Real-Time-PCR ermittelt.

Allgemeinverständlicher Überblick

Zu den häufigsten Tumoren mit schlechter Prognose zählt weltweit das hepatozelluläre Karzinom (HCC), der Leberzellkrebs. Bei der Entstehung dieser Krebsart scheint das Vorhandensein von Hepatitis-Viren eine entscheidende Rolle zu spielen. Bei 13 – 84% der Patienten mit Leberkrebs liegen Antikörper gegen das Hepatitis-C-Virus vor.

Um die zu Grunde liegenden Mechanismen aufzudecken und einordnen zu können, stehen die Untersuchungen von spezifischen Veränderungen innerhalb des Lebergewebes bei einer Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus im Mittelpunkt des Interesses.

Summary:

Hepatitis C virus: Influence of core variants for the development of hepatitis C associated hepatocellular carcinoma

Although it is assumed that hepatitis C virus (HCV) core protein is involved in the development of hepatocellular carcinoma, little is known about the possible molecular mechanisms of HCV-associated hepatocarcinogenesis. In this project we specifically investigated the role of the HCV core protein in pathogenesis of viral infection. Therefore different cell lines were transfected with HCV core protein and alterations in host cells due to HCV core expression were analysed. Furthermore, we start to differentiate human stem cells into hepatocytes, because it is not possible to transduce or transfect primary hepatocytes with an adequate efficiency. Using differentiated stem cells we are able to investigate the effects of the hepatitis C core protein in primary cells.

Projektkennzahlen

Förderung:	Dr. Mildred Scheel Stiftung
Laufzeit:	2 Jahre
Projektleitung:	Prof. Dr. W. K. Roth Prof. Dr. S. Zeuzem
Mitarbeiter:	Dr. Brigitte Rüster

Kontakt:

Dr. phil. nat. Brigitte Rüster

Institut für
Transfusionsmedizin und
Immunhämatologie
Frankfurt

DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH
Sandhofstraße 1
60528 Frankfurt am Main

Telefon
069 – 6782 - 4917

Fax
069 – 6782 - 289

E-Mail
bruester@bsdhessen.de

Kompetenznetz Hepatitis: Hepatitis C bei Blutspendern: Epidemiologie, Eigenschaften und Prognosen

Ziel des Projektes:

In diesem Kompetenznetz sollen die Daten über den natürlichen Verlauf einer Hepatitis B und C von primär anscheinend gesunden Blutspendern zusammengetragen und ausgewertet werden.

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Bei einem Kollektiv von primär anscheinend gesunden Blutspendern wird der natürliche Verlauf einer Hepatitis-B- und -C- Infektion von Beginn der Infektion an über eine längere Zeit beobachtet. Dabei ergeben sich folgende Fragen: Wieviel Prozent der Menschen, die mit dem Hepatitis-B- oder -C- Virus infiziert sind, erkranken mit klinischen Symptomen? Wie ist der Verlauf bei primär Gesunden? Wie hoch ist die Rate der Menschen, bei denen eine Hepatitis chronisch wird? In Zusammenarbeit mit klinisch tätigen Kollegen des Hep-Net Projektes soll geklärt werden, ab welchem Zeitpunkt eine Therapie optimal sinnvoll ist: Bei Beginn der Infektion? Bei Chronifizierung? Nur bei einer bestimmten klinischen Symptomatik?

Darüber hinaus werden die Daten aller DRK-Blutspendedienste in Bezug auf isolierte NAT positive Blutspender gesammelt und bewertet.

Die wichtigsten Ergebnisse

Die in diesem Projekt erhobenen Daten helfen, Fragen zu beantworten, wie sie sich in Zusammenhang mit dem natürlichen Verlauf der Hepatitis-B- und -C-Infektion von primär gesunden Blutspendern ergeben. Die häufigste und für den Betroffenen wichtigste Frage ist dabei, wieviel Prozent derjenigen, die mit dem Hepatitis-B- oder -C-Virus infiziert sind, mit klinischen Symptomen erkranken und wann welche Therapie indiziert ist.

Allgemeinverständlicher Überblick

Die virusbedingte Leberentzündung ist eine der weltweit häufigsten Infektionskrankheiten. In Deutschland sind annähernd eine Million Menschen an einer chronischen Virushepatitis erkrankt, verursacht durch die Hepatitis-Viren B, C und D. Sie schädigen die Leber und führen zu einer schwellenden Entzündung. Das Organ baut sich zu narbigem Bindegewebe um (Leberzirrhose) und kann ohne entsprechende Behandlung schließlich versagen. Eine weitere Gefahr ist die Entstehung von Leberkrebs - das Hepatozelluläre Karzinom (HCC).

Das Kompetenznetz Hepatitis (Hep-Net) ist eines der 12 Kompetenznetze in der Medizin, die vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert werden. Hep-Net wird über fünf Jahre die bundesweite Erforschung von Leberentzündungen durch Viren unterstützen und einheitliche Diagnose- und Therapiestandards entwickeln. Auch epidemiologische Daten sollen gesammelt werden. Erstmals ist es in Deutschland gelungen, alle namhaften Experten (rund 120) auf dem Gebiet der Hepatitis zusammenzuführen. Neben den Forschern an Unikliniken werden Krankenhäuser, niedergelassene Ärzte und Patienten-Selbsthilfegruppen eingebunden.

Summary:

Competence net Hepatitis C: Hepatitis C in blood donors: Epidemiology, characteristics and prognosis

As a member of Hep-Net, a competence network for Hepatitis B and C, we developed a form for input of data from blood donors with reactive test results in blood donor screening for HBV and HCV. Using this database we plan to find patterns of results in blood donors and to correlate these patterns with clinical data and clinical outcome of blood donors infected with HCV or HBV. For blood donors who are NAT-only positive, we already collected data of all blood donor centers of the German Red Cross.

Projektkennzahlen

Förderung:	BMBF
Laufzeit:	2002-2004
Projektleitung:	Prof. Dr. E. Seifried Prof. Dr. W. K. Roth
Mitarbeiter:	Dr. Veronika Brixner Priv.-Doz. Dr. Wolfgang Weichert MuDr. Walid Sireis

Weiterführende Informationen:

www.kompetenznetz-hepatitis.de/

www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/

www.hepnet.com/

Kontakt:

Dr. med. Veronika Brixner

**Institut für
Transfusionsmedizin und
Immunhämatologie
Frankfurt**

**DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH**
Sandhofstraße 1
60528 Frankfurt am Main

Telefon
069 – 6782 - 118

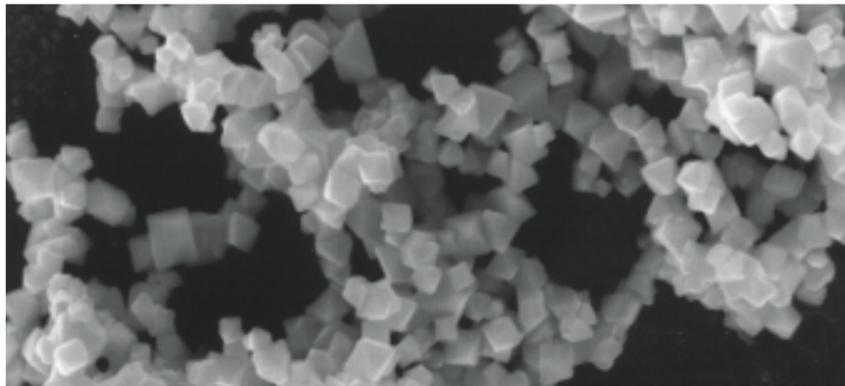
Fax
069 – 6782 - 289

E-Mail
vbrixner@bsdhessen.de

Entwicklung eines automatisierbaren, auf Magnetic-Beads basierenden Verfahrens zur Nukleinsäure-Extraktion

Ziel des Projektes:

Innerhalb dieses Projektes soll auf der Basis der Magnetic-Beads-Technologie eine vollautomatisierte Extraktionsmethode für alle transfusionsrelevanten Viren etabliert werden.

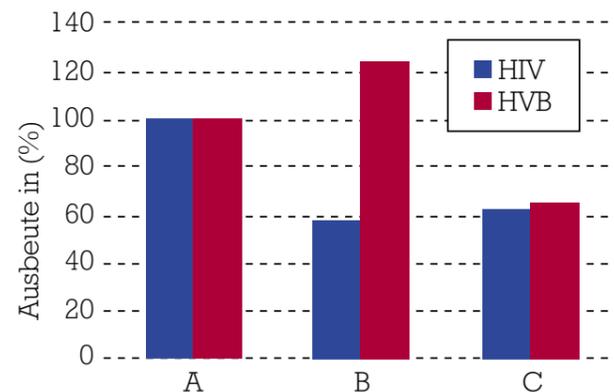


Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der verwendeten Beads bestehend aus 90 % Magnetit und 10 % Silica

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Magnetic-Beads sind magnetisierbare Partikel mit einem Durchmesser von etwa einem tausendstel Millimeter. Ihre spezielle Oberfläche kann Nukleinsäuren mit hoher Affinität binden. Durch ihre Magnetisierbarkeit kann die Extraktion mit relativ geringem technischen Aufwand automatisiert werden. Nachteile der bisherigen manuellen Extraktionsverfahren wie Verwechslungsgefahr, Zeit- und Personalintensität werden effektiv umgangen.

In der nächsten Phase sollen die bei kleinen Plasmavolumina erreichten hohen Sensitivitäten bezüglich aller transfusionsrelevanten Viren auf den großen Maßstab übertragen werden. Günstigerweise können dabei die bisher bei Pool-Extraktionen benötigten Anreicherungs-schritte umgangen werden.



Vergleich von Extraktionsmethoden

(A) Manuelle Extraktion von 100 ml Positivplasma mittels Qiagen Viral RNA Kit (Ausbeute als 100% angenommen).

(B) Direkte Beadsextraktion aus 2,4 ml Plasma, welches die gleiche Anzahl Viren enthält.

(C) Derzeit vorherrschende Methode zur Extraktion aus 9,6 ml Plasma. Vorherige Anreicherungs-schritte benötigt.

Standort: Frankfurt

Projektleitung:
Prof. Dr. med.
Willi Kurt Roth

Die wichtigsten Ergebnisse

Bislang wurde in Kooperation mit den Firmen Merck, auf deren Patent das verwendete Bindungsprinzip beruht, und Tecan eine automatisierbare Alternative zu den bisher vorherrschenden, auf Silica-Säulen basierenden Methoden entwickelt.

Aufgrund von ersten vielversprechenden Ergebnissen scheint es möglich, innerhalb eines überschaubaren Zeitraumes ein high-throughputfähiges, für große Plasmavolumina geeignetes System zu entwickeln und, ausreichende Sensitivität vorausgesetzt, in die Routine-Pool-Extraktion des Blutspendedienstes einzuführen.

Allgemeinverständlicher Überblick

Im Rahmen der molekularen Virusdiagnostik bei der Transfusion von Blut und Blutprodukten wird an der Optimierung der Herstellungsmethoden gearbeitet, um die größtmögliche Sicherheit für Empfänger und Spender zu erzielen. Dabei bieten sogenannte Magnetic-Beads (magnetisierbare Partikel) durch ihre Magnetisierbarkeit die Möglichkeit, den Arbeitsvorgang zu automatisieren. Damit lassen sich die Nachteile der bisherigen manuellen Verfahren wie Verwechslungsgefahr sowie Zeit- und Personalintensität effektiv umgehen.

Summary:

Development of an automated method using magnetic beads for nucleic acid extraction

Aim of this project is to establish a fully automated extraction-method for all transfusion-relevant viruses based on the magnetic-beads-technology.

Conventional nucleic acid preparation methods based on silica-membranes are very labor-intensive, time-consuming and susceptible to contamination. Additional automation of these techniques is often hampered by the need of centrifugation-steps to enrich the viral material or the confined capacity of the membranes.

Due to the large specific surface of the particles and their magnetic core the beads-technology permits direct isolation of nucleic acids from pooled material and simple automation with less technical effort.

Owing to first promising results it seems to be possible to introduce such a system for use in our routine molecular diagnostic laboratory within a reasonable period of time.

Projektkennzahlen

Förderung:	Industriemittel
Laufzeit:	2 Jahre
Projektleitung:	Prof. Dr. W. K. Roth
Mitarbeiter:	Kai Houfar

Kontakt:

Prof. Dr. med. Willi Kurt Roth

Institut für
Transfusionsmedizin und
Immunhämatologie
Frankfurt

DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH
Sandhofstraße 1
60528 Frankfurt am Main

Telefon
069 – 6782 – 251

Fax
069 – 6782 – 256

E-Mail
wroth@bsdhessen.de

Multizentrische Studie zur Überprüfung der Wirksamkeit von virusinaktivierten Thrombozyten-Konzentraten

Ziel des Projektes:

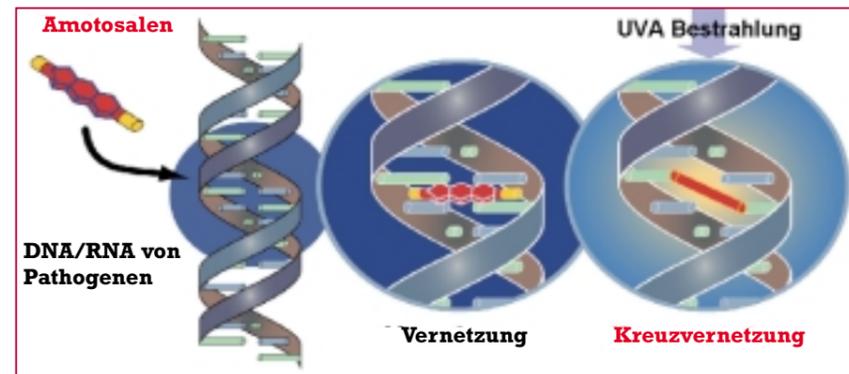
Ein neues Verfahren zur Inaktivierung von Pathogenen in Blutplasma, Thrombozyten- sowie Erythrozytenkonzentraten soll entwickelt und evaluiert werden.



Standort: Mannheim

Projektleitung:
Dr. med.
Karin Janetzko

Prinzip der photochemischen Pathogeninaktivierung unter Verwendung von Amotosalen und UVA Licht



Hintergrund und Projektbeschreibung:

Durch die Einführung von Laboruntersuchungen und strengen Spenderauswahlverfahren wurde das Risiko transfusionsassoziiertes Infektionen in den letzten Jahren deutlich reduziert. Die Entwicklung von Verfahren zur Inaktivierung von Pathogenen in Blutprodukten bietet eine zusätzliche Sicherheit für die Empfänger und kann zur weiteren Verminderung eines Infektionsrisikos beitragen. Allerdings ist insbesondere die Pathogeninaktivierung von zellhaltigen Blutprodukten schwierig, da neben der Inaktivierung eines breiten Spektrums an Erregern wie Bakterien, Viren oder Protozoen die physiologische Funktion der Blutbestandteile erhalten werden muss.

Mit einem neuen Verfahren kann unter Verwendung von Psoralen (AMOTOSALEN) in Kombination mit UVA-Licht ein breites Spektrum potentieller Erreger und Leukozyten in Blutprodukten inaktiviert werden. Das Psoralen bindet zunächst reversibel an DNA/RNA. Durch anschließende kurzzeitige Bestrahlung mit UVA-Licht entstehen irreversible Kreuzvernetzungen zwischen dem Psoralen und der Nukleinsäure, so dass eine Replikation genomhaltiger Zellen nicht mehr möglich ist.

Da diese photochemische Inaktivierung gezielt an allen nukleinsäurehaltigen Erregern ansetzt, können damit auch bislang unbekannte Viren und Bakterien im Blutpräparat eliminiert werden. Das Verfahren kann für Thrombozytenkonzentrate und Blutplasma angewandt werden und steht in modifizierter Form auch für Erythrozytenkonzentrate zur Verfügung.

Umfangreiche in-vitro Untersuchungen von Thrombozytenkonzentraten im Rahmen des Forschungsprojektes zeigten, dass durch die photochemische Behandlung die Funktionsfähigkeit und die Vitalität der Thrombozyten nicht nachhaltig beeinträchtigt werden. In Zusammenarbeit mit der Hämatologie am Universitätsklinikum Mannheim wurde nun erstmals in Deutschland in einer prospektiven multizentrischen Phase-III-Studie auch die therapeutische Wirksamkeit der behandelten Thrombozytenpräparate untersucht. Insgesamt wurden 17 Patienten randomisiert eingebunden. Die Ergebnisse belegen eine therapeutische Äquivalenz der behandelten Präparate und zeigen, dass die klinische Effizienz herkömmlicher Standard-Thrombozytenkonzentrate und photochemisch behandelte Produkte vergleichbar ist. Die arzneimittelrechtliche Zulassung dieses Blutpräparates durch den DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen wird vorbereitet. Weitere Arbeiten über Plasma und Erythrozyten-Konzentrate sind in Vorbereitung.

Die wichtigsten Ergebnisse

Mit der Anwendung eines neuen Verfahrens zur photochemischen Inaktivierung von Pathogenen kann die Sicherheit von Thrombozytenkonzentraten weiter erhöht werden. Erstmals in Deutschland konnte im Rahmen einer multizentrischen Phase-III-Studie die therapeutische Äquivalenz dieser Konzentrate im Vergleich zu Standard-Präparationen gezeigt werden.

Allgemeinverständlicher Überblick

Das Rohmaterial aller Blutprodukte, die zur Therapie von Erkrankungen eingesetzt werden, wird von Blutspendern zur Verfügung gestellt. Damit besteht das Risiko, dass mit diesen Blutprodukten auch unerkannte Infektionen vom Spender auf den Empfänger übertragen werden. Zwar haben intensive Laboruntersuchungen aller Blutspenden und eine sorgfältige Spenderauswahl dieses Risiko in den vergangenen Jahren deutlich reduzieren können, insbesondere bisher unbekannte Krankheitserreger stellen aber nach wie vor ein mögliches Risiko für die Gesundheit der Empfänger von Blutprodukten dar. Daher müssen Verfahren zur Behandlung von Blutprodukten entwickelt werden, die auch solche unbekannt Erreger inaktiveren können. Gleichzeitig muss aber gewährleistet werden, dass die therapeutische Wirksamkeit dieser Produkte erhalten bleibt. Im Rahmen dieses Forschungsprojektes wurde gezeigt, dass ein neues Verfahren zur Inaktivierung von Krankheitserregern bestimmte Blutprodukte sicherer machen kann, ohne ihre Wirksamkeit zu beeinträchtigen. Das Verfahren basiert auf der photochemischen Inaktivierung von Nukleinsäuren. Da die meisten Viren, Bakterien oder Einzeller (Protozoen) über Nukleinsäuren verfügen, können mit der Methode auch bisher unbekannt Erreger inaktiviert werden

Summary:

Multicenter study for evaluation of properties of virus-inactivated platelet concentrates

The INTERCEPT Blood System for platelets, based on Helinx technology, utilizes amotosalen-HCl (S-59) in combination with long wavelength ultraviolet (UVA)-light to inactivate a broad spectrum of viruses, bacteria, protozoa, and leukocytes that may contaminate platelet concentrates (PC). In a prospective study the therapeutic efficacy and safety of photochemical treated platelet concentrates in comparison to conventional apheresis platelets has been evaluated in thrombocytopenic patients. The study was a randomised, double-blind, controlled, intend-to-treat Phase III trial conducted at 3 centers in Europe. In total 43 patients have been randomised either in a control group where the patients received standard apheresis platelet concentrate or in the test group where the treatment was carried out using photochemical treated platelet units.

Due to our results we can conclude that photochemical treated platelet units provided platelet count increments and hemostasis comparable to untreated platelets and effectively prevented and treated bleeding in thrombocytopenic patients with the added benefit of pathogen inactivation.

Projektkennzahlen

Förderung:	Industriemittel
Laufzeit:	1 Jahr
Projektleitung:	Dr. Karin Janetzko
Mitarbeiter:	Matthias Lindner (Produktion) Kirsten Fischer (MTLA)
Kooperation:	Prof. Dr. R. Hehlmann, III. Medizinische Klinik, Universitätsklinikum Mannheim Prof. J.-P. Cazenave, ETS Strasbourg, France Prof. B. Chapuis, Hôpital Cantonal Universitaire de Genève, Suisse Baxter Deutschland GmbH Cerus Corporation

Kontakt:

Dr. med. Karin Janetzko

Institut für
Transfusionsmedizin und
Immunologie Mannheim

DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH
Friedrich-Ebert-Straße 107
68167 Mannheim

Telefon
0621 – 3706 - 8125

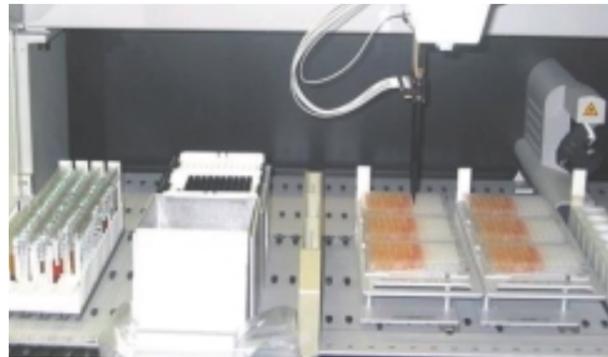
Fax
0621 – 3706 - 876

E-Mail
k.janetzko@blutspende.de

Epidemiologie von HIV- und Hepatitisinfektionen bei Blutspendern

Ziel des Projektes:

Die Projektziele sind die Risikoevaluation für Infektionen mit HBV, HCV und HIV bei Anwendung der Nukleinsäure-Pooltestung, die Erhöhung der Sensitivität und Spezifität der Testverfahren sowie die Evaluierung neuer Testmethoden.



Pooling mit dem Genesis 150 der F. Tecan

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Zur Erhöhung der Virussicherheit bei Bluttransfusionen wurde im Jahr 1997 die Pooltestung auf HCV-Virus-Genom durch Nukleinsäuretestung (Nucleic Acid Testing = NAT) eingeführt. Die Bestimmung der HBV-DNA (Hepatitis B) und der HIV-RNA (humanes Immundefizienz Virus) wurde ebenfalls seit 1997 als Kriterium für die Freigabe von Plasma zur Fraktionierung implementiert. Heute wird bei allen Blutspenden eine Pooltestung auf HCV-RNA, HBV-DNA und HIV-RNA als Freigabekriterium durchgeführt.

Zur Durchführung des routinemäßigen Blutspenderscreenings wurden verschiedene Isolierungs- und Testverfahren entwickelt, um NAT als Pooltest für den Blutspendedienst mit einem Blutspendeaufkommen von bis zu 2000 Proben pro Tag zeitnah realisieren zu können.

Dazu wurde zunächst die Stabilität der HCV-RNA bei Transport und Lagerung der Blutproben in Serum oder EDTA-Plasma bei +4°C während einer Lagerungszeit von bis zu 7 Tagen untersucht. Die Validierungsdaten zeigen, dass kein signifikanter HCV-RNA-Titerabfall während der 7 Tage nach der Blutspende bei verschiedenen Transport- und Lagerbedingungen zu beobachten war. Daher kann eine HCV-RNA-Testung nach 18 Stunden Lagerung der Blutproben oder auch nach Lagerung über das Wochenende erfolgen.

Für HIV, HBV, HCV, HAV und Parvovirus-B-19 wurden die Sensitivität und Spezifität der Minipool-Testung im Blutspenderscreening mit dem LightCycler-System als alternatives Amplifikationssystem untersucht. Das Verfahren kommt nun als Screeningtest für das Parvovirus-B-19 und HAV zur Anwendung.

Auf der Grundlage der infektionsserologischen Daten (Zeitraum 1998 – 2001 ohne Berücksichtigung von NAT-Pool-Daten) wurden die Restrisiken für den Blutspendedienst Baden-Württemberg für HBV auf 1 : 350.000 (1 : 100.000 bis 3,8 Mio.), für HCV 1 : 450.000 (1 : 125.000 bis 2,3 Mio.) und HIV 1 : 2,5 Mio. (1 : 800.000 bis 72 Mio.) geschätzt. Ein erster Fall einer HCV-NAT positiven Spende wurde nach drei Jahren HCV-NAT-Screening der Blutproben des Blutspendedienstes Baden-Württemberg isoliert. Diese HCV-RNA-positive/Anti-HCV-negative Blutspende ist auch noch nach 5 Jahren HCV-NAT-Testung in Baden-Württemberg die einzige Blutspende, die durch das HCV-NAT-Screening aufgefallen war.

Die HCV-, HBV- und HIV-NAT-Screening-Daten aus Baden-Württemberg sind in die gemeinsame Studie der DRK-Blutspendedienste eingebracht worden. Bei mehr als 10 Mio. Blutspendern in Deutschland konnten somit die Infektionsrisiken nach Einführung der NAT-Testung ermittelt werden.

Standort:Ulm
Projektleitung:
Dr. rer. nat.
Klaus Koerner
Dr. hum. biol.
Uschi Mayr-Wohlfart

Die wichtigsten Ergebnisse

Der HCV-RNA-Titer von Blutproben fällt bei einer Lagerung bei 4°C in einem Zeitraum von bis zu 7 Tagen nicht signifikant ab. Eine HCV-RNA-Testung von Blutproben kann daher in einem Zeitfenster von mehreren Tagen zuverlässig erfolgen.

Auf Grundlage der vorliegenden infektionsserologischen Daten - ohne Berücksichtigung von NAT-Pool-Daten – wurden die Restrisiken einer Infektion mit HBV, HCV und HIV kalkuliert.

Allgemeinverständlicher Überblick

Um die Sicherheit der Empfänger von Blutspenden vor Infektionen mit Hepatitis- oder HIV-Viren zu gewährleisten, müssen die Spenden sorgfältig auf diese Erreger hin untersucht werden. Entscheidend sind hierbei die Fragen, welchen Einfluss die Lagerung der Blutproben auf diese Untersuchung hat und wie sensitiv und spezifisch die Untersuchungsmethoden sind. Die Klärung und Bewertung dieser Aspekte sind Gegenstand dieses Forschungsprojektes.

Es konnte gezeigt werden, dass der zuverlässige Nachweis von Hepatitis C bei entsprechender Lagerung der Proben in einem Zeitfenster von mehreren Tagen erfolgen kann. Ferner erlauben die hohe Sensitivität und Spezifität der verwendeten Untersuchungsverfahren, das verbleibende Restrisiko einer Infektion mit Hepatitis oder HIV zu verringern.

Summary:

Epidemiology of HIV- and Hepatitis Infections of blood donors

To increase virus safety of blood transfusion the nucleic acid testing was introduced for HCV, HIV and HBV of all blood donations. There was no significant loss of HCV-RNA titer in a period up to 7 days after blood collection when blood samples were stored at 4°C. The minipool-testing of HAV and Parvovirus B19 as screening method of all blood donations was introduced using the Light-Cycler for nucleic acid amplification. On the basis of the serological virus data the residual risk of transmitting HCV, HIV and HBV was calculated (not including the NAT-data).

Projektkennzahlen

Förderung:	Eigenmittel
Laufzeit:	kontinuierlich
Projektleitung:	Dr. Klaus Koerner
Stlv. Leitung:	Dr. Uschi Mayr-Wohlfart

Weiterführende Informationen:

www.virology.net
www.cdc.gov
www.aabb.org
www.rki.de
www.pei.de
www.who.int

Kontakt:

Dr. rer. nat. Klaus Koerner

**Institut für Klinische
 Transfusionsmedizin und
 Immunogenetik Ulm gGmbH**

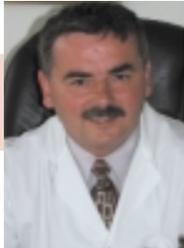
**DRK-Blutspendedienst
 Baden-Württemberg –
 Hessen gGmbH**
 Helmholtzstraße 10
 89081 Ulm

Telefon
 0731 – 150 - 590

Fax
 0731 – 150 - 500

E-Mail
k.koerner@blutspende.de

Anwendungsorientierte Forschung und Entwicklung zur Optimierung der Testung und Herstellung von Blutprodukten



Standort: Baden Baden
Projektleitung:
Dr. med.
Ekkehard Richter

Ziel der Projekte:

Das Institut Baden-Baden des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen war und ist ein Versorgungsstandort mit zentralen Aufgaben und ist daher anwendungsorientiert ausgerichtet.

Hintergrund und Projektbeschreibung:

In der Vergangenheit wurden die Plasmafraktionierung und die Virusinaktivierung von Plasma (Methylenblau-Verfahren) in Baden-Württemberg zentral im Institut Baden-Baden durchgeführt.

In der Folge wurden Projekte wie die Inline-Filtration bzw. die Umstellung der Produktion auf Compomaten in Baden-Baden vorbereitet, auf die hauseigenen Verfahren angepasst und optimiert und in den Instituten Mannheim und Ulm eingeführt. Im Rahmen der Einführung der Inline-Filtration wurde zudem ein durchflusszytometrisches Verfahren zur Bestimmung des Leukozyten-Restgehalts in gefiltertem Plasma eingearbeitet und validiert.

In den Abteilungen laufen routinebegleitende Analysen sowie Applikations-, Entwicklungs- und Industrieauftragsforschung. Die personellen und materiell-technischen Voraussetzungen sind darauf beschränkt.

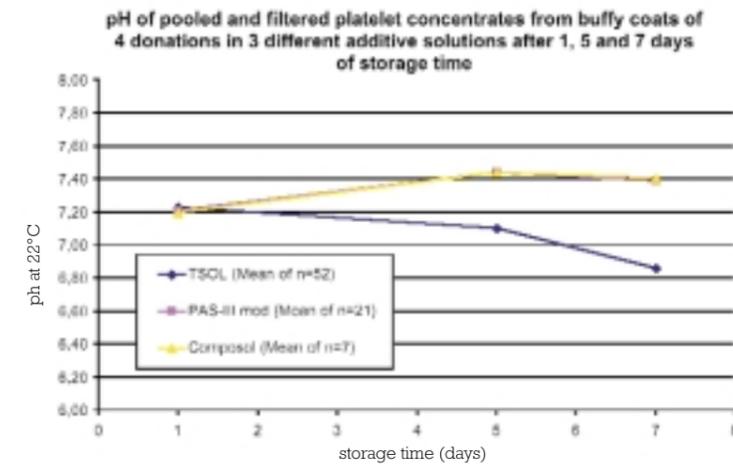
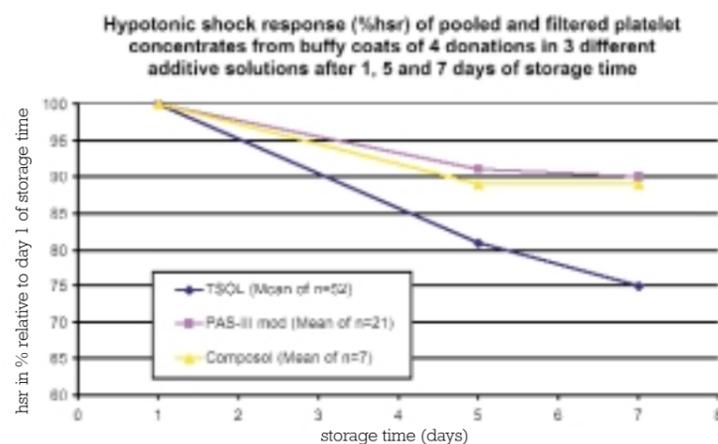
Seit zwei Jahren besteht eine Beteiligung im Rahmen der BEST-Study Group der Internationalen Gesellschaft für Bluttransfusion (ISBT) an Studien der Arbeitsgruppe - Conventional Component Team -.

Die wichtigsten Ergebnisse – Produktion

Im Rahmen der Industriekooperation zur Evaluierung neuer Produkte wie Filtersysteme und Blutbeutel wurden Leukozytendepletionsfilter für Vollblut und eine optimierte Additivlösung „PAS III m“ für Thrombozytenkonzentrate getestet. Damit erfolgte auch die Teilnahme an der multizentrischen Studie 17 der ISBT/BEST Study Group, die 2003 in Vox Sang publiziert werden soll.

Hausintern wurde die Testung als Vergleich mit dem Standardverfahren Additivlösung „T-Sol“ und einer weiteren Additivlösung „Composol“ ergänzt.

Die Ergebnisse zeigen, dass das derzeitige Standardverfahren in Baden-Württemberg durch Einsatz einer der neuen Additivlösungen optimiert werden kann.



Die wichtigsten Ergebnisse – Spendenbetreuung

Nachdem der Chargenrückruf des Hepatitis-A-Impfstoffes Vaqta erfolgt war, wurden sämtliche HAV-Antikörpertiter bei Personen kontrolliert, die zwischen 1996 und 2001 mit Vaqta gegen Hepatitis A geimpft worden sind.

In einer gemeinsamen Studie mit der Abteilung Transfusionsmedizin der Universität Erlangen wurden die Blutspender ausführlich befragt und ihr Hepatitis-B-Impfstatus kontrolliert.

Seit 1999 findet jährlich unter Wissenschaftlicher Leitung des Instituts Baden-Baden das Symposium „Baden-Badener Tag der Reisemedizin“ statt, dessen Zielgruppe die niedergelassenen Kollegen/-innen im Einzugsbereich von Baden-Baden sind.

Die wichtigsten Ergebnisse – Immunhämatologie

Um die klinische Anwendbarkeit des Type & Screen Verfahrens zu überprüfen, wurde eine Studie zur Häufigkeit von Anti-Wr(a) durchgeführt. Ergebnis war, dass Anti-Wr(a) der häufigste Antikörper und schon deshalb von klinischer Bedeutung ist, weil er mit den herkömmlichen Testpanels nicht erkannt wird. Das hat dann klinische Relevanz, wenn Type & Screen Verfahren ohne Kreuzprobe angewendet werden.

Red cell antibodies identified in 22,697 blood donors			
Anti-	Number	Rate (1 : n)	Rate (%)
Wr(a)	397	1 : 57	1.749
D	30	1 : 757	0.132
M	30	1 : 757	0.132
CD	7	1 : 3,242	0.031
E	7	1 : 3,242	0.031
c	4	1 : 5,674	0.018
K	4	1 : 5,674	0.018
Cw	2	1 : 11,349	0.009
Le(a)	2	1 : 11,349	0.009
Fy(a)	1	1 : 22,697	0.004
Fy(b)	1	1 : 22,697	0.004
e	1	1 : 22,697	0.004
Le(b)	1	1 : 22,697	0.004

Kontakt:

Dr. med. Ekkehard Richter

DRK-Blutspendedienst
 Baden-Württemberg –
 Hessen gGmbH
 Gunzenbachstraße 35
 76530 Baden-Baden

Telefon
 07221 – 214 - 300

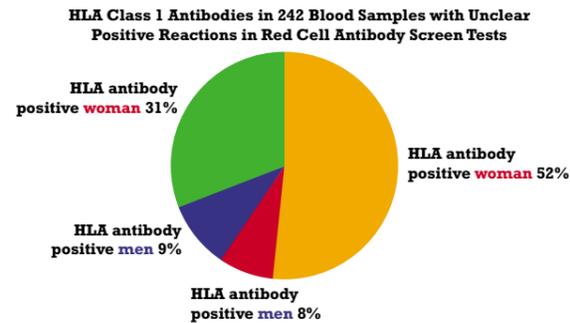
Fax
 07221 – 214 - 309

E-Mail
 e.richter@blutspende.de

Frequenz-Untersuchungen bei Low- und High-Frequency-Blutgruppen-Antigenen tragen dazu bei, den Bedarf an Blutpräparaten seltener Blutgruppen besser zu ermitteln.

Im Zusammenhang mit der Abklärung positiver Antikörper-Suchtests wurden die Häufigkeit und der Einfluss der HLA-Antikörper auf die moderne sensitive immunhämatologische Diagnostik bestimmt. HLA-Klasse I Antikörper sind die häufigste Ursache für unklare Reaktionen im indirekten Antiglobulintest mit der Gel-Technik.

Darüber hinaus bestehen enge Kooperationen mit dem German Rare Donor Program, dem SCARF-Programm (Serum, Cells and Rare Fluids), Philadelphia, USA, dem International Blood - Group Reference Laboratory, Bristol, UK, und dem New York Blood Center, USA.



Die wichtigsten Ergebnisse – Infektionsserologie

Um den Einsatz von Thrombozytenkonzentrat und Verdünnungsmedien bei Formwandel (ESC) und hypotoner Schockreaktion (HSR) besser bewerten zu können, erfolgte die Teilnahme an einer Multicenterstudie der ISBT/BEST Study Group. Thrombozyten sollten unabhängig vom Lagermedium vor der Testung mit Plasma verdünnt werden. Die Ergebnisse sollen 2003 in Vox Sang publiziert werden.

In Vitro Measurement of ESC and HSR

Storage	Diluent	ESC	ESC	HSR	HSR
		Day 1 Mean ± SE	Day 5 Mean ± SE	Day 1 Mean ± SE	Day 5 Mean ± SE
PSS	AUTO	18.3 ± 2.4	13.8 ± 2.1	62.9 ± 5.1	53.7 ± 4.6
PSS	FFP	16.1 ± 1.8	10.6 ± 1.7	51.9 ± 5.4	51.3 ± 3.7
PSS	PSS	13.2 ± 1.9	7.6 ± 1.5	47.9 ± 4.2	47.2 ± 3.2
PLASMA	AUTO	21.6 ± 1.5	17.8 ± 1.5	71.0 ± 3.6	62.7 ± 2.9
PLASMA	FFP	19.7 ± 1.7	16.0 ± 1.3	64.9 ± 3.3	61.7 ± 2.9
PLASMA	PSS	16.0 ± 1.6	14.2 ± 1.4	51.8 ± 3.6	58.5 ± 4.2

Im Industrieauftrag werden infektionsserologische Parameter getestet und bewertet. Dazu gehören die Reaktivität neuer Kits im Vergleich zum Standardverfahren, die Einarbeitung des TPHA-Screenings auf der Olympus PK 7200 und die Bewertung der Effektivität eines neu entwickelten Thrombozyten-schüttlers.

Allgemeinverständlicher Überblick

Der Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen erfüllt sehr vielfältige Aufgaben. Diese reichen von der Blutspenderrekrutierung und Spenderbetreuung über die öffentliche Versorgung mit Blut und Blutbestandteilen bis hin zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung auf dem Gebiet der Bluttransfusion und der Immunhämatologie in weltweiter Zusammenarbeit.

Das Institut Baden-Baden ist dabei eine Versorgungseinheit mit zentralen Aufgaben.

Ziel ist, den Patienten auch beim Einsatz von Blut zur Therapie die optimierten Blutbestandteile zu verabreichen. Dabei werden bei der Aufteilung der einzelnen Blutfraktionen bereits bestehende Verfahren durch den Einsatz neuer Systeme optimiert bzw. neue Verfahren etabliert. Des Weiteren werden die Blutspender auf die Wirksamkeit ihrer entsprechenden Impfungen wie beispielsweise Hepatitis A und Hepatitis B überprüft.

Um in diesem Zusammenhang die ärztlichen Kollegen auf dem neuesten Stand der Wissenschaft zu halten, findet alljährlich der „Baden-Badener Tag der Reisemedizin“ statt.

In den Abteilungen für Immunhämatologie und Infektionsserologie werden darüber hinaus Untersuchungen zu seltenen Blutgruppen bzw. Antikörpern, Zellkonzentraten und anderen Blutersatzmitteln durchgeführt. Dabei laufen im ganzen Institut die Untersuchungen in enger Abstimmung mit internationalen Arbeitsgruppen.

Summary:

Baden-Baden is a center with blood bank routine. However, the group joined the ISBT BEST Working Party as Associate Scientific Member of the Conventional Component Team. Within study 17 an optimization of platelet additive solution was proposed. The results showed a better maintenance of pH, in vitro platelet function and significantly reduce platelet activation after storage of five or seven days. Therefore platelet transfusion and the introduction of a pathogen inactivation technique will be improved. In an additional study it was demonstrated that test results of ESR and HSR are significantly affected by the diluent selected. It was found in routine antibody screening of 22,697 blood donors that anti-Wr(a) is the most common antibody. As this antibody is clinically significant, it is probably dangerous using type and screen in pretransfusion management only. Another analysis of routine data showed that HLA class I antibodies are the most common reason for unclear positive reactions in red cell antibody screen tests using the indirect antiglobulin test in the gel technique.

Projektkennzahlen

Förderung:	Industriemittel
Laufzeit:	2001 - 2003
Projektleitung:	Dr. Ekkehard Richter
Stlv. Leitung:	Dr. E.A. Scharberg
Mitarbeiter:	Dr. A. Agildere Dr. T. Dengler
Kooperationen:	BEST-Study Group SCARF Universitätsklinikum Erlangen

Weiterführende Informationen:

www.blutspende.de

Kontakt:

Dr. med. Ekkehard Richter

DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH
Gunzenbachstraße 35
76530 Baden-Baden

Telefon
07221 – 214 - 300

Fax
07221 – 214 - 309

E-Mail
e.richter@blutspende.de

„Die Transplantationsmedizin konnte in den letzten Jahren – insbesondere auch durch das Engagement Ihrer Gesellschaft – weit vorangebracht werden, in einigen Bereichen wurden standardisierte Behandlungsverfahren entwickelt, sie ist damit für viele schwer kranke Menschen lebensrettend geworden. Ihr Erfolg ist eng verbunden mit der Umsetzung neuer Forschungsergebnisse in die klinische Praxis und in die Ausbildung junger Ärztinnen und Ärzte. Dies gilt auch für die Zukunft, denn die Transplantationsmedizin hat noch nicht alle Probleme gelöst.“

Thomas Oppermann
Niedersächsischer Minister für Wissenschaft und Kultur
11. Tagung der Deutschen Transplantationsgesellschaft

Transplantationsimmunologie

Das Humane Leukozyten Antigen-System, kurz HLA-System, gehört zum Major Histocompatibility Complex und spielt eine zentrale Rolle in der Steuerung der Immunabwehr. Hierzu gehören insbesondere die Antigenpräsentation zur T-Zell-Aktivierung bei der Immunantwort sowie die Toleranzentwicklung gegen körpereigene Strukturen, aber auch die Hemmung von sogenannten „Natürlichen Killer-Zellen“ bei der Sicherstellung des Überlebens von T-Zellen in den Geweben und im Blut sowie die Aktivierung von Fress- und B-Zellen während einer Immunantwort.

Die Gene des MHC-Komplexes befinden sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 und kodieren u.a. für die HLA-Proteinketten, die als hochpolymorphe Proteinstrukturen auf der Zelloberfläche von Leukozyten präsent sind. Daneben befinden sich in diesem Komplex Gene für Proteine, die bei der Präsentation von Antigenen wichtige Funktionen übernehmen. Schließlich sind hier auch Gene für Komponenten des Komplementsystems sowie für einige Zytokine lokalisiert. Die Genprodukte (Zellmembranantigene) der HLA-Klasse I Antigene A, B und C finden sich in den Zellmembranen (fast) aller kernhaltigen Körperzellen. Die HLA-Klasse II Antigene finden sich vor allem auf sogenannten professionellen antigen-präsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen, Makrophagen, Langerhans-Zellen der Epidermis aber auch auf B-Zellen und aktivierten T-Zellen.

Aufgrund des ausgeprägten Polymorphismus des HLA-Systems weisen nicht verwandte Personen in diesen Genen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit Unterschiede auf. Basierend darauf hängt der Erfolg einer Transplantation in starkem Maße davon ab, dass die HLA-Merkmale eines Spenders und eines Empfängers kompatibel, d. h. in wesentlichen strukturellen Merkmalen übereinstimmend sind. Derzeit besteht Konsens darin, dass für den Ausgang der Transplantation allogener Blutstammzellen Polymorphismen

an den Genorten HLA-A, HLA-B und HLA-DRB1 prädiktiv sind. Für eine erfolgreiche Organ- bzw. Knochenmarktransplantation hat es daher hohe Priorität, einen nicht verwandten HLA-identischen Spender zu finden, sofern nicht Familienmitglieder in Frage kommen. Daher wird derzeit intensiv an Methoden gearbeitet, die eine einfache, schnelle und sichere Bestimmung von HLA-Polymorphismen auf molekularer Ebene erlauben, so dass eine exaktes „Matching“ der HLA-Merkmale vor Transplantationen gewährleistet ist.

Auch im Bereich der Toleranzentwicklung des Immunsystems gegen körpereigene Strukturen übernehmen die HLA-Antigene eine zentrale Aufgabe. Hat die HLA-vermittelte Toleranzentwicklung des Immunsystems nicht perfekt funktioniert, so richtet sich das Immunsystem nicht nur gegen körperfremde, sondern auch gegen körpereigene Stoffe mit der Folge der Entwicklung einer Autoimmunerkrankung. Die Identifizierung und Charakterisierung der genetischen Faktoren, die zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie Psoriasis Arthritis, dem juvenilen Diabetes mellitus, der Sklerodermie oder der juvenilen Dermatomyositis führen können, stellt einen wichtigen Forschungsschwerpunkt des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen dar. Auslösende Faktoren für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen können beispielsweise Infektionen mit Viren oder Bakterien, entzündliche Reaktionen oder Medikamente sein. Auch die Bedeutung retroviraler Insertionen im Bereich des HLA-Systems wird im Zusammenhang mit der Genese von Autoimmunerkrankungen diskutiert. Schließlich deuten einige Forschungsarbeiten auch auf einen feto-maternalen Mikrochimärismus als mögliche Ursache einer Prädisposition für verschiedene Autoimmunerkrankungen hin. So konnte die Bedeutung nicht-vererbter HLA-DQ-Allele für eine Prädisposition zu Typ 1 Diabetes mellitus

gezeigt werden, die möglicherweise durch persistierende maternale Antigenpräsentierende Zellen beim betroffenen Kind erklärt werden kann. Neben dem HLA-System spielen aber auch noch weitere Rezeptorsysteme eine Rolle in der komplexen Regulation der Immunantwort. So stellen die Oberflächenrezeptoren des KIR-Rezeptorsystems (=killer cell immunoglobulin-like receptors) wichtige Liganden des HLA-Rezeptors dar. Sie wirken aktivierend, inhibierend oder allgemein regulierend auf NK- und T-Zellen. Die Analyse der Interaktion des HLA- und des KIR-Systems ist Gegenstand der Forschungsarbeit des DRK-Blutspendedienstes.

Die autologe oder allogene Übertragung von Knochenmark und Blutstammzellen hat sich in den letzten Jahren zu einem Standardtherapieverfahren für viele maligne und angeborene Erkrankungen des blutbildenden Systems entwickelt. Autologe Stammzellen werden dabei dem Patienten selbst, allogene Zellen einem HLA-identischen oder HLA-kompatiblen Familien- oder nicht-verwandten Spender entnommen. Um den Erfolg der Transplantation gewährleisten zu können, ist die HLA-Identität von Patient und Spender von großer Bedeutung. Die Untersuchung der immunologischen Bedeutung von HLA-Alleldifferenzen für die allogene Blutstammzelltransplantation ist daher ein Schwerpunkt der Forschungstätigkeit des

DRK-Blutspendedienstes. Geklärt werden soll hierbei insbesondere die Relevanz von HLA Differenzen der HLA-Klasse I Antigene A, B und C für das Überleben nach Transplantation, für ein Transplantatversagen, für die Entwicklung einer akuten bzw. chronischen Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (=Graft-versus-host-reaction) sowie einer möglichen Transplantat-gegen-Tumor-Reaktion (=Graft-versus-leucemia). Im Fokus stehen dabei die Fragen, ob und welche HLA-Allele in Zukunft bei der immungenetischen Spendersuche berücksichtigt werden sollten und welche HLA-Differenzen akzeptabel erscheinen, sofern kein HLA-identischer Spender zur Verfügung steht. Im Zusammenhang mit der klinisch-diagnostischen Beurteilung des Transplantationsverlaufs wird auch die Bedeutung des zelllinienspezifischen Chimärismus nach Stammzelltransplantation untersucht. Die Etablierung einer DNA-Chip-Technologie könnte zu einer Beschleunigung des Analysevorgangs sowie einer deutlichen Materialersparnis und somit zu einer signifikanten Kostenreduktion bei der HLA-Diagnostik führen. Zur Entwicklung einer Biochip-Analyse der HLA-Merkmale findet eine Zusammenarbeit mit einem deutschen Biotechnologie-Unternehmen statt.

Autoimmunität und Transplantation



**Projektleitung:
Priv.-Doz. Dr. med.
Christian Seidl**

Standort: Frankfurt

Projektleitung: Priv.-Doz. Dr. med. Christian Seidl

Studium

1981 – 1988 Studium der Humanmedizin
an der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

1988 Staatsexamen

1988 Dissertation

Berufliche Tätigkeit

1988 – 1991 Memorial Sloan Kettering Cancer
Center, New York, USA

1991 – 1992 Zentrum der Inneren Medizin, Klinikum
der J.W. Goethe-Universität, Frankfurt

1993 – 1995 Institut für Transfusionsmedizin und
Immunhämatologie

seit 1995 Leiter der Abteilung
Transplantationsimmunologie und Hämogenetik

seit 2000 Qualitätsmanagement-Beauftragter Institute
Frankfurt und Kassel

seit 2001 Vorsitzender der Deutschen Gesellschaft
für Immungenetik

Sonstiges

- Facharzt für Transfusionsmedizin
- Habilitation für experimentelle Hämatologie
- Stipendiat der Deutschen Forschungsgemeinschaft
- Clinical Scholars Fellow in Biomedical Research
- Charles A. Dana Research Fellow
- Mitgliedschaft in zahlreichen wissenschaftlichen
Fachgesellschaften
- Gutachter für verschiedene wissenschaftliche
Publikationsorgane
- Fachgutachter der European Federation for
Immunogenetics
- Kongresspräsident der 9. Jahrestagung der
Deutschen Gesellschaft für Immungenetik

Die Arbeitsgruppe von PD Dr. med. Christian Seidl beschäftigt sich mit immunologischen Regelmechanismen bei Autoimmunerkrankungen und nach Transplantationen.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Untersuchung von krankheitsspezifischen HLA-Genstrukturen und der Einfluss von humanen endogenen retroviralen (HERV) Insertionen im Bereich des HLA-Systems für die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen. Hierzu werden in enger Zusammenarbeit mit verschiedenen klinischen Abteilungen der Universität Frankfurt sowie dem Rheumazentrum Rhein-Main Untersuchungen von HLA-Merkmalen und endogenen retroviralen Insertionen bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen durchgeführt.

Die Untersuchung vielfältiger Wechselwirkungen des feto-maternalen Immunsystems bildet einen weiteren Forschungsschwerpunkt. Hier werden bei Autoimmunerkrankungen wie der Psoriasis Arthritis oder dem juvenilen Diabetes mellitus der Einfluss von persistierenden feto-maternalen Mikrochimärismen beobachtet sowie in Zusammenarbeit mit der Klinik für Frauenheilkunde fehlgeleitete Immunmechanismen bei Schwangerschafts-gestosen untersucht.

Die Untersuchung von Genen der als „KIR“ (=killer cell immunoglobulin-like receptors) bezeichneten Oberflächen-Rezeptoren, welche NK- und T-Zellen regulieren, stellt einen weiteren Fokus dar. Ein wesentlicher Ligand für diese Rezeptoren ist der HLA-Rezeptor. Die Arbeitsgruppe hat sich daher mit dem Aufbau einer molekularbiologischen Untersuchungsmethode für die Bestimmung des s sowie der Oberflächen-expression von KIRs beschäftigt. Ziel dieser Untersuchungen ist, die Interaktionen zwischen dem KIR- und dem HLA-Rezeptorsystem bei Autoimmunerkrankungen und Transplantationen zu beschreiben.

Working Group: Autoimmunity and Transplantation PD Dr. med. Christian Seidl

The research group of PD Dr. med. Christian Seidl works on immune mechanisms leading to autoimmune disease and immunoregulatory pathways involved in transplantation.

A major focus of the work is the characterization of disease-specific allelic variation of HLA-genes and the functional role of human endogenous retroviral (HERV) elements in autoimmunity. These studies are performed in collaboration with the department of internal medicine at the local university hospital and the Rhein-Main centre of rheumatic disease. A further project is the analysis of mechanism involved in the feto-maternal immune response. In this context the influence of feto-maternal chimerism on disease predisposition is analysed in patients with psoriatic arthritis and juvenile diabetes mellitus. In addition, studies are performed to characterize immune mechanism involved in pregnancy-specific diseases, such as placental abruption and preeclampsia. These studies are done as part of a multi-centre project of the University of Frankfurt.

The research group has also started to analyse a group of immune genes, that code for receptors on natural killer cells. This 'killer-cell immunoglobulin-like receptors (KIR)' gene system regulates NK- and T-cells. A major ligand of this receptor system are HLA class I molecules. In this respect the research group has started to perform genetic and functional analysis of these KIR genes in patients with autoimmune disease and after transplantation.

Transplantationsimmunologie

Standort: Ulm

**Komm. Leitung: Dr. med. Klaus Schwarz (seit 2/2002)
(Leitung bis 1/2002: Professor Dr. med. Shraga F. Goldmann)**

Studium

1959 – 1966 Studium der Humanmedizin an der
Universität Hamburg

1966 Ärztliche Prüfung

1968 Approbation

1970 Promotion

1980 Habilitation

1988 Außerplanmäßiger Professor

Berufliche Tätigkeit

1980 – 01/2002 Leiter der Abteilung
Transplantationsimmunologie des DRK-
Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen

1992 – 1999 Kommissarischer Leiter des Instituts
Mannheim des DRK-Blutspendedienstes Baden-
Württemberg – Hessen

Sonstiges

seit 1991 Wissenschaftlicher Berater des Zentralen
Knochenmarkspender-Registers Deutschland (ZKRD)

Facharztqualifikation

Facharzt für Transfusionsmedizin

Wissenschaftlicher Lebenslauf Dr. med. Klaus Schwarz siehe Themenbereich 5

Die Arbeitsgruppe setzt sich aus den Projektleitern Professor Dr. med. Shraga F. Goldmann (bis 31.01.2002) und Dr. med. Klaus Schwarz sowie dem Wissenschaftlichen Assistenten Dr. K. Hirv und der Technischen Assistentin T. Kirsten zusammen. Die Arbeitsgruppe hat die notwendigen Analysesysteme zur allelischen Auflösung aller relevanten HLA-Loci etabliert. Für die genetische HLA-Analytik sind mittelhochauflösende SSO- und SSP-Systeme ebenso etabliert wie die DNA-Sequenzierung generischer und allelischer HLA-PCR-Produkte. Für die Sequenzanalytik stehen drei Kapillarsequenziergeräte sowie ein lokales Netzwerk zur Datenverarbeitung zur Verfügung, so dass eine effiziente Abarbeitung anfallender Proben gewährleistet ist.

Working Group: Transplantation Immunology Professor Dr. med. Shraga F. Goldmann, head Dr. med. Klaus Schwarz, head

The members of the Transplantation Immunology team are the project leaders Professor Dr. Shraga Goldmann and Dr. Klaus Schwarz, the scientific assistant Dr. K. Hirv and the technical assistant T. Kirsten. The working group has established all necessary systems for the allelic analysis of the HLA loci in question. For the genetic HLA analysis we have introduced medium-high resolution techniques such as SSO and SSP systems and, in addition, we use DNA sequencing to resolve generic and allelic HLA-PCR products. The DNA sequences are produced by three capillary sequencers and are processed with the help of a local data network. With this technical support we are in the position to efficiently analyse all incoming probes.



**Komm. Leitung:
Dr. med.
Klaus Schwarz**



**Projektleitung bis 1/2002:
Prof. Dr. med.
Shraga F. Goldmann**

Interaktion des KIR- und HLA-Rezeptorsystems bei Autoimmunerkrankungen und Transplantationen und Aufbau einer molekularbiologischen Untersuchungsmethode für die Bestimmung des KIR-Rezeptorsystems

Ziel des Projektes:

In diesem Projekt sollen die Interaktionen des KIR- und HLA-Rezeptorsystems bei Autoimmunerkrankungen und Transplantationen beschrieben sowie eine molekularbiologische Untersuchungsmethode für die Bestimmung des KIR-Rezeptorsystems aufgebaut werden.

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Die Aufklärung der Struktur der HLA-Moleküle sowie die Charakterisierung der Regeln für die Präsentation von Peptiden durch HLA-Moleküle hat in den letzten Jahren zu einer Erweiterung des Verständnisses der Interaktion zwischen dem Komplex aus HLA-Molekül, präsentem Peptid und T-Zell-Rezeptor geführt. Diese von den HLA-Molekülen ausgeübte Funktion der Präsentation von extra- und intrazellulären Peptiden und der Induktion einer spezifischen T-Zell-Reaktion ist von wesentlicher Bedeutung in der Regulation einer spezifischen Immunantwort und wird als MHC-Restriktion bezeichnet. Der Regulation dieser Immunantwort kommt daher eine große Bedeutung bei der Übertragung fremder Gewebe (z.B. Organe oder Blutstammzellen) in der Transplantationsmedizin zu. Bei Autoimmunerkrankungen kommt es infolge einer fehlgeleiteten Immunantwort zu einer Zerstörung von körpereigenen Strukturen. Endstrecke dieser aberranten Immunfunktion ist eine Vielzahl von Autoimmunerkrankungen, die zu einer wesentlichen Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit bis hin zu einer Verkürzung der Lebenserwartung mit erheblichen sozio-ökonomischen Effekten führen. Schwerpunkt des Forschungsprojektes ist es daher, genetische und funktionelle Faktoren zu identifizieren, die zu Autoimmunerkrankungen führen oder bei transplantationsimmunologischen Reaktionen von klinischer Bedeutung für die Einschätzung der Gewebeverträglichkeit sind. Die Untersuchungen schließen Gene der HLA-Region sowie genetische Loci außerhalb der klassischen HLA-Region (z.B. CTLA-4) ein. Hierbei soll die genaue Kenntnis der molekularen Strukturen von krankheitsassoziierten HLA-Merkmalen und der dadurch bedingten Unterschiede in der Präsentation von Peptidfragmenten dazu führen, „Autoantigene“ zu ermitteln und die krankheitsinduzierenden T-Zellen zu eliminieren. Ein weiterer wichtiger Aspekt dieses Forschungsprojektes ist es, die Bedeutung von Rezeptoren auf Natürlichen-Killer-Zellen (NK-Zellen) für Autoimmunität und Transplantation zu erforschen. Die klinische Funktion dieser erst kürzlich entdeckten Genloci auf Chromosom 19 ist noch nicht vollständig verstanden. Interessant ist jedoch, dass sich dieses, als Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) bezeichnete Oberflächenrezeptorsystem in aktivierende und inhibierende Rezeptoren untergliedert und eine wesentliche Funktion in der Regulation von NK-Zellen und T-Zellen besitzt. Einer der wichtigen Liganden für diese Rezeptoren sind die HLA-Klasse I Merkmale. Ziel des Projektes ist es daher, innerhalb von klinischen Studien die Interaktion zwischen dem KIR- und HLA-System im Rahmen von Autoimmunerkrankungen und Transplantationen zu untersuchen.

Die wichtigsten Ergebnisse

In klinischen Studien und Familienanalysen zusammen mit den Abteilungen für Rheumatologie und Endokrinologie der Medizinischen Klinik am Universitätsklinikum Frankfurt wurde die Bedeutung von HLA-Merkmalen in der Prädisposition und der Schweregrad-Ausprägung bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (multi-zentrische GENRA-Studie) und juvenilem Diabetes mellitus (IDDM) untersucht. Der Bezug zwischen Schweregrad der Erkrankung und HLA-Merkmalausprägung lässt sich bei diesen Patienten eindeutig nachweisen und ermöglicht eine bessere Abschätzung für die Therapie. Weiterhin konnte bei Patienten mit rheumatoider Arthritis eindeutig eine

genetische Prädisposition durch HLA-DQB1 assoziiert Merkmalskombinationen nachgewiesen werden. Diese neue Disposition ermöglicht ein erweitertes Verständnis für zukünftige therapeutische Interventionen bei dieser Erkrankung. In Kooperation mit dem Bereich Zell- und Gentherapie (AG Dr. T. Tonn, im Hause) konnten ein molekularbiologisches Bestimmungssystem für die verschiedenen KIR-Genorte erarbeitet und erste funktionelle und epidemiologische Daten erhoben werden. Im neu etablierten Forschungsverbund Psoriasis Arthritis wurde untersucht, inwieweit die Expression von KIR auf T-Zellen das zytotoxische Repertoire verändert. Erste Untersuchungen zum Einfluss von KIR- und HLA-Rezeptoren bei Patienten nach haplo-identischen Blutstammzelltransplantation wurden in Zusammenarbeit mit der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie am Universitätsklinikum Frankfurt durchgeführt.

Allgemeinverständlicher Überblick

Bei der immunologischen Erkennung zwischen „körperfremd“ und „körpereigen“ entspricht das HLA-System (HLA= Human leukocyte antigen) dem Verträglichkeitssystem der Gewebe des Menschen. Die Aufklärung der Struktur der HLA-Moleküle spielt daher sowohl bei der Transplantation von blutbildenden Stammzellen und von Organen als auch bei der Entwicklung sogenannter Autoimmunerkrankungen eine entscheidende Rolle. Als „fehlgeleitete Immunantwort“ wird hierbei jene Reaktion des Organismus bezeichnet, durch die es zur Zerstörung von körpereigenen Strukturen kommt. Beispiele hierfür sind die rheumatoide Arthritis (RA), bei der fehlregulierte aktivierte Lymphozyten normales Gewebe selbst angreifen oder zur Bildung von autoaggressiven Antikörpern anregen. Dies geschieht auch beim juvenilen Diabetes mellitus (IDDM), bei dem der Organismus Antikörper gegen die Insulinproduzierenden C-Zellen produziert. In den letzten Jahren konnte die Bedeutung von HLA-Merkmalen in der Prädisposition und der Schweregrad-Ausprägung solcher Autoimmunerkrankungen intensiv erforscht werden. Erst kürzlich wurde eine neue Gruppe von Merkmalsregionen auf immunologisch relevanten Gengruppen charakterisiert, die Rezeptoren von Natürlichen-Killer-Zellen (NK-Zellen) darstellen. Diese als Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) bezeichneten Oberflächenrezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellen des Abwehrsystems. Erste Untersuchungen weisen auf eine Bedeutung dieser Oberflächenrezeptoren in der Transplantationsmedizin und der Prädisposition für Autoimmunerkrankungen hin.

Summary:

Analyses of HLA and KIR interaction in clinical autoimmunity and transplantation

The project is focused on the genetic and functional interaction between human leukocyte antigens (HLA) and killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) in autoimmunity and transplantation. Autoimmune diseases studied include collaborative projects on patients with rheumatoid arthritis, psoriasis arthritis and juvenile diabetes mellitus. The project is also focused to establish an easy and reliable typing method for NK cell receptor genes.

Projektkennzahlen

Förderung:	Eigenmittel
Laufzeit:	2 Jahre
Projektleitung:	Priv.-Doz. Dr. Christian Seidl
Mitarbeiter:	cand. med. Christine Wild
Kooperation:	Kooperationsprojekt für den Bereich Autoimmunität mit der Abteilung für Rheumatologie (Prof. Dr. J.P. Kaltwasser, Medizinische Klinik III) und Endokrinologie (Prof. Dr. K. Badenhoop, Medizinische Klinik I), Universitätsklinikum Frankfurt Kooperationsprojekt für den Bereich Transplantation mit der Klinik für Kinderheilkunde III – Pädiatrische Hämatologie und Onkologie – (Dr. U. Köhl, Prof. Dr. T. Klingebiel), Universitätsklinikum Frankfurt

Weiterführende Informationen:

1. Lanier LL. Follow the leader: NK cell receptors for classical and nonclassical MHC class I. Cell 92:705, 1996.
2. Moretta L, Bottino C, Pende D, Mingari MC, Biassoni R, Moretta A. Human natural killer cells: their origin, receptors and function. Eur J Immunol 32:1205, 2002.
3. Boyington JC, Motyka SA, Scuck P, Brooks AG, Sun PD. Crystal structure of a NK cell immunoglobulin-like receptor in complex with its class I MHC ligand. Nature 405:537, 2000.
4. Tonn T, Becker S, Esser R, Schwabe D, Seifried E. Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line NK-92. Journal of hematology & stem cell research 10:535, 2001.

Kontakt:

Priv.-Doz. Dr. med. Christian Seidl

Institut für Transfusionsmedizin und Immnhämatologie Frankfurt

DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gGmbH Sandhofstraße 1 60528 Frankfurt am Main

Telefon 069 – 6782 – 232

Fax 069 – 6782 – 217

E-Mail cseidl@bschhessen.de

Feto-maternaler Mikrochimärismus und Regulation immunologischer Toleranz bei Autoimmunität

Ziel des Projektes:

Ziel dieser neu etablierten interdisziplinären Arbeitsgruppe Immunologie mit Zentralprojekt in der Abteilung für Endokrinologie am Universitätsklinikum Frankfurt ist die Erforschung vielfältiger Wechselwirkungen des feto-maternalen Immunsystems.

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Feto-maternale Immunwechselwirkungen und Pathomechanismen in der Autoimmunität und in der Transplantationsmedizin stehen im Vordergrund dieses Forschungsverbundes. Dabei wird während der normalen Schwangerschaften und danach, bei Gestationsdiabetes und bei Autoimmunerkrankungen untersucht. Zur Anwendung kommen klinische Untersuchung, Lymphozytenreaktionstests und Zelllinien.

Dabei wurde erstmals die Bedeutung nicht-vererbter mütterlicher HLA-DQ-Allele für die Prädisposition zu Typ 1 Diabetes mellitus gezeigt. Erklärt werden könnte sie u.a. durch persistierende maternale Antigen-präsentierende Zellen beim betroffenen Kind. Auch bei der Sklerodermie und der juvenilen Dermatomyositis fanden sich persistierende feto-maternale Mikrochimärismen. Ein Transfer immunreaktiver Zellen erfolgt dabei in feto-maternale oder maternal-fetale Richtung.

Selbst bei Patientinnen mit einer Hashimoto-Thyreoiditis konnte am Schilddrüsengewebe ein derartiger Mikrochimärismus gezeigt werden. Gegenstand weiterer Forschung sind die Herkunft, der immunologische Phänotyp, die Konzentrationen solcher Mikrochimärismen sowie der entsprechende Pathomechanismus in der Autoimmunität. Da die HLA-Inkompatibilität (aber auch für andere Immungene) mit dem fremden Allel beim Mikrochimärismus eine alloreaktive Immunreaktion auslösen kann, sollen die immungenetischen Marker HLA-DR, -DQ, CTLA4 und KIR-System untersucht und mit den phänotypischen Daten (Vorkommen und quantitative Zelldichte von Mikrochimärismen) korreliert werden.

Die Analysen von Mikrochimärismen in Familien- und Patienten-/Kontrollstudien in der Transplantationsimmunologie und bei Autoimmunerkrankungen wie Psoriasis, rheumatoider Arthritis und Morbus Addison werden ein grundlegendes Verständnis feto-maternaler Immunität erlauben.

Die wichtigsten Ergebnisse

Voruntersuchungen haben erstmals die Bedeutung nicht-vererbter mütterlicher HLA- DQ- Allele für die Prädisposition zu Typ 1 Diabetes mellitus gezeigt, was u.a. durch persistierende maternale Antigen-präsentierende Zellen beim betroffenen Kind erklärt werden könnte.

Persistierende feto-maternale Mikrochimärismen konnten ebenfalls durch Untersuchungen anderer Gruppen bei Autoimmunerkrankungen wie der Sklerodermie oder der juvenilen Dermatomyositis beobachtet werden. Auffällig ist dabei der fetal-maternale und der maternal-fetale Transfer immunreaktiver Zellen. Vergleichbar lässt sich ein Mikrochimärismus in Gewebeuntersuchungen bei Patientinnen mit Hashimoto Thyreoiditis nachweisen.

Allgemeinverständlicher Überblick

Wechselwirkungen im Bereich des Immunstatus bestehen natürlich auch während der Schwangerschaft zwischen Mutter und Kind. Zum besseren Verständnis dieser feto-maternalen Immunität wird diese während der Schwangerschaft und danach erforscht.

Interessanterweise kann dabei der Transfer immunreaktiver Zellen sowohl der Mutter zum Kind als auch umgekehrt vom Kind zur Mutter erfolgen, der noch bis zu 30 Jahre später nachgewiesen werden kann.

Die Mechanismen, die zu Autoimmunerkrankungen bzw. zu Abstoßungsreaktionen in der Transplantationsmedizin führen, bilden einen zentralen Forschungsschwerpunkt dieses Projektes. So ist zum Beispiel die Beobachtung, dass die Veranlagung zum Typ 1 Diabetes mellitus durch persistierende mütterliche Antigen-präsentierende Zellen beim betroffenen Kind erklärt werden könnte, ein Ergebnis dieser Forschung. In weiterführenden Untersuchungen soll auch die Bedeutung von NK-Zell-Rezeptorgenen untersucht werden.

Summary:

Feto-maternal Microchimerisms and Regulation of Immune Tolerance in Autoimmune diseases

This project is a collaborative study project initiated by the department of endocrinology including several medical departments of the JW Goethe University Hospital. The scientific focus is to evaluate the clinical significance of microchimerism due to the placental transfer of fetal cells to the mother. These cells carry genetic information of the father. Expression and/or regulation of particular immune response genes may lead to the breakdown of the immune system leading to autoimmune disease.

Projektkennzahlen

Förderung:	Forschergruppenantrag bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft
Projektleitung:	Priv.-Doz. Dr. Christian Seidl
Mitarbeiter:	cand. med. Christine Wild cand. med. Tanja Link (Gastdotorandin) ZFG, Universitätsklinikum Frankfurt
Kooperation:	Forschungsverbund Immunologie des Universitätsklinikums Frankfurt mit dem Senkenbergischen Institut für Pathologie (Prof. Dr. M.-L. Hansmann), der Klinik für Dermatologie (Prof. Dr. W.H. Boehncke), der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe (Prof. F. Louwen, PD Dr. A. Steinborn), Institut für Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie (Prof. Dr. H. Radecke), Immunhämatologie (Prof. Dr. E. Seifried, PD Dr. C. Seidl), der Klinik für Kinderheilkunde III – Pädiatrische Hämatologie und Onkologie – und der Medizinischen Klinik I (Prof. Dr. K.-H. Usadel, Prof. Dr. K. Badenhoop). Projektteil 3: Immunhämatologie (PD Dr. C. Seidl/Prof. Dr. E. Seifried): Bedeutung von Killer-Zell-immunoglobulin-ähnlichen Rezeptoren (KIR) im Rahmen von feto-maternalem Mikrochimärismus bei Autoimmunerkrankungen.

Weiterführende Informationen:

Lambert NC, Evans PC, Hashizumi TL, Maloney S, Gooley T, Furst DE, Nelson JL. Cutting edge: persistent fetal microchimerism in T lymphocytes is associated with HLA-DQA1*0501: implications in autoimmunity. J Immunol 164 (2000): 5545-8.

Nelson JL. Microchimerism: expanding new horizon in human health or incidental remnant of pregnancy? Lancet 358 (2001): 2011-2.

Pani MA, Van Autreve J, Van der Auwerea BJ, Gorus FK, Badenhoop K. Non-transmitted maternal HLA-DQ2 or -DQ8 alleles and risk of Type I diabetes on offsprings: the importance of fetal or post partum exposure to diabetogenic molecules. Diabetologia 45 (2002): 1340-3.

Kontakt:

Priv.-Doz. Dr. med. Christian Seidl

Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie Frankfurt

DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gGmbH Sandhofstraße 1 60528 Frankfurt am Main

Telefon 069 – 6782 - 232

Fax 069 – 6782 - 217

E-Mail cseidl@bschhessen.de

Klinisch diagnostische Bedeutung von Zelllinien-spezifischem Chimärismus für den Verlauf nach Blutstammzelltransplantation

Ziel des Projektes:

Innerhalb dieses Projektes sollen Aussagen zum gemischten hämatopoetischen Chimärismus nach allogener Knochenmarktransplantation und dessen klinischer Bedeutung im Hinblick auf Toleranzmechanismen möglich werden.

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Die Transplantation von allogenen hämatopoetischen Blutstammzellen hat in den letzten Jahren stark an Bedeutung in der Therapie von bösartigen Erkrankungen des blutbildenden Systems (z.B. Leukämien) gewonnen. Mittels der Bestimmung von Immunmerkmalen (HLA-Merkmalen) wird hierbei eine hohe Gewebekompatibilität zwischen Patient und Spender gewährleistet. Transplantatabstoßungen bzw. der Schweregrad der „Graft-versus-Host-Reaktion“ können dadurch erheblich verringert werden. Ziel der allogenen Blutstammzelltransplantation ist eine komplette Verdrängung der leukämischen Blutzellen des Patienten begleitet von einer vollständigen hämatopoetischen Regeneration der transplantierten Zellen.

Anfänglich lassen sich dabei noch verbliebene hämatopoetische Zellen des Patienten neben den transplantierten Spenderzellen nachweisen (gemischter Chimärismus), bis diese die Blutbildung komplett übernehmen (kompletter Chimärismus). Der „Graft-versus-Leukemia-Effekt“, unterstützt die, durch eine intensive chemo-/strahlentherapeutische Vorbehandlung (Konditionierung) erzeugte Reduktion der patienteneigenen Hämatopoese.

Zu den Komplikationen der Therapie zählen neben Transplantatversagen, „Graft-versus-Host-Erkrankung“ und Infektionen auch das Rezidiv bei dem Patienten. Der Beurteilung des Chimärismus (komplett oder gemischt) kommt dabei eine Bedeutung für die diagnostische Abschätzung im Hinblick auf den Transplantationsverlauf zu.

Die Dynamik der Veränderung eines gemischten Chimärismus nach Blutstammzelltransplantation spielt für die Einschätzung eines Wiederaufflammens der Erkrankung eine bedeutende Rolle, da solche Rezidive durch eine frühzeitige Immuntherapie verhindert werden können. Zur semiquantitativen Erfassung des Chimärismus wurde deshalb der Nachweis von Short-Tandem-Repeat-Polymorphismen etabliert.

Die wichtigsten Ergebnisse

Moderne molekularbiologische Techniken zur Bestimmung der HLA-Merkmale ermöglichen eine immer höhere Gewebekompatibilität zwischen Patient und Spender.

Im weiteren Verlauf nach Blutstammzelltransplantation erlaubt die Beurteilung des Chimärismus (komplett oder gemischt) eine diagnostische Abschätzung des Transplantationsverlaufs. Mit dem Nachweis von Short-tandem-Repeat-Polymorphismen konnte eine routinemäßige und schnelle semi-quantitative Messung des Chimärismus etabliert werden.

Allgemeinverständlicher Überblick

Bei der Behandlung von bösartigen Erkrankungen des blutbildenden Systems (z.B. Leukämien) hat die Transplantation von allogenen (=vom Fremdspender) hämatopoetischen Blutstammzellen stark an Bedeutung gewonnen, zumal mittels moderner molekularbiologischer Technik eine hohe Gewebeübereinstimmung zwischen Patient und Spender gewährleistet werden kann. Mit der Blutstammzelltransplantation sollen die leukämischen Blutzellen des Patienten vollständig verdrängt und durch die transplantierten Zellen regeneriert werden. Die anfänglich noch neben den transplantierten Spenderzellen verbliebenen Blutzellen des Patienten (gemischter Chimärismus) werden zunehmend ersetzt (kompletter Chimärismus).

Um den möglichen Komplikationen der Transplantation wie Transplantatversagen, „Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion“, Infektion oder Wiederauftreten der Erkrankung erfolgreich entgegenwirken zu können, hat sich die Beurteilung des Chimärismus bewährt.

Wie im Rahmen dieses Projektes belegt werden konnte, ist die Dynamik der Veränderung eines gemischten Chimärismus nach Blutstammzelltransplantation von großer Bedeutung für die Einschätzung des Erfolgs der Behandlung bzw. eines Rezidivs der Erkrankung.

Summary:

Clinical and diagnostic relevance of cell line specific chimerism after stem cell transplantation

The project is focused to establish novel techniques in the semi-quantitative detection of mixed hematopoietic chimerism after stem cell transplantation and to define the clinical relevance of chimerism. Analysis is performed using molecular biology techniques including short tandem repeat polymorphisms on peripheral blood, bone marrow aspirate and cell lines after magnetic separation. The clinical data have been recruited in a long term collaborative follow-up study.

Projektkennzahlen

Förderung:	Eigenmittel
Projektleitung:	Priv.-Doz. Dr. Christian Seidl
Mitarbeiter:	cand. med. Christiane Arnold
Kooperation:	Prof. Dr. T. Klingebiel (Abteilung Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Frankfurt) Prof. Dr. Dr. A. Fauser (Klinik für Knochenmarktransplantation, Idar-Oberstein) PD Dr. B. Markus (Abteilung Abdominalchirurgie, Universitätsklinikum Frankfurt)

Weiterführende Informationen:

Bone Marrow Transplantation. Edited by S.J. Forman, K.G. Blume, E.D. Thomas. Blackwell Scientific Publications.

Kontakt:

Priv.-Doz. Dr. med. Christian Seidl

Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie Frankfurt

DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gGmbH
Sandhofstraße 1
60528 Frankfurt am Main

Telefon
069 – 6782 - 232

Fax
069 – 6782 - 217

E-Mail
cseidl@bschessen.de

Bedeutung von retroviralen Insertionen im Bereich des HLA-Systems für die Autoimmunität

Ziel des Projektes:

Projektziel ist die Beschreibung der Bedeutung von retroviralen Insertionen im Bereich des HLA-Systems für die Autoimmunität.

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Long Terminal Repeat (LTR)-Elemente humaner endogener Retroviren (HERV) finden sich über das gesamte Genom verteilt. Verschiedene dieser LTR-Elemente beinhalten regulatorische Sequenzen, die Promotor-, Enhancer- und Polyadenylierungssignale für die retrovirale Transkription einschließen. Einige dieser HERV-LTR-Elemente können die Regulation direkt benachbarter Gene beeinflussen und dadurch zur Entstehung von Krankheiten führen.

So findet sich beispielsweise beim juvenilen Diabetes mellitus und der rheumatoiden Arthritis eine deutliche Assoziation mit bestimmten HLA-DR/DQ-Haplotypen. Zudem bestehen, trotz der koordinierten Regulation der HLA-Klasse II-Genexpression, relative Unterschiede in der Oberflächenexpression zwischen den HLA-DR-, -DQ-, -DP-Merkmalen. Diese könnten wiederum die Entstehung von Autoimmunerkrankungen begünstigen.

Das Vorhandensein konservierter potentiell regulatorisch aktiver Elemente innerhalb dieser LTRs sowie die Position dieser LTR-Elemente in direkter Nachbarschaft zu dem HLA-DQB1-Genlocus legen die Möglichkeit nahe, dass diese LTR-Elemente einen regulatorischen Einfluss auf die HLA-DQ-Region ausüben.

Standort: Frankfurt

**Projektleitung:
Priv.-Doz. Dr. med.
Christian Seidl**

Infektion von Zellen durch Retroviren

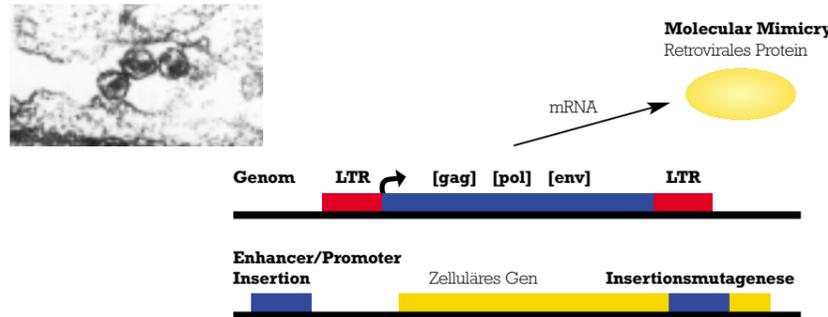


Abb. 1: Infektion von Zellen durch Retroviren und anschließende Integration retroviraler Strukturen in das Genom können zur Bildung von retroviralen Proteinen und/oder Transaktivierung von Genen führen. Long Terminal Repeat (LTR)-Elemente humaner endogener Retroviren (HERV) finden sich über das gesamte Genom verteilt. Verschiedene dieser LTR-Elemente beinhalten regulatorische Sequenzen, die Promotor-, Enhancer- und Polyadenylierungssignale für die retrovirale Transkription einschließen (Abbildung 2). Einige dieser HERV-LTR-Elemente können die Regulation direkt benachbarter Gene beeinflussen und dadurch zur Entstehung von Krankheiten führen.

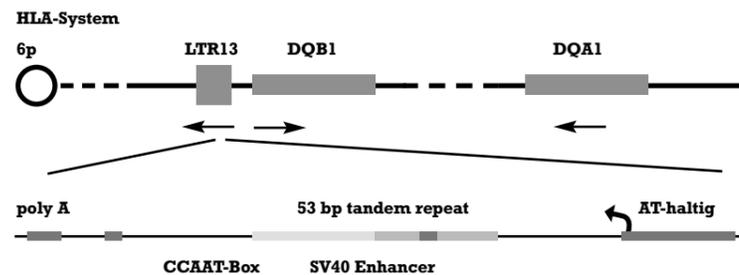


Abb. 2: LTR13 Element: Lage des LTR13 1kb vor der Transkriptionsstartstelle des HLA-DQB1 Gens (DQB1) innerhalb des HLA-Systems auf Chromosom 6. Das LTR13 enthält verschiedene regulatorische Sequenzelemente (unterer Teil der Abbildung), die auf eine funktionelle Bedeutung hinweisen. Die Transkriptionsrichtungen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Die wichtigsten Ergebnisse

Das Vorhandensein konservierter potentiell regulatorisch aktiver Elemente innerhalb dieser LTRs sowie die Position dieser LTR-Elemente in direkter Nachbarschaft zu dem HLA-DQB1-Genlocus legen die Möglichkeit nahe, dass diese LTR-Elemente einen regulatorischen Einfluss auf die HLA-DQ-Region ausüben.

In umfangreichen Patienten- und Familienuntersuchungen konnte erstmals gezeigt werden, dass die LTR-Elemente im Bereich der HLA-DQ-Region, das LTR3 und insbesondere das LTR13-Element die genetische Prädisposition für den Diabetes mellitus und die rheumatoide Arthritis verändern.

Allgemeinverständlicher Überblick

Über die gesamte menschliche Erbsubstanz verteilt finden sich Anteile so genannter humaner endogener Retroviren (HERV). Diese beinhalten regulatorische Einheiten, die ihrerseits bei der Entstehung von Krankheiten einen erheblichen Beitrag leisten können.

Summary:

Clinical relevance of retroviral insertions in the HLA-region for autoimmunity

Analysis of the genetic and clinical relevance of retroviral insertion in the HLA-region for autoimmunity.

Projektkennzahlen

Förderung:	Eigenmittel
Laufzeit:	3 Jahre
Projektleitung:	Priv.-Doz. Dr. Christian Seidl
Mitarbeiter:	cand. med. Jochen Körbitzer cand. med. Senaid Gebru (Gastdotorandin) Medizinische Klinik I, Universitätsklinikum Frankfurt
Kooperation:	Kooperationsprojekt mit der Medizinischen Klinik I – Bereich Endokrinologie (Prof. Dr. K. Badenhop) und der Medizinischen Klinik III – Bereich Rheumatologie des Universitätsklinikums Frankfurt sowie dem Paul-Ehrlich-Institut (PD Dr. R. Thönjes)

Weiterführende Informationen:

1. K Badenhop, J Körbitzer, H Donner, J Wood, M Müller, KH Usadel, E Seifried, JP Kaltwasser, C Seidl. A retroviral long terminal repeat element LTR13 in the upstream region of HLA-DQB1 is associated with DQ7/DQ8 haplotypes among patients with rheumatoid arthritis. In: J. Hansen, E. Petersdurf (Eds.): Proceedings of the 13th International Histocompatibility Workshop and Conference, in press (2002/2003).
2. Bieda K, Pani MA, van der Auwera B, Seidl C, Tönjes RR, Gorus F, Usadel KH, Badenhop K. A novel retroviral long terminal repeat adjacent to the HLA DQB1 gene (DQ-LTR13) modifies Type I (insulin-dependent) diabetes susceptibility on high risk DQ haplotypes. Diabetologia (2002) 45(3): 443-447.
3. Pani MA, Seidl C, Bieda K, Krause M, Seifried E, Usadel KH, Badenhop K. Preliminary evidence that an endogenous retroviral long terminal repeat (LTR13) at the HLA-DQB1 gene locus confers susceptibility to Addison's disease. Clin Endocrinol (2002) 56(6): 773-777.

Kontakt:

Priv.-Doz. Dr. med. Christian Seidl

**Institut für
Transfusionsmedizin und
Immunhämatologie
Frankfurt**

**DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH**
Sandhofstraße 1
60528 Frankfurt am Main

Telefon
069 – 6782 - 232

Fax
069 – 6782 - 217

E-Mail
cseidl@bschhessen.de

Bedeutung von HLA-Alleldifferenzen für die allogene Blutstammzelltransplantation

Ziel des Projektes:

Ziel des Projektes ist es, im Rahmen einer multizentrischen Studie Empfehlungen zu erarbeiten, ob und welche HLA-Allele in Zukunft bei der immungenetischen Spender-suche für allogene Stammzell- bzw. Knochenmarkspender berücksichtigt werden sollten und welche HLA-Differenzen akzeptabel erscheinen, sofern kein HLA-identischer Spender zur Verfügung steht.

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Um eine Bewertung der Bedeutung von HLA-Differenzen vornehmen zu können, werden retrospektiv bei bereits durchgeführten Transplantationen DNA-Proben von Spendern und Empfängern auf Allel-Differenzen des HLA- (Human Leukozyte Antigen)-Systems untersucht. Im Mittelpunkt der Untersuchung stehen die Genorte HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 und HLA-DQB1. Methodisch werden zum einen die Klasse-I-Genorte (HLA-A, HLA-B, HLA-C) mit einer sequenzierenden Technik untersucht und zum anderen die HLA-Klasse-II-Genorte (DRB1 und DQB1) mit einer hohen Auflösung in indirekter Technik (PCR-SSP, PCR-SSOP) getestet.

Im Rahmen einer multizentrischen Studie wurden 800 Patienten-Spenderpaare einbezogen, die zwischen Anfang 1998 und Mitte 2001 an Transplantationseinheiten in der Bundesrepublik Deutschland mit einem nicht-verwandten (n = 700) oder einem partiell HLA-kompatiblen, verwandten Spender (n = 100) transplantiert wurden.

Der klinische Ausgang allogener Stammzelltransplantationen mit identischen Allelen wird mit dem Erfolg der Transplantationen mit unterschiedlichen Allelen verglichen. Die ermittelten Alleldifferenzen werden insbesondere mit folgenden klinischen Endpunkten in Beziehung gesetzt: allgemeines Überleben, krankheitsfreies Überleben, therapieassoziierte Mortalität, primäres und sekundäres Transplantatversagen, akute und chronische graft-versus-host-reaction (GvH) und Rezidiv der Grunderkrankung.

Die Studie erlaubt zudem Aussagen darüber, ob isolierte Allel- und/oder Antigendifferenzen an einem Genort nachteiliger sind als an einem anderen Genort. Auch wird der Frage nachgegangen, ob Differenzen an mehreren Genorten negativer zu beurteilen sind als Differenzen an nur einem Genort. Umgekehrt kann diese Studie validierte Daten darüber liefern, ob so genannte „akzeptable“ HLA-Differenzen definiert werden können.

Bis Ende 2003 sollen validierte Daten und zuverlässige Aussagen zur Bedeutung der HLA-Alleldifferenzen für die allogene Blutstammzelltransplantation vorliegen.

Die wichtigsten Ergebnisse

Die durchgeführte multizentrische Studie wird zum ersten Mal bundesweit einen Einblick erlauben, ob und in welchem Prozentsatz bei Antigen-identen Spendern an den HLA-A-, HLA-B-, HLA-C-, DRB1- und DQB1-Genloci Alleldifferenzen zu beobachten sind.

Durch Korrelation der nachgewiesenen Alleldifferenzen mit den Transplantationsergebnissen soll untersucht werden, ob so genannte „akzeptable“ HLA-Differenzen definiert werden können, um so eine klinisch orientierte Spenderauswahl zu beschleunigen. Die abgeleiteten immungenetischen Empfehlungen werden einerseits die Patientenversorgung verbessern und andererseits einen Beitrag dazu leisten, die Spenderauswahl auf die wesentlichen Marker zu konzentrieren und damit Kosten zu senken.

Standort: Ulm
Projektleitung:
Dr. med.
Klaus Schwarz
Prof. Dr. med.
Shraga F. Goldman
(bis 1/2002)

Allgemeinverständlicher Überblick

Entscheidende Voraussetzung für die erfolgreiche Transplantation von Organen oder auch allogenen Blutstammzellen eines genetisch differenten Individuums derselben Spezies ist die Gewebeverträglichkeit zwischen Spender und Empfänger. Nach heutigem Kenntnisstand ist die Gewebeverträglichkeit zwischen Spender und Empfänger hauptsächlich von der Übereinstimmung der Gen-Produkte (Antigene) des Humanen Leukozyten-Antigen (HLA) -Systems abhängig. Dabei handelt es sich um auf weißen Blutkörperchen vorhandene Oberflächen-Antigene, die ein für die Immunabwehr des Menschen wichtiges Regulationssystem darstellen. Mit modernsten molekulargenetischen Verfahren werden in dieser Studie nach Allelunterschieden (Allel-mutationsbedingt abweichende Zustandsform eines Gens) zwischen Patient und Spender gesucht und diese Unterschiede in Beziehung zu den Krankheitsverläufen nach Transplantation gesetzt.

Summary:

Clinical significance of HLA allele differences for allogenic stem cell transplantation from an alternative donor

The outcome after allogenic transplantation of hemopoietic stem cells depends on the degree of matching of the antigens of the 'human leucocyte antigen' (HLA) system between donor and recipient. The number of transplantations performed with stem cells from alternative donors, i.e. not from matched family donors but from either unrelated volunteer donors or from family donors with a HLA-mismatch is steadily increasing.

The objective of this study is to analyse the impact of differences in the HLA alleles on survival, transplant-related mortality, graft failure and acute and chronic graft versus host disease after alternative donor stem cell transplantation. To this aim the HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 and HLA-DQB1 loci are analysed in 800 donor-recipient pairs transplanted in Germany between 1998 and 2001 by either sequencing (class I loci) or high-resolution typing (class II loci). The results are correlated with the clinical course after transplantation. This study shall help to define which mismatches at these loci are acceptable and which are not (taboo mismatches). This information will be important for an efficient, rapid and cost-effective search for suitable alternative stem cell donors.

Projektkennzahlen

Förderung:	Deutsche José Carreras Leukämie-Stiftung e.V.
Laufzeit:	Bis 2003
Projektleitung:	Prof. Dr. Shraga F Goldman Dr. Klaus Schwarz
Mitarbeiter:	Dr. Kaimo Hirv Tatjana Kersten

Weiterführende Informationen:

Deutsche Gesellschaft für Immungenetik: www.uni-kiel.de/dgi/

American Society for Histocompatibility and Immunogenetics:
www.ashi-hla.org/index.htm

Deutsche José Carreras Leukämie-Stiftung e.V.: www.carreras-stiftung.de

Kontakt:

Dr. med. Klaus Schwarz

IKT Ulm / DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gGmbH
 Helmholtzstraße 10
 89081 Ulm

Telefon
 0731 – 150 - 524 oder 150 - 642

Fax
 0731 – 150 - 650

E-Mail
k.schwarz@blutspende.de

„**Monoklonale Antikörper haben in den vergangenen Dekaden zu fundamentalen Erkenntnissen in der Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin geführt. Eine wesentliche Bereicherung erfuhr in den vergangenen Jahren dieser Forschungsbereich durch den Einsatz molekular-genetischer Techniken, besonders durch den Einsatz der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).**“

Deutsche Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI)

Immunhämatologie

Die immunologischen Oberflächeneigenschaften der Erythrozyten werden durch die Expression verschiedener Blutgruppenantigene determiniert. Das ABO-Blutgruppensystem stellt dabei das am längsten bekannte System dar. Es konstituiert sich aus den beiden Antigenen A und B. Je nach Vorhandensein oder Fehlen dieser Antigene wird die resultierende Blutgruppe als A, B, AB oder 0 bezeichnet. Im ABO-System liegen im Serum obligat „natürliche“ Antikörper vor, die so genannten Isoagglutinine (Anti-A und/oder Anti-B). Wegen ihrer Fähigkeit zur Aktivierung des Komplementsystems und ihrer direkten Lysewirkung können Anti-A- und Anti-B-Antikörper bei Bluttransfusionen zu hämolytischen Transfusionsreaktionen mit intravasaler Hämolyse führen. Neben dem ABO-System stellt das RH-System auf Grund seiner Antigeneigenschaften das für die Praxis zweitwichtigste Antigen-System der Erythrozyten dar und gilt gleichzeitig als das komplizierteste der bekannten Blutgruppensysteme. In diesem System werden heute fünf serologisch erfassbare Untergruppen-Antigene unterschieden. Neben den Blutgruppen-Systemen ABO und Rhesus sind für die Erythrozyten des Menschen u. a. noch die Systeme KELL (K), MNSs, P, LEWIS (Le), DUFFY (Fy), KIDD (Jk) und LUTHE-RAN (Lu) bekannt. Darüber hinaus gibt es mehrere hundert weitere Blutgruppenantigene. Diese Blutgruppen-Systeme besitzen für die klinische Praxis allerdings eine geringere Bedeutung, da diese Antigene seltener eine Immunisierung hervorrufen.

Die Verträglichkeitsdiagnostik (Kreuzprobe) bei der Transfusion von Erythrozytenkonzentraten stellt eine der Hauptaufgaben der Immunhämatologie in der klinischen Praxis dar und ist neben der Qualität der Blutpräparate eine der wesentlichen Garantien für eine sichere Therapie mit den verschiedenen Blutkomponenten. Viele Patienten haben aufgrund früherer Transfusionen Antikörper gegen Blutgruppenantigene gebildet, die bei Nichtbeachtung zu gefährlichen Komplikationen nach Gabe von Erythrozytenkonzentraten führen können. Im Rahmen der Antikörperdifferenzierung bei der Verträglichkeitsdiag-

nostik werden ggf. vorliegende Antikörper identifiziert und dann bei der Auswahl der Erythrozytenkonserven berücksichtigt. Obwohl sowohl das ABO- sowie das Rhesussystem heute als genetisch gut charakterisiert gelten, können in beiden Systemen immer wieder neue Polymorphismen identifiziert werden, die unter Umständen immunologische Relevanz für die Transfusionsmedizin besitzen. Die Erfassung und Charakterisierung dieser Polymorphismen durch die Entwicklung geeigneter Typisierungsstrategien stellt daher ein wesentliches Element zur Reduktion des Immunisierungsrisikos und Prävention transfusionsmedizinischer Komplikationen dar. Im Rahmen der Forschung des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen werden die verschiedenen Blutgruppenantigene untersucht, um die Zusammenhänge von Genotyp, Phänotyp, Struktur und Funktion der Erythrozytenantigene weiter zu klären. Schwerpunkt hierbei ist die molekulare und immunhämatologische Charakterisierung klinisch relevanter Blutgruppenphänotypen. So konnten mehrere neue Allele aus dem Rhesus-, Colton- und ABO-Blutgruppensystem charakterisiert werden. Im Rahmen der nationalen Qualitätssicherung ist im Auftrag der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie auch das deutsche Rhesus-Immunisierungsregister im DRK-Blutspendedienst angesiedelt.

Die molekulare Aufklärung und Charakterisierung der Blutgruppenantigene auf Ebene der Nukleinsäure ist serologischen Methoden in mehrerer Hinsicht überlegen: Für die Untersuchung z. B. zur Bestimmung der Blutgruppe eines Fötens kann Material wie Fruchtwasser oder peripheres Blut der Mutter benutzt werden, das für serologische Methoden ungeeignet ist. Ferner ist die Aussagekraft der molekularen Analyse nicht durch serologische Probleme wie z. B. massive vorangegangene Transfusionen oder Autoimmunhämolyse beeinträchtigt. Schließlich ermöglichen diese Verfahren auch eine sichere Identifikation von klinisch relevanten, aber immunologisch schwachen Antigenen.

Im Rahmen der Forschung des DRK-Blut-

spendedienstes wird daher intensiv an der Etablierung von routinetauglichen Verfahren zur Genotypisierung von Blutgruppenantigenen gearbeitet.

Aber auch die Weiterentwicklung der serologischen Diagnostik ist Gegenstand der Forschung. Ziel ist es, die serologische Routine der Blutgruppenbestimmung und

Antikörperdifferenzierung durch die Entwicklung und Bewertung automatisierter Verfahren, die z. B. auf der Basis von Mikrotiterplatten arbeiten, hinsichtlich der Kosten und Effizienz des Probanddurchsatzes zu optimieren.

Arbeitsgruppe

Automation in der Immunhämatologie

Standort: Mannheim
Projektleitung: Dr. med. Mohammed Kerowgan

Studium

1965 – 1971 Studium der Humanmedizin in Heidelberg

1971 Staatsexamen

1978 Dissertation

Berufliche Tätigkeit

1979 – 1986 Assistenz-Professor und Leiter des Zentrallaboratoriums am Korshid-Hospital, Universität Isfahan (Iran)

1989 – 1991 Leitender Arzt am Institut für Medizinische Laboratoriumsdiagnostik, Wiesbaden

1991 – 1992 Facharzt für Laboratoriumsdiagnostik in Karlsruhe

seit 1992 Oberarzt und Leiter des Laboratoriums der Blutspendezentrale sowie Kontroll-Leiter der Blutspendezentrale Mannheim beim DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg

seit 1997 Stufenplanbeauftragter im Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg, Institut Mannheim

Sonstiges

1977 Anerkennung als Facharzt für Laboratoriumsmedizin

1996 Anerkennung als Facharzt für Transfusionsmedizin



Projektleitung:
Dr. med.
Mohammed Kerowgan

Die Arbeitsgruppe arbeitet seit Jahren an Agglutinationsmethoden, Solid-Phase adherence assays und Automationsverfahren. Der Hauptnachteil aller Testverfahren, welche gegenwärtig eingesetzt werden, besteht darin, dass außer einer Kodierung der Mikrotiterplatten mit Antikörpern oder Antigenen mehrfache Waschschriffe und Zentrifugationen notwendig sind.

Die Arbeitsgruppe hat ein einfaches Agglutinationsverfahren für Blutgruppenbestimmung, Serumgegenprobe und Antikörpersuchtest entwickelt, welches auf der Bildung eines Erythrozyten-Monolayers in einer Mikrotiterplatte basiert und ohne Waschschriffe und Zentrifugation auskommt.

Mitarbeiter sind Jörg Spindler, Medizingenieur; Magdalene Jeschke, MTLA; Martina Vogt, MTLA; Mohammed Kerowgan, MD.

Working Group: Automation in Immunhematology
Dr. med. Mohammed Kerowgan, head

The study group works agglutination test methods, solid-phase adherence assays and automation techniques for many years. The main disadvantage of all methods currently in use is the need for coating the microplate wells with antibodies or antigens and for centrifugation or washing. This limits the feasibility of evaluating large numbers of samples.

The group has developed a simple agglutination method for forward and reverse grouping that is based on the formation of an RBC monolayer on a microplate without the need for centrifugation and washing.

Group-members are Jörg Spindler, medical engineer; Magdalene Jeschke, MTLA; Martina Vogt, MTLA; Mohammed Kerowgan, MD.

Molekularbiologie



Projektleitung:
Dr. rer. nat.
Peter Bugert

Standort: Mannheim

Projektleitung: Dr. rer. nat. Peter Bugert

Studium

1985 – 1988 Grundstudium Biologie in Würzburg mit Abschluss Vordiplom

1988 – 1990 Hauptstudium Biologie (Diplom) in Heidelberg

1991 – 1991 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Zellbiologie, Ladenburg

1991 – 1995 Promotion am Max-Planck-Institut für medizinische Forschung, Heidelberg

Berufliche Tätigkeit

1995 - 2000 Postdoc im Labor für Molekulare Onkologie der Abteilung Urologie, Uniklinik Heidelberg

seit 2000 Tätigkeit am Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie in Mannheim; Aufbau und Leitung des Molekularbiologischen Labors; aktuelle Forschungsprojekte der Arbeitsgruppe befassen sich mit immunogenetischen Aspekten der Thrombozyten

Sonstiges

- Projektleiter gemäß Gentechnikgesetz
- Strahlenschutzbeauftragter gemäß Strahlenschutzverordnung

Die im März 2000 gegründete Arbeitsgruppe - Molekularbiologie - am Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie, Mannheim, besteht neben dem Leiter, Diplom-Biologe Dr. rer. nat. Peter Bugert, aus einer MTLA (bis März 2002: Sonja Mattler; seit April 2002 Gabriele Rink) und drei Medizinstudenten als Doktoranden (Marion Vosberg, Andrea Lese und Linda Rütten).

Die methodischen Schwerpunkte der Arbeitsgruppe sind: - Entwicklung neuer Verfahren zur Genotypisierung verschiedener Polymorphismen (PCR-SSP, Arrayhybridisierung etc.), - Anwendung von Microarraysystemen zur Analyse von Genexpression, - Bereitstellung aller gängigen molekularbiologischen Methoden für die Forschungsprojekte im Institut.

Die molekulare Immunogenetik der Thrombozyten bildet den thematischen Schwerpunkt der Arbeitsgruppe mit folgenden Fragestellungen: - Identifizierung thrombozytärer Rezeptorpolymorphismen, - Neue Genfunktionen in Megakaryozyten/Thrombozyten, - Aktivierung inflammatorischer Gene durch Thrombozyten.

Working Group: Molecular Biology

Dr. rer. nat. Peter Bugert, head

In March 2000 the - Molecular Biology Group - was founded at the Institute of Transfusion Medicine and Immunology, Mannheim. The group members are Dr. Peter Bugert (Head), Sonja Mattler (Technician, March 2000 to March 2002), Gabriele Rink (Technician since April 2002) and three Medical students (Marion Vosberg, Andrea Lese and Linda Rütten).

The focus on methods and techniques includes: - Development of novel techniques for genotyping of different polymorphisms (PCR-SSP, array hybridisation etc.), - Application of microarray systems for gene expression profiling, - Support of all research projects in the Institute with molecular biological standard techniques.

The molecular immunogenetics of platelets represent the research focus of the group including the following issues: - Identification of polymorphisms in platelet receptors, - Novel gene functions in megakaryocytes/platelets, - Activation of inflammatory genes by platelets.

Immunhämatologie und Blutgruppenserologie

Standort: Ulm

Projektleiter: Priv.-Doz. Dr. med. Willy A. Flegel

Studium

1979 – 1985 Studium der Humanmedizin in Frankfurt/Main

1985 Staatsexamen

1986 Dissertation

1998 Habilitation

Berufliche Tätigkeit

1985 – 1986 Medizinische Universitätsklinik Ulm

1986 – 1991 DRK-Blutspendezentrale Ulm

1991 – 1993 Forschungsaufenthalt, Dept. Biology, University of California at San Diego

seit 1993 Abteilungsleiter Blutgruppenserologie und Immunhämatologie im DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg, Institut Ulm

Sonstiges

1995 Facharzt für Transfusionsmedizin

2003 Fachimmunologe DGfI

Mit-Verfasser des ersten medizinisch-juristischen Kommentars zum Transfusionsgesetz



Projektleitung:
Priv.-Doz. Dr. med.
Willy A. Flegel

Die Abteilung erbringt die komplette blutgruppenserologische Versorgung aller Patienten des Universitätsklinikums Ulm, ist Referenzlabor für die versorgten Krankenhäuser im Einzugsgebiet Württemberg und führt die Blutgruppenbestimmung der Spender des Instituts Ulm durch. Seit 10 Jahren wird die Abteilung von Dr. med. Willy A. Flegel, Privatdozent für Transfusionsmedizin und Immunologie an der Universität Ulm geleitet. Priv.-Doz. Dr. med. Franz F. Wagner ist stellvertretender Abteilungsleiter. Es bestehen umfangreiche internationale wissenschaftliche Kooperationen. Im Labor arbeiten regelmäßig internationale Gastwissenschaftler und Doktoranden. Die Arbeitsgruppe hat über 50 Manuskripte in international bekannten Zeitschriften veröffentlicht auf den Gebieten der Transfusionsmedizin, der molekularen Biologie und der Immunologie. Besondere Forschungsschwerpunkte der letzten Jahre waren die Blutgruppen-Gene und die Rh-Antigene. Die Ärzte der Abteilung sind ad-hoc-Gutachter für Blood, Transfusion und weitere internationale Zeitschriften.

Department: Immunohematology and Blood Group Serology

Priv.-Doz. Dr. med. Willy A. Flegel, head

The department provides the full scope of blood group serology for the patients of the University Hospital Ulm, is reference laboratory for the hospitals served in the area of Württemberg and performs the blood group typing for the donors at the Institute Ulm. Since 10 years the department is headed by Dr. med. Willy A. Flegel, Privatdozent for Transfusion Medicine and Immunology (University of Ulm) who collaborates with Priv.-Doz. Dr. med. Franz. F. Wagner as senior associate. There is an extensive record on international research collaborations. International researchers are working in Dr. Flegel's laboratory as well as postgraduate students. The work of the group was published in over 50 contributions to international renowned journals in the area of transfusion medicine, molecular biology and immunology focusing in the recent years on blood group genes and Rh antigens. The physicians of the department are ad hoc reviewers for Blood, Transfusion and other international journals.



TANGO-Studie zur vollautomatischen Blutgruppenbestimmung

Mikrotiterplatten-Agglutinations-Methode zur Bestimmung der irregulären Antikörper (Antikörpersuchtest)

Ziel der Projekte:

In den Projekten sollen bestehende Methoden der vollautomatisierten Blutgruppenbestimmung evaluiert sowie eine Vollautomatisierung der Bestimmung irregulärer Antikörper entwickelt werden.

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Im Rahmen der TANGO-Studie soll die Leistungsfähigkeit der vollautomatisierten Prozessierung der Mikrotiterplattensysteme Erytype S und Solidscreen II im Vergleich zur Gelzentrifugation (DiaMed System) evaluiert werden. Darüber hinaus soll die Spezifität und Sensitivität der Blutgruppenbestimmung im Erytype S-System unter automatisierten Bedingungen (Tango-Technik) bei der Antikörpersuche und der Kreuzprobe untersucht werden.

Für die Identifizierung irregulärer Antikörper wurde eine neue Mikrotiterplatten-Agglutinations-Methode ohne Waschen entwickelt. Dieses Verfahren ermöglicht eine schnelle automatisierte Blutgruppenbestimmung und Antikörpersuche und wurde im Vergleich zu Standardmethoden evaluiert. In Zusammenarbeit mit der Industrie soll diese Technik zur Marktreife geführt werden. Die entsprechenden Patente sind eingereicht und erteilt.

Die wichtigsten Ergebnisse

Für die serologische Untersuchung zur Identifizierung irregulärer Antikörper gegen Blutgruppenantigene wurde eine vollautomatisierbare Methode entwickelt und zum Patent angemeldet. Ferner wurde die Leistungsfähigkeit bestehender automatisierter Verfahren zur Blutgruppenbestimmung im Vergleich zur Gelzentrifugation evaluiert.

Allgemeinverständlicher Überblick

Die Automatisierung der routinemäßigen Bestimmung von Blutgruppen sowie der Suche nach so genannten irregulären Antikörpern gegen Blutgruppeneigenschaften erleichtert die Bearbeitung großer Probenzahlen und trägt somit wesentlich zur Senkung der Untersuchungskosten bei. Neue Verfahren der Automatisierung müssen jedoch zunächst gegen etablierte Standardverfahren getestet werden, um ihre Funktionsfähigkeit, Spezifität und Sensitivität belegen und sicherstellen zu können. Die Entwicklung solcher Verfahren und ihre Bewertung ist Gegenstand dieser Forschungsprojekte, die damit einen wichtigen Beitrag zur verbesserten Wirtschaftlichkeit dieser serologischen Untersuchungen leisten.

Summary:

TANGO-study concerning automated blood group typing / Microtiterplate-based agglutination method for the detection of irregular antibodies without washing and centrifugation

Current agglutination tests and solid-phase adherence methods, employed as the techniques for red cell typing and antibody screening, require centrifugation and washing steps. We developed a novel agglutination method for forward and reverse grouping based on the formation of a red blood cell monolayer on microtiter plate without the need of centrifugation and washing.

In a comparative study, 2225 samples from healthy regular blood donors were tested for ABO, Rhesus D, C, c, E, e, K and reverse grouping, in parallel, by the new micro plate agglutination method (MAM) and the commercially available blood testing system PK 7200 (Olympus) which served as a reference method.

In the case of forward grouping 0.37 % of samples tested were false negative in the new MAM and 1.35 % in the PK 7200 blood testing system. In addition, the reverse grouping PK 7200 showed 0.4 % false positive and 2.6 % false negative results, in contrast, our method was false positive in only 0.09 % and false negative in 0.67 % of cases, respectively.

These results, as well as the possibility of adapting this method to a fully automated system, suggest that our novel agglutination techniques could be an important contribution to the field of immunohematology.

Projektkennzahlen

Förderung:	Industriemittel Eigenmittel
Laufzeit:	2 Jahre
Projektleitung:	Dr. Mohammed Kerowgan
Mitarbeiter:	Magdalene Jeschke (MTA) Martina Vogt (MTA) Jörg Spindler

Kontakt:

Dr. med. Mohammed Kerowgan

Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie Mannheim

DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gGmbH
Friedrich-Ebert-Straße 107
68167 Mannheim

Telefon
0621 – 3706 - 850

Fax
0621 – 3706 - 851

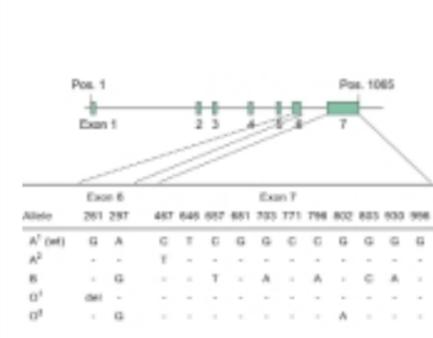
E-Mail m.kerowgan@blutspende.de

AB0-Genotypisierung kritischer Blutproben in der Transfusionsmedizin

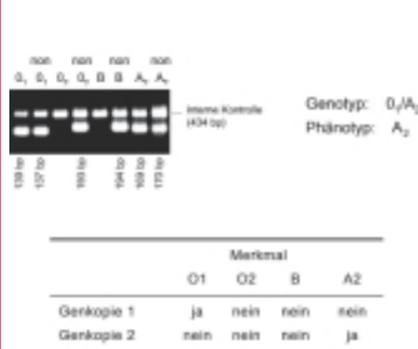
Ziel des Projektes:

Innerhalb dieses Projektes soll der Stellenwert der AB0-Genotypisierung für die verschiedenen Bereiche der Transfusionsmedizin bestimmt und bewertet werden.

Struktur und Sequenzeigenschaften des AB0-Gens



Beispiel einer AB0-Genotypisierung mittels PCR-SSP



Standort: Mannheim
 Projektleitung:
 Dr. rer. nat.
 Peter Bugert

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Das Blutgruppensystem AB0 ist gut untersucht, und die genetischen Grundlagen sind bekannt. Das AB0-Gen kodiert eine Glycosyltransferase, die je nach Spezifität entweder das A- oder das B-Antigen auf der Oberfläche der Erythrozyten generiert. Die Spezifität dieses Enzyms wird von wenigen Positionen in der DNA-Sequenz des Gens definiert. D.h., einzelne Nukleotid-Austausche entscheiden über das Vorliegen einer A- bzw. B-Transferase. Darüber hinaus führt die Abwesenheit einer Enzymaktivität zum O-Phänotyp. Auch hier sind einzelne Nukleotid-Austausche bzw. Deletionen verantwortlich. Zur Feststellung der Sequenzeigenschaften des AB0-Gens wurden in der Vergangenheit verschiedene Methoden entwickelt, wobei sich die PCR-SSP (PCR using sequence-specific primers) durchgesetzt hat. Diese allelspezifische Amplifikation stellt eine schnelle und zuverlässige Genotypisierungsmethode dar.

Im Mittelpunkt des Projektes stehen somit folgende Fragen: - Kann auch nach massiver Vortransfusion (O neg. Notfallversorgung) die korrekte Blutgruppe eines Patienten bestimmt werden? - Der seltene, schwache A-Phänotyp A^x ist bislang kaum systematisch untersucht. Verbirgt sich hinter diesem Phänotyp auch ein genetischer Polymorphismus? - Ist die AB0-Genotypisierung hilfreich bei der Erstellung von Abstammungsgutachten?

Bisherige Erfahrungen mit der AB0-Genotypisierung von Patienten nach Vortransfusion sind positiv, d. h., die richtige Blutgruppe konnte genetisch, aber nicht serologisch ermittelt werden. Zur Charakterisierung des AB0-Gens bei Individuen mit dem Phänotyp A^x wurden über die Standardmethode (PCR-SSP) hinaus die relevanten Abschnitte des AB0-Gens (Exon 6 und 7) nach Amplifikation und Klonierung sequenziert. Somit können bislang noch unbekannte Allele identifiziert werden. Die Untersuchung von 5 Blutpendern mit dem seltenen A^x-Phänotyp ergab 2 genetische Merkmale (Mutationen), die für diesen Phänotyp charakteristisch sind.

Die Aussagekraft der AB0-Genotypisierung bei Abstammungsgutachten wurde in 40 Fällen untersucht. Nur in drei Fällen brachte die Genotypisierung einen weiteren Vaterschaftsausschluss, der durch die serologische Typisierung nicht möglich war.

Die wichtigsten Ergebnisse

Zwei Mutationen im AB0-Gen, die den seltenen Phänotyp einer schwachen A-Antigen-Ausprägung hervorrufen, konnten identifiziert werden.

Die Charakterisierung des AB0-Gens bei Blutspendern mit dem seltenen A^x-Phänotyp führte zur Entdeckung zweier Mutationen im Exon 7, die vermutlich die Ursache für diesen Phänotyp darstellen. Die molekulare Analyse des AB0-Gens führte auch bei anderen Fragestellungen zur Identifizierung neuer Genvarianten.

Allgemeinverständlicher Überblick

Das sogenannte AB0-Blutgruppensystem legt die Blutgruppen A, B und O fest und zählt zu den genetisch am besten untersuchten der bekannten Blutgruppensysteme. Auch in diesem Blutgruppensystem existieren verschiedene, natürlich vorkommende Varianten, die über eine Analyse der zugrunde liegenden Gene identifiziert werden können (Genotypisierung). In diesem Forschungsprojekt soll die Bedeutung dieser Genanalyse für die Transfusionsmedizin bestimmt und bewertet werden. Insbesondere stehen dabei folgende Aspekte im Mittelpunkt: - Kann auch nach massiver Vortransfusion (O neg. Notfallversorgung) die korrekte Blutgruppe eines Patienten bestimmt werden? - Kann die Genotypisierung helfen, die Ursache des seltenen schwachen A-Phänotyps (A^x) zu erklären? - Kann eine genetische Analyse der vorkommenden Varianten bei der Erstellung von Abstammungsgutachten hilfreich sein? Bisherige Erfahrungen zeigen, dass die genetische AB0-Blutgruppenbestimmung auch nach massiver Vortransfusion möglich ist. Für den schwachen A^x-Phänotyp wurden im AB0-Gen zwei ursächliche Veränderungen gefunden. Im Zusammenhang mit der Abstammungsbegutachtung bringt die genetische AB0-Blutgruppenbestimmung gegenüber der serologischen Bestimmung nur in wenigen Fällen Vorteile.

Summary:

AB0 genotyping of critical blood samples in Transfusion Medicine

The most important blood group system AB0 is genetically defined by a single gene on the human chromosome 9. The AB0 gene encodes a glycosyltransferase and only few sequence positions in the exons 6 and 7 define the activity and specificity of the enzyme. The AB0 phenotype can be deduced from the sequence characteristics and the relevant positions in the DNA sequence can be analysed using different techniques such as PCR-SSP or sequencing. Aim of the project is to evaluate the impact of AB0 genotyping in Transfusion Medicine concerning the following questions: 1) Is AB0-genotyping helpful in patients after multiple transfusion with O neg. red blood cell concentrates? 2) Is the weak A-phenotype (A^x) genetically defined? 3) Does the AB0-genotype add helpful information in cases of personal identity investigations? First experiences showed that AB0-genotyping gives reliable results in patients even after multiple transfusion. Concerning the second question, we could identify two causative mutations in exon 7 of the AB0 gene in 5 individuals with the A^x-phenotype. Only in some cases of personal identity investigation the AB0-genotype revealed useful information in addition to serological phenotyping.

Projektkennzahlen

Förderung:	Eigenmittel
Laufzeit:	01/2001 – 12/2002
Projektleitung:	Dr. Peter Bugert Dr. Mohammed Kerwogan
Mitarbeiter:	Linda Rütten (Doktorandin) Sonja Mattler (MTA) Gabriele Rink (MTA)
Kooperationen:	Dr. S. Görg (Medizinische Universität Lübeck)

Weiterführende Informationen:

Homepage Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie, Mannheim:
www.ma.uni-heidelberg.de/inst/iti

Kontakt:

Dr. rer. nat. Peter Bugert

Institut für
 Transfusionsmedizin und
 Immunologie Mannheim

DRK-Blutspendedienst
 Baden-Württemberg –
 Hessen gGmbH
 Friedrich-Ebert-Straße 107
 68167 Mannheim

Telefon
 0621 – 3706 - 8122

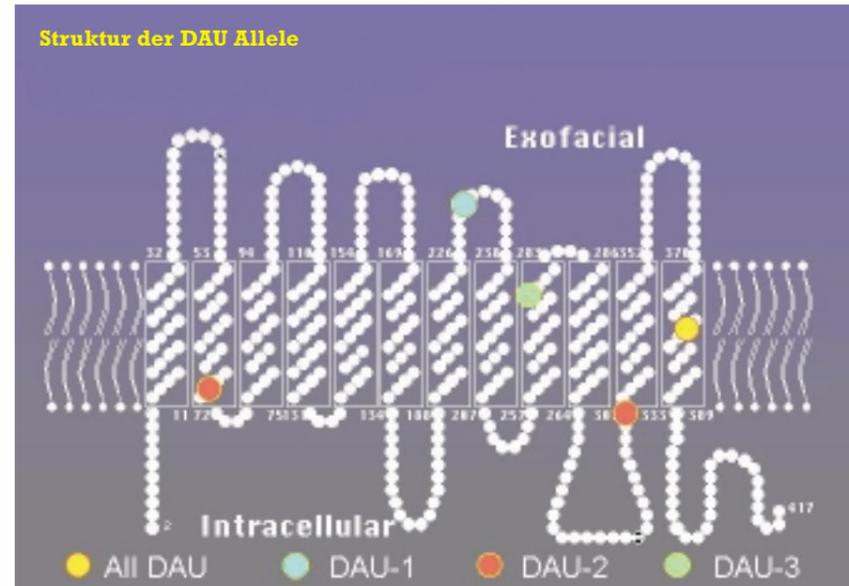
Fax
 0621 – 3706 - 851

E-Mail
p.bugert@blutspende.de

Aufklärung des Allel-Polymorphismus im Rhesus-Blutgruppensystem

Ziel des Projektes:

Zur Verbesserung der D-Typisierung in unterschiedlichen Populationen sollen die Polymorphismen des RHD-Gens aufgeklärt werden.



Hintergrund und Projektbeschreibung:

Das System der RH-Blutgruppe („Rhesusfaktor“) ist das komplizierteste der bekannten Blutgruppensysteme. Die Kenntnis der in diesem System auftretenden Allele und ihrer serologischen Phänotypen ist für die Abschätzung eines Immunisierungsrisikos klinisch außerordentlich bedeutsam und Voraussetzung für eine rationale und kostengünstige Typisierungsstrategie in der immunhämatologischen Routine. Da jede Blutgruppenbestimmung auch mit der Bestimmung des Rhesus-Antigens D einhergeht, ist die Charakterisierung der existierenden Allele von großer praktischer Bedeutung.

Die Arbeitsgruppe in Ulm erhält in erheblichem Ausmaß Blutproben durch internationale Einsendungen. Bisher wurde etwa ein Drittel aller weltweit bekannten RHD-Allele von ihr beschrieben. Insbesondere wurden fast alle bekannten weak D-Allele in Ulm charakterisiert. Die Blutproben von Patienten und Spendern werden mit molekularbiologischen und serologischen Methoden systematisch untersucht. Ziel ist die möglichst vollständige Beschreibung der gefundenen Allele mit Angaben zu ihrer Häufigkeit, ihrem serologischen Phänotyp, dem Verhalten in den derzeit üblichen Typisierungsverfahren sowie einem möglichen Immunisierungsrisiko.

Ein Meilenstein im Jahr 2001 war die Entdeckung der 5 DAU-Allele, die in der afrikanischen Bevölkerung zu den am häufigsten auftretenden Partial-D-Allelen gehören und einen eigenen Ast im menschlichen Stammbaum der RHD-Allele bilden. Dieses Verständnis der Vielfalt und Verteilung der RHD-Phänotypen erlaubt verlässliche Vorhersagen zu den Problemen, die in den unterschiedlichen Populationen bei der D-Typisierung zu erwarten sind. Die in Ulm entworfene Routine-Typisierung für Rhesus ist das seit 1996 in den deutschen Richtlinien empfohlene Verfahren und wurde später in mehreren europäischen Ländern übernommen. Die Absicherung dieses Verfahrens durch die Klärung des RHD-Stammbaums wird zur Akzeptanz auch in den USA beitragen.

Die wichtigsten Ergebnisse

Fünf neue Allele (DAU-0 bis DAU-4) des RHD-Gens konnten als Repräsentanten eines neuen und eigenständigen Astes im Stammbaum der menschlichen RHD-Allele identifiziert werden.

Die Entdeckung der DAU-Allele in der Bevölkerung Afrikas ist von klinischer Bedeutung, da diese neuen Allele Erklärungsansätze für die beobachtete Variabilität des D-Antigens und die Anti-D-Immunisierungen von Patienten afrikanischer Abstammung bieten. Darüber hinaus eröffnen sich neue Perspektiven für künftige phylogenetische Untersuchungen des Rhesus-Blutgruppensystems. War die Zahl der bekannten RHD-Allele in der afrikanischen Bevölkerung im Vergleich zur Bevölkerung Europas bisher deutlich niedriger, so erhöht sich diese Zahl durch die Entdeckung der neuen Allele signifikant.

Allgemeinverständlicher Überblick

Die „Rhesus“-Blutgruppe stellt neben dem ABO-System die zweite wichtige Blutgruppeneigenschaft der menschlichen Blutzellen dar. Im klinischen Alltag ist vor allem der „Rhesusfaktor“ D von besonderem Interesse, da er bei Unverträglichkeiten zu starken Reaktionen des Immunsystems führen kann. Besonders wichtig ist die Kenntnis der Rhesus-Blutgruppe während der Schwangerschaft: Eine Mutter, die nicht über den Rhesusfaktor D verfügt, aber mit einem D-positiven Kind schwanger ist, kann in der ersten Schwangerschaft Antikörper gegen das Blut ihres Kindes entwickeln, die in folgenden Schwangerschaften die kindlichen Blutzellen eines D-positiven Kindes zerstören. Die Kinder entwickeln in der Folge eine schwere Blutarmut, die zu gravierenden Schädigungen führt. Die genaue Charakterisierung der Rhesus-Blutgruppe wird dadurch erschwert, dass in der Bevölkerung eine Vielzahl verschiedener Versionen, sogenannte Polymorphismen, des zugehörigen Gens RHD und damit der Blutgruppeneigenschaft selbst existieren. Wird in der Schwangerschaftsvorsorge bei einer werdenden D-negativen Mutter eine bisher unbekannte Version der Rhesus-Blutgruppe beim ungeborenen Kind durch das angewandte Untersuchungsverfahren nicht erfasst, kann es zu Komplikationen kommen. Die Identifizierung und Charakterisierung möglichst aller vorkommenden Versionen der Rhesus-Blutgruppe D ist daher vor allem für die Schwangerschaftsvorsorge, aber auch in der Transfusionsmedizin allgemein besonders wichtig und ein Ziel dieses Forschungsprojektes. Eines der wichtigsten Ergebnisse des Projektes im Jahr 2001 war die Identifizierung und Beschreibung von fünf neuen Versionen des Rhesusfaktors D, die vor allem bei Menschen afrikanischer Abstammung vorkommen.

Summary:

Allele polymorphism of the RH blood group system

Five new alleles of the RHD gene (DAU-0 to DAU-4) representative of a separate branch in the phylogeny of the RHD alleles were established.

Within the phylogeny of the RHD alleles, DAU formed an independent allele cluster, separate from the DiVa, weak D type 4, and Eurasian D clusters. The characterization of the RH phylogeny provided a framework for future studies on RH alleles. The identification of the DAU alleles increased the number of known partial D alleles in Africans considerably. DAU alleles may be a major cause of antigen D variability and anti-D immunization in patients of African descent.

Projektkennzahlen

Förderung:	Stiftung der DGTI, Sachkostenbeihilfe DGTI/file/00-01 „Rhesusprojekt“ Bausteinprojekt P531 des Universitätsklinikums Ulm
Laufzeit:	01.01.1999 – 31.12.2001
Projektleitung:	Priv.-Doz. Dr. Willy A. Flegel
Stv. Leitung:	Priv.-Doz. Dr. Franz F. Wagner
Mitarbeiter:	cand. med. dent. Oliver Dolp (Doktorand) Marianne Lotsch (Technische Assistentin)

Weiterführende Informationen:

The Rhesus Site: www.uni-ulm.de/~wflegel/RH/
RhesusBase: www.uni-ulm.de/~fwagner/RH/RB/

Kontakt:

Priv.-Doz. Dr. med. Willy A. Flegel

Institut für Klinische
Transfusionsmedizin und
Immunogenetik Ulm gGmbH

DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH
Helmholtzstraße 10
89081 Ulm

Telefon
0731 – 150 – 601

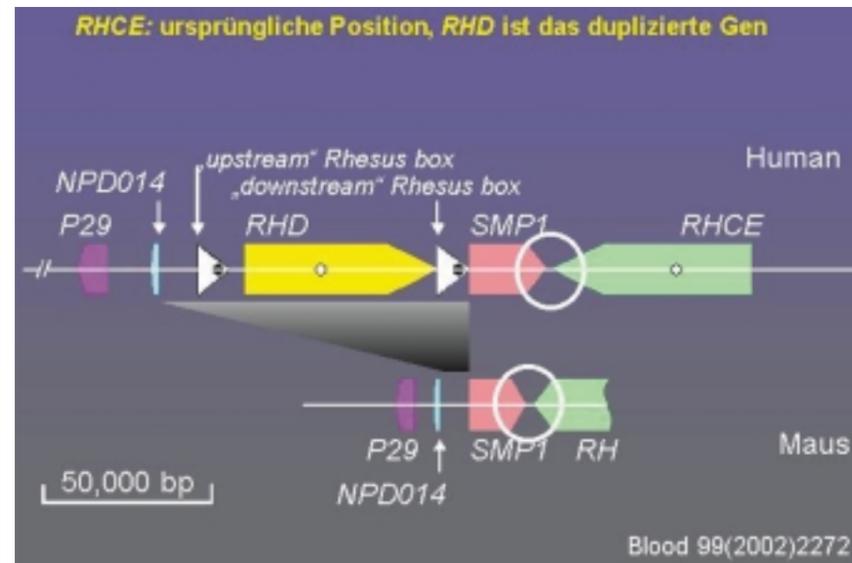
Fax
0731 – 150 – 602

E-Mail
willy.flegel@medizin.uni-ulm.de

Charakterisierung des RH-Genortes auf dem menschlichen Chromosom

Ziel des Projektes:

Das Ziel des Projektes ist die Aufklärung des RH-Genlocus zur Verbesserung der D-Typisierung in unterschiedlichen Populationen.



Hintergrund und Projektbeschreibung:

Die Kenntnis der im Rhesus-Blutgruppensystem auftretenden Allele und ihrer serologischen Phänotypen ist für die Abschätzung eines Immunisierungsrisikos klinisch außerordentlich bedeutsam. Der Aufklärung und Charakterisierung des RH-Genorts auf dem menschlichen Chromosom kommt daher eine grundlegende Bedeutung zu.

Der RH-Genort („RH-Genlocus“) umfasst die beiden Gene RHD und RHCE sowie das zwischengelagerte Gen SMP1. Die beiden RH-Gene kodieren die Antigene des Blutgruppensystems RH. Die RhD- und RhCE-Proteine bestehen aus jeweils 417 Aminosäuren und bilden membranständige Proteine mit 6 extrazellulären Schleifen. In Abhängigkeit von den Allelen unterscheiden sich RhD und RhCE in 32 bis 35 Aminosäuren, die über das ganze Protein verteilt sind. Derzeit wird die Variabilität der Struktur des RH-Genorts bei unterschiedlichen Allelen und Populationen evaluiert. Aktuell wurden die Vorgänge bei der Verdopplung der RH-Gene veröffentlicht.

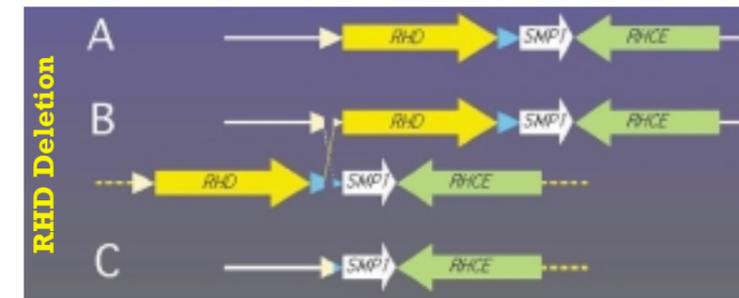
Die wichtigsten Ergebnisse

Die Struktur des RH-Genorts wurde im Jahr 2000 von der Arbeitsgruppe in Ulm aufgeklärt. Frühere Arbeiten klärten die molekulare Basis des „weak D“-Phänotyps.

Durch Aufklärung des Genorts ist es möglich geworden, die molekulare Basis der bei Europäern sehr häufigen RHD-Deletion zu bestimmen, die die Grundlage des Rhesus-negativen Phänotyps ist. Seitdem kann man bei Europäern die RHD-Deletion spezifisch nachweisen und beispielsweise die heterozygote Erbanlage bei Vätern nachweisen. Dies hat in der Beratung von Paaren große Bedeutung, wenn die Mutter ein Anti-D gebildet hat.

Durch die früheren Arbeiten der Gruppe war es möglich geworden, „weak D“-Typen zu charakterisieren, die kein Anti-D bilden können und folglich mit Rhesus-positivem Blut transfundiert werden können.

Beide grundlegenden Ergebnisse sind Beispiele dafür, welche Bedeutung die Aufklärung des Genorts mit den entsprechenden Allelen für eine rationale und kostengünstige Typisierungsstrategie in der immunhämatologischen Routine besitzt.



Allgemeinverständlicher Überblick

Der „Rhesusfaktor“ stellt neben dem ABO-System die zweite wichtige Blutgruppeneigenschaft der menschlichen Blutzellen dar. Im klinischen Alltag ist vor allem die Rhesus-Blutgruppe D von besonderem Interesse, da sie bei Unverträglichkeiten zu starken Reaktionen des Immunsystems führen kann. So spielt das Rhesus-System eine wichtige Rolle bei Schwangerschaften, da eine Rhesus-negative Mutter, die ein Rhesus-positives Kind austrägt, Antikörper entwickelt, die bei den folgenden Schwangerschaften zu schweren Behinderungen der Kinder führen können. Die Identifizierung und Charakterisierung möglichst aller vorkommenden Versionen der Rhesus-Blutgruppe D ist daher vor allem in der Schwangerschaftsvorsorge, aber auch in der Transfusionsmedizin sehr wichtig. Durch moderne molekulare Methoden ist es möglich geworden, unter vermeintlich Rhesus-negativen Spendern einige mit „weak D“-Blut zu identifizieren, bei denen es zu Mutationen ihrer RHD-Allele gekommen ist. Das Allel ist die mutationsbedingt abweichende (alternative) Zustandsform eines Gens, das in der zuerst bekannten Konfiguration als Wildtyp = Normal-Allel bezeichnet wird. Die Träger der meisten „weak D“-Typen können kein Anti-D bilden und können folglich mit Rhesus-positivem Blut transfundiert werden. Dadurch kann der unnötige Einsatz der (sehr knappen) Rhesus-negativen Erythrozytenpräparate vermieden werden.

Summary:

The human chromosomal RH gene locus

The structure of the RH gene locus was elucidated in 2000 by the group in Ulm. The molecular structure of the RH gene locus explains the mechanisms for generating RHD/RHCE hybrid alleles and the RHD deletion. Specific detection of the RHD negative genotype is now possible.

Previous work had resolved the molecular basis of the weak D phenotype. The group concluded, that in contrast to the prevailing published dogma most, if not all, weak D phenotypes carry altered RhD proteins, suggesting a causal relationship. Their results showed means to specifically detect and to classify weak D. The genotyping of weak D may guide Rhesus negative transfusion policy for such molecular weak D types that were prone to develop anti-D.

Both results exemplify the relevance of molecular studies to improve a rational and cost-efficient typing strategy in the immunohematologic routine.

Projektkennzahlen

Förderung:	Ministry of Health, Beijing (Gastprofessur) Eigenmittel
Laufzeit:	kontinuierlich
Projektleitung:	Priv.-Doz. Dr. Willy A. Flegel
Stv. Leitung:	Priv.-Doz. Dr. Franz F. Wagner
Mitarbeiter:	Prof. Bao-an Chen, MD (Nanjing University) Dr. Alexander Frohmajer (ehemaliger Doktorand) Anita Hacker (Technische Assistentin)

Weiterführende Informationen:

Frohmajer, A.: Häufigkeit nicht-funktionaler Allele des RHD-Gens und Ursachen der fehlenden Antigen-Expression. Dissertation, Universität Ulm 2001

RHD-Deletion: www.uni-ulm.de/~wflegel/RH/RHLOC/rhloc2000.htm

Kontakt:

Priv.-Doz. Dr. med. Willy A. Flegel

Institut für Klinische
Transfusionsmedizin und
Immungenetik Ulm gGmbH

DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH
Helmholtzstraße 10
89081 Ulm

Telefon
0731 – 150 – 601

Fax
0731 – 150 – 602

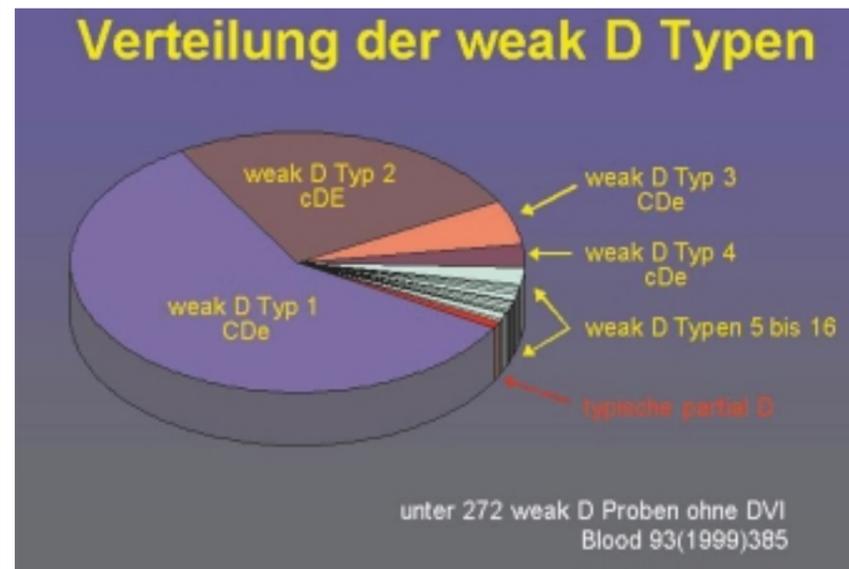
E-Mail
willy.flegel@medizin.uni-ulm.de

Standort: Ulm
Priv.-Doz. Dr. med.
Willy A. Flegel

Nationale Qualitätssicherung der derzeit empfohlenen Rhesus-Typisierungsstrategie

Ziel des Projektes:

Die Registrierung von Anti-D-Immunsierungen bei D-positiven Personen mit entsprechenden Komplikationen bei der derzeitigen Transfusionsstrategie und die Entwicklung verbesserter Typisierungs- und Transfusionsstrategien wurden als Projektziele benannt.



Hintergrund und Projektbeschreibung:

Die Arbeitsgruppe wurde von der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI) am 10. Februar 1998 mit der Führung des „Rhesus-Immunsierungs-Registers“ beauftragt. In diesem Register werden Fälle von Anti-D-Immunsierungen bei D-positiven Personen gesammelt und molekularbiologisch aufgeklärt. Das Ziel ist es, einen Überblick über mögliche Probleme bei den derzeitigen Transfusionsverfahren zu bekommen und, falls erforderlich, Vorschläge für verbesserte Typisierungs- und Transfusionsstrategien zu erarbeiten.

Die wichtigsten Ergebnisse

Im Jahre 2002 wurde nachgewiesen, dass ein erheblicher Teil von Anti-D-Immunsierungen bei D-positiven Personen durch das Partial-D-Antigen DNB bedingt ist.

Diese in Ulm entdeckte Partial-D-Form ist offensichtlich das häufigste Partial-D zumindest in Zentraleuropa. Die derzeitige D-Typisierungsstrategie führt zu D-positiven Transfusionen bei Patienten mit DNB, was die wiederholt beobachteten Anti-D-Immunsierungen erklärt. Möglichkeiten für verbesserte Typisierungsstrategien wurden evaluiert, eine kostenneutrale Lösung erscheint jedoch derzeit nicht möglich.

Standort: Ulm
Priv.-Doz. Dr. med.
Willy A. Flegel

Allgemeinverständlicher Überblick

Wegen seiner hohen Immunogenität ist das Rhesussystem von erheblicher klinischer Bedeutung, da Rh-negative Individuen (D-negativ) bei Transfusion von Rh-positivem Blut in etwa 80 Prozent der Fälle Anti-D bilden so dass es bei erneutem Kontakt zu einer Antikörperreaktion kommt, die bei Schwangerschaften und Transfusionen zu schwerwiegenden Komplikationen führt. Aus diesem Grund wird bei jeder Blutgruppenbestimmung eine Bestimmung des Rhesus-Antigens D vorgenommen, um Anti-D-Immunsierungen mit entsprechenden Komplikationen zu verhindern.

D-Antigene, die sehr schwach oder gar nicht im direkten Agglutinationstest reagieren und erst im nachfolgenden indirekten Antihumanglobulintest mit Anti-D-IgG nachweisbar sind, werden als „weak D“ (schwaches Antigen D) bezeichnet. Wichtigste Ursache ist eine Verminderung vom Antigenbindungsstellen um den Faktor 10 bis 20. Da diese „weak D“-Träger keine Anti-D-Antikörper bilden, werden sie als D-positiv bezeichnet und bekommen als Empfänger auch D-positive Erythrozyten-Präparate.

In Einzelfällen kann es jedoch auch bei D-positiven Patienten ebenfalls zu einer Anti-D-Immunsierung kommen. Hierbei handelt es sich um Patienten mit partiellem D, vereinfacht gesagt, es fehlt ein Stück von Antigen D. Obwohl diese Patienten als D-positiv diagnostiziert werden, können sie Anti-D bilden, so dass es hier zu den bekannten Komplikationen bei Schwangerschaft (siehe „Aufklärung des Allel-Polymorphismus im Rhesus-Blutgruppensystem“) aber auch zu schweren hämolytischen Transfusionsreaktionen (Abbau von Erythrozyten) kommen kann. Umso wichtiger sind die Identifizierung solcher Partial-D-Antigene und die Entwicklung geeigneter Verfahren zum Nachweis beim Patienten.

Summary:

National quality assurance for the recommended serologic Rhesus typing Strategy

In 2002 the group published evidence that a relevant fraction of all immunizations with anti-D occurring in D positive transfusion recipients could be traced to carriers of the partial D DNB.

This partial D discovered in Ulm represents the most frequent partial D at least in Central Europe. The current D typing strategy results in D positive transfusions in patients with DNB, which explains the repeatedly observed anti D immunizations.

Projektkennzahlen

Förderung:	Eigenmittel
Laufzeit:	2/1998 bis 12/2004
Projektleitung:	Priv.-Doz. Dr. Willy A. Flegel
Stv. Leitung:	Priv.-Doz. Dr. Franz F. Wagner
Mitarbeiter:	Anita Hacker (Technische Assistentin)

Weiterführende Informationen:

Rhesus Immunsierungsregister: www.uni-ulm.de/~wflegel/RH/RIR/

Kontakt:

Priv.-Doz. Dr. med. Willy A. Flegel

Institut für Klinische
Transfusionsmedizin und
Immunogenetik Ulm gGmbH

DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH
Helmholtz 10
89081 Ulm

Telefon
0731 – 150 - 601

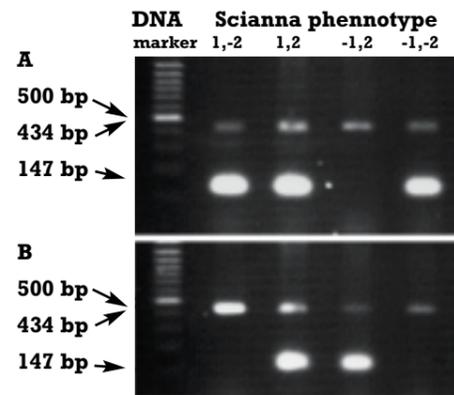
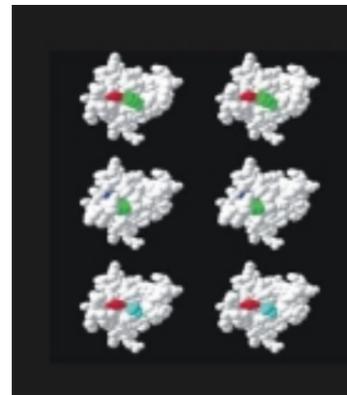
Fax
0731 – 150 - 602

E-Mail
willy.flegel@medizin.uni-ulm.de

Molekulare Basis von Blutgruppen-Systemen

Ziel des Projektes:

Die molekulare Basis von Antigenen und Blutgruppen-Systemen soll bestimmt werden.



Hintergrund und Projektbeschreibung:

Die Arbeitsgruppe befasst sich mit der Charakterisierung der molekularen Basis von Blutgruppensystemen und bisher nicht zugeordneter Blutgruppen-Antigene. Dies hat sowohl für die Grundlagenforschung als auch für die Anwendung große Bedeutung, da hierdurch neue Einblicke in die Funktion der Proteine der Erythrozytenmembran möglich und damit Voraussetzungen für eine Genotypisierung geschaffen werden.

Die molekulare Basis der Scianna-Blutgruppe ist das ERMAD-Gen (erythrocyte membrane associated protein). Dazu wurde das ERMAD-Gen von Probanden mit bekannten Scianna- und Radin (Rd)- Phänotypen sequenziert. Es zeigte sich, dass die Antigene der Scianna-Blutgruppe, zu denen nunmehr auch Rd gehört, durch Allele des ERMAD-Gens exprimiert werden. Die Forschungsergebnisse der Arbeitsgruppe erlaubten Einblicke in die Bedeutung und Funktion des ERMAD-Adhäsionsproteins durch den überraschenden Nachweis, dass ERMAD-Nullphänotypen klinisch weitgehend asymptomatisch bleiben.

Die wichtigsten Ergebnisse

Es wurde der Nachweis erbracht, dass das Scianna-Blutgruppensystem auf Polymorphismen des ERMAD-Proteins beruht.

Darüber hinaus konnte bewiesen werden, dass das bisher nicht zugeordnete Antigen Rd zum Scianna-Blutgruppensystem gehört.

Allgemeinverständlicher Überblick

Neben den beiden großen Blutgruppensystemen ABO- und Rhesus-System gibt es zahlreiche, sehr viel weniger bekannte Blutgruppensysteme wie Lewis-, Kell-, Duffy-, Kidd-System u.a. Bis heute sind mehr als 600 Blutgruppenantigene beschrieben worden. Die Bedeutung der Blutgruppenantigene und der Blutgruppensysteme hängt von der Häufigkeit des Vorkommens (Allel-Frequenz) und der Immunogenität ab. Mit Immunogenität ist die Fähigkeit gemeint, in einem „fremden Individuum“ die Bildung von Alloantikörpern und eine Zerstörung der Erythrozyten auszulösen. Man unterscheidet zwischen „high-frequency antigens“, die bei über 99 Prozent der Bevölkerung und „low-frequency antigens“, die bei weniger als 1 Prozent der Bevölkerung vorkommen. Die meisten der hoch-frequent vorkommenden Antigene verursachen keine akute hämolytische Transfusionsreaktion, jedoch eine verkürzte Erythrozyten-überlebenszeit. Wird bei einer Verträglichkeitsprobe ein Antikörper gegen diese hochfrequenten Antigene gefunden, muss die transfusionsmedizinische Bedeutung geklärt werden. In die Gruppe dieser hoch-frequenten Antigene gehört auch ein Antigen des Scianna-Blutgruppensystems. Nachgewiesen wurde nun, dass dieses Scianna-Blutgruppensystem auf Polymorphismen, also Mutationen des ERMAD-Proteins beruht. ERMAD steht für „erythrocyte membrane associated protein“, d.h., dass das Protein in der Membran der roten Blutzellen vorkommt.

Summary:

Molecular basis of blood group systems

The antigens of the Scianna blood group include Rd and are expressed by the human ERMAD protein. Scianna is the last of the previously characterized protein-based blood group systems whose molecular basis was discerned. Hence, the phenotype prediction by genotyping became possible for all human blood group systems encoded by proteins.

Projektkennzahlen

Förderung:	Eigenmittel
Laufzeit:	1.1.2002 – 31.12.2002
Projektleitung:	Priv.-Doz. Dr. Willy A. Flegel
Stv. Leitung:	Priv.-Doz. Dr. Franz F. Wagner
Mitarbeiter:	Hedwig Teubl (Technische Assistentin)

Weiterführende Informationen:

Scianna-Blutgruppe: www.jove.prohosting.com/~scarfex/blood/13.html

Kontakt:

Priv.-Doz. Dr. med. Willy A. Flegel

Institut für Klinische
Transfusionsmedizin und
Immungenetik Ulm gGmbH

DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH
Helmholtzstraße 10
89081 Ulm

Telefon
0731 – 150 - 601

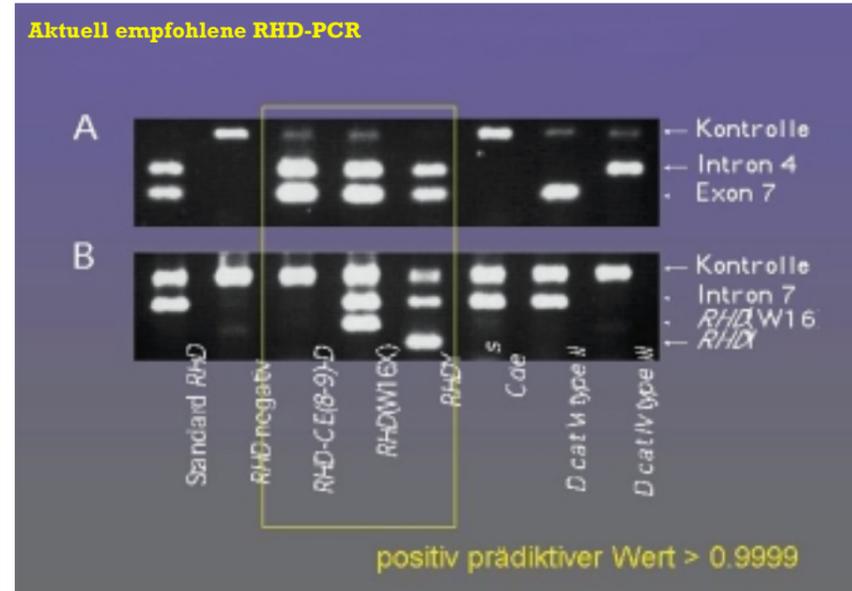
Fax
0731 – 150 - 602

E-Mail
willy.flegel@medizin.uni-ulm.de

Entwicklung praxisgerechter Verfahren zur Genotypisierung von Blutgruppen

Ziel des Projektes:

Weitere Verfahren zur verbesserten DNA-Typisierung von Blutgruppen sollen entwickelt werden. Fernziel ist die Etablierung praxisgängiger Methoden für die preiswerte Massenuntersuchung, die eine Bestimmung der transfusionsrelevanten Antigene zulassen. Ein wesentlicher Aspekt hierbei ist die Erfassung seltener Varianten auch in anderen als dem Rhesus-Blutgruppensystem.



Hintergrund und Projektbeschreibung:

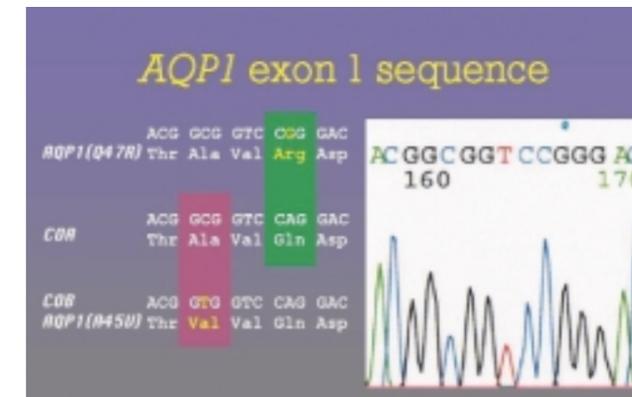
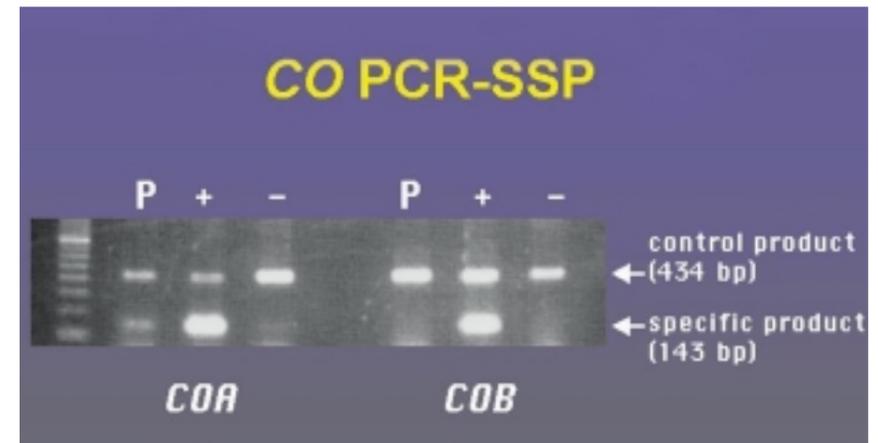
Die Aufklärung der molekularen Ursachen der Blutgruppenantigene erlaubt deren Vorhersage aus der Nukleinsäure (DNA). Derartige Genotypisierungsverfahren sind serologischen Methoden in mehrerer Hinsicht überlegen. Zum einen kann Material benutzt werden, das für serologische Methoden ungeeignet ist (Fruchtwasser oder peripheres Blut der Mutter zur Bestimmung der Blutgruppe eines Fötus). Zum anderen wird die Aussagekraft des Tests nicht durch serologische Probleme wie massive Transfusionen oder Autoimmunhämolysen beeinträchtigt. Darüber hinaus ist die Empfindlichkeit für den Nachweis klinisch relevanter schwacher Antigene zum Teil dramatisch erhöht. Schließlich wird die Erkennung und Unterscheidung der Allele nicht durch das Fehlen geeigneter oder die Verwendung kostspieliger Antikörper eingeschränkt.

Von der Arbeitsgruppe werden regelmäßig PCR-Methoden zum einfachen Nachweis von Blutgruppenantigenen entwickelt. Solche Methoden sind für zahlreiche Blutgruppensysteme etabliert und werden fortlaufend weiterentwickelt. Einige Anti-D-Immunisierungen bei den Transfusionsempfängern mit den damit verbundenen Komplikationen hätten durch PCR-Testung vermieden werden können. Dies hat dazu geführt, dass dieser Test in die Spendertypisierung integriert wurde.

Die wichtigsten Ergebnisse

Die Gruppe identifizierte ein klinisch relevantes, neues Colton-Allel. Allein im Jahr 2002 wurden PCR-Methoden zum einfachen Nachweis der Blutgruppenantigene Sc1, Sc2, Rd und DAU entwickelt.

Standort: Ulm
Priv.-Doz. Dr. med.
Willy A. Flegel



Allgemeinverständlicher Überblick

Die Entwicklung von Methoden zum einfachen Nachweis von Blutgruppenantigenen aus DNA-Proben bietet, wie oben beschrieben, große Vorteile gegenüber den serologischen Verfahren, bei denen die Bestimmung aus dem Blutserum heraus erfolgt. Durch diese Form der Genotypisierung wird es möglich, schnell und preiswert eine große Anzahl klinisch relevanter Antigene nachzuweisen. Das Verfahren, das Grundlage der Arbeit dieser Arbeitsgruppe ist, ist die „Polymerase-Kettenreaktion“, kurz „PCR“ („polymerase chain reaction“). Bei diesem Verfahren wird die DNA enzymatisch vermehrt, um aus wenig Probenmaterial in Stunden genügend Material für die genetische Analyse der Nukleinsäure-Sequenz zu gewinnen. In den nächsten Jahren soll diese DNA-Typisierung weiter vorangetrieben werden, um eine Methode für die preiswerte Massenuntersuchung zu entwickeln. So soll es möglich werden, kostengünstig und schnell auf alle transfusions-relevanten Antigene zu testen, um Komplikationen durch Antikörperreaktionen zu verhindern.

Summary:

Development of routine tests for blood group genotyping purposes

The group identified a clinically relevant, new Colton allele. In 2002 alone, PCR-methods for the ready molecular diagnostics of the blood group antigens Sc1, Sc2, Rd and DAU were devised.

Projektkennzahlen

Förderung:	Eigenmittel, ab 2003 BloodGen EU-Förderung
Laufzeit:	kontinuierlich
Projektleitung:	Priv.-Doz. Dr. Willy A. Flegel
Mitarbeiter:	cand. med. Marco Neß (Doktorand) Marianne Lotsch (Technische Assistentin)

Kontakt:

Priv.-Doz. Dr. med. Willy A. Flegel

Institut für Klinische
Transfusionsmedizin und
Immunogenetik Ulm gGmbH

DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH
Helmholtzstraße 10
89081 Ulm

Telefon
0731 – 150 - 601

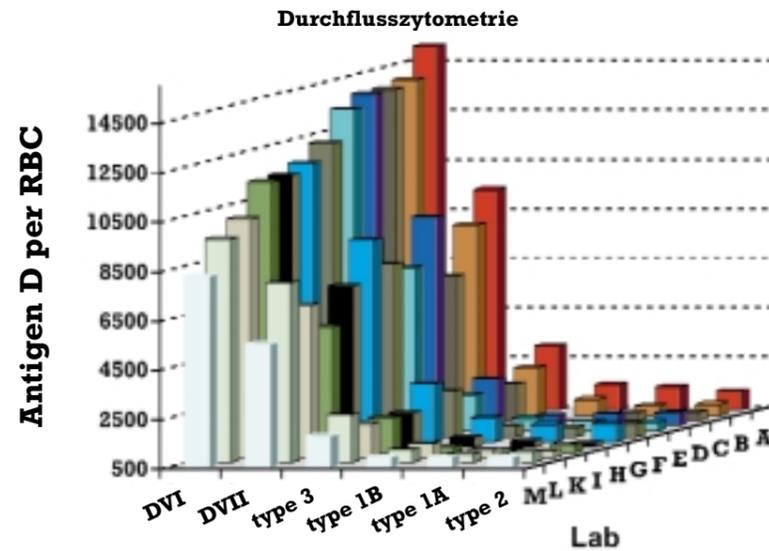
Fax
0731 – 150 - 602

E-Mail
willy.flegel@medizin.uni-ulm.de

Durchflusszytometrie zur Beschreibung des Erythrozyten-Phänotyps

Ziel des Projektes:

Eine quantitative Messung unterschiedlicher Phänotypen für unterschiedliche Partial-D-Allele und weak-D-Allele soll mittels Durchflusszytometrie standardisiert und das Verfahren auf andere Proteine der Erythrozytenmembran ausgeweitet werden.



Hintergrund und Projektbeschreibung:

Die Untersuchung von Blutgruppenantigenen mittels Durchflusszytometrie bietet gegenüber klassischen serologischen Verfahren den Vorteil einer direkten quantitativen Messung. Das Verfahren wurde von der Arbeitsgruppe weitgehend standardisiert und zum Nachweis unterschiedlicher Phänotypen verschiedener Partial-D-Allele und weak-D-Allele genutzt. Partial-D-Phänotypen weisen veränderte RhD-Proteine auf, die sich soweit vom normalen RhD unterscheiden, dass eine Bildung von Allo-Anti-D möglich wird, bzw. sie mit einigen monoklonalen Anti-D-Reagenzien nicht reagieren. Drei Arten molekularer Ursachen wurden gefunden: RHD/CE-Hybridallele sowie einzelne oder mehrere Aminosäureaustausche in den extrazellulären Proteinsegmenten.

Die wichtigsten Ergebnisse

Die Arbeitsgruppe koordinierte die Sektion RH Flow Cytometry im 4th International Workshop on Monoclonal Antibodies Against Human Red Blood Cells and Related Antigens, 19. – 21. Juli 2001 in Paris. Im Rahmen dieser internationalen Kooperation wurde die Reproduzierbarkeit des von dieser Arbeitsgruppe gewählten Ansatzes eindrucksvoll bestätigt. Es zeigte sich eine außerordentlich gute Übereinstimmung der zuvor bestimmten Antigendichten mit den weltweit reproduzierten. Auch die qualitativen Veränderungen des D-Antigens konnten nachvollzogen werden.

Allgemeinverständlicher Überblick

Bei der Untersuchung von Blutgruppenantigenen ist es nicht nur wichtig zu klären, welche Antigene im Blut vorkommen, sondern von Bedeutung ist auch die Frage, in welcher Menge bestimmte Antigene vorkommen. Um eine quantitative Bestimmung von Blutgruppenantigenen zu ermöglichen, muss das Verfahren standardisiert sein und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sichergestellt werden.

Der Arbeitsgruppe ist es gelungen, das Verfahren der Durchflusszytometrie weitgehend zu standardisieren und zum Nachweis unterschiedlicher Phänotypen für unterschiedliche Partial-D-Allele und weak-D-Allele nutzbar zu machen.

Bei der Durchflusszytometrie werden kontinuierlich zelluläre Parameter wie Volumen, Fluoreszenz nach Antikörpermarkierung, Bestimmung des Chromatins (DNA und Eiweiße im Zellkern) oder Absorption von Einzelzellen einer Zellsuspension gemessen, die durch eine Messeinrichtung strömt. Die Einzelimpulse werden elektronisch verarbeitet und können bei entsprechender Standardisierung zur Quantifizierung herangezogen werden.

Summary:

Flow cytometry for characterization of red cell phenotypes

The group coordinated the Section RH Flow Cytometry of the 4th International Workshop on Monoclonal Antibodies Against Red Blood Cells and Related Antigens, held 19th to 21st July 2001 in Paris. Within this international cooperation the reproducibility of the anti-gen D density determination previously published by the group was confirmed. An impressive correlation of the antigen densities could be shown among the various laboratories distributed world wide. In addition, qualitative variations of the antigen D could be confirmed as well.

Projektkennzahlen

Förderung:	Eigenmittel
Laufzeit:	1.1.1999 – 31.7.2001
Projektleitung:	Priv.-Doz. Dr. Willy A. Flegel
Stv. Leitung:	Priv.-Doz. Dr. Franz F. Wagner
Mitarbeiter:	Dr. Bernd Witter (ehemaliger Doktorand) cand. med. Fabricio Lupo (Doktorand) Hedwig Teubl (Technische Assistentin)

Weiterführende Informationen:

4th International Workshop on Monoclonal Antibodies Against Human Red Blood Cells and Related Antigens: www.uni-ulm.de/~wflegel/RH/Paris2001/

Kontakt:

Priv.-Doz. Dr. med. Willy A. Flegel

Institut für Klinische
Transfusionsmedizin und
Immungenetik Ulm gGmbH

DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH
Helmholtzstraße 10
89081 Ulm

Telefon
0731 – 150 - 601

Fax
0731 – 150 - 602

E-Mail
willy.flegel@medizin.uni-ulm.de

„Die Forschung an Stammzellen steht ungeachtet vielversprechender Ergebnisse in weiten Bereichen noch am Anfang. Viele wichtige Fragen zur Biologie und zum Potenzial embryonaler, fetaler und adulter Stammzellen sowie der Stammzellen aus Nabelschnurblut sind bisher nicht beantwortet. Dies betrifft insbesondere auch eine Abschätzung der klinischen Möglichkeiten, die durch den Einsatz der verschiedenen Stammzelltypen verwirklicht werden könnten.“

Stellungnahme der Zentralen Ethikkommission bei der Bundesärztekammer zur Stammzellforschung (2002)

Stammzelltransplantation und experimentelle Zelltherapie

Klassische Methoden der Tumorbekämpfung sind die Operation, die Chemo- und die Strahlentherapie. Die wirksamste Waffe gegen Krebs ist aber die körpereigene Immunabwehr. Krebszellen werden an bestimmten Oberflächenproteinen erkannt und können, beispielsweise durch natürliche Killerzellen, abgetötet werden. Da die Tumorbildung nicht wie eine Infektion durch fremde Erreger wie Bakterien oder Viren, sondern durch veränderte körpereigene Zellen ausgelöst wird, werden manche Tumore nur schwer vom Immunsystem erkannt und können so ungehindert wachsen.

Die zelluläre Immuntherapie ist eine neue, in der Entwicklung befindliche Art der Tumorbekämpfung. Ziel ist es, dem Patienten eigene Zellen, Spenderzellen oder Zellen aus der Zellkultur zu übertragen, um die Immunabwehr zu unterstützen. Da Tumorzellen oftmals Mechanismen entwickeln, mit denen sie der körpereigenen Immunantwort entkommen, wird außerdem daran gearbeitet, immunologische Effektorzellen, wie z.B. T-Killerzellen und natürliche Killerzellen spezifisch auf eine Tumorzelle zu richten, indem man die Zelltherapien mit Antikörperbasierten Techniken verbindet.

Immunzellen von Patienten sind oftmals durch Bestrahlung und Chemotherapie so vorgeschädigt, dass sie für eine Immuntherapie nicht geeignet sind. Vor diesem Hintergrund gibt es Bestrebungen, Zelllinien für den Einsatz als adoptive zelluläre Immuntherapie zu entwickeln. Dies würde den Vorteil bieten, dass sich ein standardisiertes zelluläres Produkt unter definierten Bedingungen herstellen ließe, welches allen Patienten – unabhängig von der Vorschädigung ihres Immunsystems – zugänglich gemacht werden könnte. Eine viel versprechende Linie stellt hier die

NK-Zelllinie NK-92 dar. NK-92 lassen sich stabil über Jahre in der Kultur halten und zeigen dennoch eine überaus hohe Aktivität gegen verschiedene Tumore. NK-92-Zellen zeigen in verschiedenen Studien eine gute Wirkung gegen Tumore, wie z. B. den bösartigen Hautkrebs, das Nierenzellkarzinom und verschiedene Arten von Blutkrebs.

Krebszellen werden vom Immunsystem anhand spezifischer Oberflächenstrukturen, den Antigenen, erkannt. Dendritische Zellen präsentieren diese Antigene und aktivieren T-Zellen, die die Tumorzellen, die solche Antigene tragen, zerstören. Sind diese Antigene bekannt, können mit ihrer Hilfe Impfstrategien gegen einzelne Tumore entwickelt werden. Derzeit werden verschiedene leukämie- und tumorassoziierte Antigene getestet und dendritische Zellen zur Vakzinierung und Behandlung von Patienten mit Leukämie klinisch eingesetzt. Dendritische Zellen, die mit Tumorantigenen beladen sind, können eine gegen den Tumor gerichtete T-Zellantwort auslösen und somit eine Tumorregression induzieren. Wesentlich für diesen Ansatz ist die Optimierung der Gewinnung und Herstellung von dendritischen Zellen. Bei einem der in der Entwicklung befindlichen Verfahren sollen dendritische Zellen aus ihren nahen Verwandten, den Blutmonozyten generiert werden. Blutmonozyten lassen sich – im Gegensatz zu den relativ seltenen dendritischen Zellen – in großen Mengen aus dem peripheren Blut durch Apherese gewinnen. Diese Monozyten können dann mit etablierten Verfahren in vitro zu den für eine Vakzinierung geeigneten dendritischen Zellen differenziert werden.

Auch bei der allogenen Stammzelltransplantation, d.h. der Übertragung von Knochenmark von einem Spender auf einen Empfänger zur Rekonstitution des blutbildenden Systems nach Hochdosis-Chemotherapie, trägt das Immunsystem in einem großen Maße zur Bekämpfung der zugrunde liegenden Leukämie bei. Die hierbei von T-Zellen ausgehende Immunreaktion ist jedoch nicht nur, wie oben beschrieben, auf spezifische Tumorantigene gerichtet, sondern geht vielmehr mit einer Reaktion von HLA-Klasse-I-Antigenen auf den Zellen des Empfängers einher. Dies bedeutet, dass man Gefahr läuft, neben dem gewollten Spender-gegen-Leukämie (GvL)-Effekt auch eine ungewollte Spender-gegen-Empfänger-Erkrankung (GvHD) zu induzieren. Da die Spenderreaktion gegen patienteneigene HLA-Antigene durch T-Zellen vermittelt wird, werden Verfahren angewendet, mit denen sich diese Zellen aus einem Stammzellpräparat entfernen lassen. In klinischen Studien wird darüber hinaus untersucht, inwieweit sich nach Depletion der Zellen trotzdem ein Rezidiv der Leukämie vermeiden lässt, wenn nach Transplantation spezifische T-Zellsubgruppen oder Killerzellen gegeben werden.

Blutstammzellen zur Transplantation nach z.B. Hochdosis-Chemotherapie lassen sich aus verschiedenen „Quellen“ gewinnen. Sie kommen normalerweise im menschlichen Knochenmark vor. Durch in jüngster Zeit entwickelte Wachstumsfaktoren kann man sie jedoch auch dazu anregen, in die Blutbahn einzutreten. Hier lassen sie sich dann mittels besonderer Techniken, wie z.B. der Zellapherese gewinnen. Neben dem Knochenmark ist auch das Nabelschnurblut eine Quelle von Blutstammzellen, deren Transplantation bei bestimmten Indikationen das blutbildende Organ erfolgreich rekonstituieren kann.

Obwohl bereits erste Transplantationen von Nabelschnurblutzellen durchgeführt wurden, befindet sich dieses zukunftsreiche Verfahren noch in der Entwicklungsphase. Insbesondere die Optimierung der Isolierung, Lagerung und Vermehrung solcher Stammzellen aus Nabelschnurblut steht dabei im Zentrum der Arbeiten. So kann beispielsweise mittels eines neuartigen Leukozytenfilters das Volumen von Proben ohne Minderung des Potenzials zur hämatopoetischen Rekonstitution reduziert werden. Um den Verlust von transplantierbaren Zellen beim Auftauen eingefrorener Proben zu verringern, werden derzeit Verfahren entwickelt und evaluiert, die die Aggregatbildung der Zellen beim Auftauvorgang verhindern. Darüber hinaus stellt auch die ex vivo

Vermehrung von Stammzellen und die Implementierung von Standards zur Überprüfung der Qualität solcher Zellen eine der zentralen Herausforderungen dar, an denen zur Zeit intensiv gearbeitet wird.

Über die unterschiedlichen Eigenschaften der Blutstammzellen aus Knochenmark, peripherem Blut oder Nabelschnurblut, ist bisher nur wenig bekannt. Ein besonderes Interesse gilt jedoch der Untersuchung von Faktoren, die das „Homing“ dieser Blutstammzellen beeinflussen können. Homing beschreibt das Vermögen der Blutstammzellen, nach einer Transplantation in das Knochenmark des Empfängers zu wandern und sich dort anzusiedeln. Eine Ansiedlung der Stammzellen im Knochenmark des Empfängers ist Voraussetzung für eine schnelle und komplikationsfreie Rekonstitution des blutbildenden Organs. Hierzu wird in Zellkultur und Mausmodellen der Einfluss einzelner Faktoren auf das Migrationsverhalten von Blutstammzellen untersucht. Ziel ist es letztlich, die Transplantation von Stammzellen effektiver zu gestalten, indem man gewährleistet, dass möglichst viele Stammzellen zum Knochenmarkersatz beitragen.

Die Möglichkeiten von Stammzellen sind nicht auf die Blutbildung beschränkt. Man hofft, in Zukunft Zellen der unterschiedlichsten Organe aus Blutstammzellen ausdifferenzieren zu können. Die Entwicklung von Verfahren, die die Isolierung und Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen aus Knochenmark für den Ersatz von Knochen oder Muskeln erlauben, ist daher auch ein wichtiger Forschungsschwerpunkt des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen.

Stammzellbiologie

Standort: Frankfurt

Projektleitung: Dr. med. Reinhard Henschler

Studium

1979 – 1987 Studium der Humanmedizin in Würzburg und Mainz

1987 Staatsexamen

1989 Dissertation

Berufliche Tätigkeit

1987 – 1992 wissenschaftliche Tätigkeit auf dem Gebiet der Experimentellen Hämatologie, Universitätsklinik Mainz und Universität Manchester

1992 – 1995 Laboratoriumsmedizin, Universitätsklinik Freiburg

1995 – 1999 Oberarzt und Leiter des Stammzellenlabors sowie Herstellungsleiter nach AMG, Studien zur ex vivo-Expansion humaner

Stammzellen, erstmaliger Einsatz solcher Zellen in Deutschland, Produktion von Stammzellpräparaten, Universitätsklinik Freiburg

seit 1999

Abteilungsleiter Produktion, Etablierung der Forschungsgruppe „Stammzellbiologie“

Sonstiges

- Gutachter für zahlreiche internationale hämatologische Zeitschriften
- Mehrere Patente für neue Anwendungen in der Zelltherapie



**Projektleitung:
Dr. med.
Reinhard Henschler**

Die Frankfurter Arbeitsgruppe - Stammzellbiologie - möchte einen Beitrag zu einem besseren Verständnis und einer effizienteren Nutzung der Mechanismen des sogenannten Homing im Blut zirkulierender transplantierte Stammzellen in ihre Zielorgane leisten. Bis heute stellt die intravenöse Applikationsart die beste Möglichkeit der Stammzelltherapie dar, zumindest im Falle von Blutstammzellen. Allerdings erreichen nur etwa 5 bis 20 % der transplantierten Stammzellen ihr Zielorgan und hieraus resultierendes Therapieversagen stellt ein Problem dar, insbesondere wenn die Zellen vor der Transplantation in vitro manipuliert werden. Wir möchten unsere Kenntnisse über extrazelluläre Signale, intrazelluläre Signalweiterleitung und nukleäre Aktivierungsmuster von Zellmigrationsmechanismen einsetzen, um eine bessere therapeutische Funktion der transplantierten Zellen zu erreichen. Auf diese Weise möchten wir zur Etablierung intelligenterer und effizienterer Produkte in der modernen Zelltherapie beitragen.

Working Group: Stem Cell Biology Dr. med. Reinhard Henschler, head

The 'Stem Cell Biology Group', Frankfurt, wishes to contribute to a better understanding and an improved clinical utilization of the mechanisms which govern the homing process of stem cells circulating in blood. To date, the intravenous route of application, at least for hematopoietic stem cells, constitutes the most efficient way of stem cell therapy. Yet only about 5 to 20 per cent of transplanted cells reach their target organs. We aim to utilize our knowledge on extracellular factors, intracellular signal transduction pathways, and nuclear reprogramming patterns in order to influence the migration and homing behaviour of cells used for therapy. This should lead to better guidance of transplanted stem cells to the places in the organism where they are needed, and thus contribute to more sophisticated and more efficient modern cellular therapeutics.

Experimentelle Zelltherapie

Standort: Frankfurt

Projektleitung: Dr. med. Torsten Tonn

Studium

1984 – 1991 Studium der Humanmedizin in Düsseldorf

1991 Staatsexamen

1996 Dissertation

Berufliche Tätigkeit

1991 – 1994 Abteilung Immunologie, Medizinisches Institut für Umwelthygiene, Düsseldorf

1994 – 1996 Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, DRK-Blutspendedienst Hessen

1996 – 1997 Terry Fox Laboratory, British Columbia Cancer Agency, Vancouver, Kanada

1997 – 1998 Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, DRK-Blutspendedienst Hessen

1999 – 2000 Chemotherapeutisches Forschungsinstitut, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main

seit 2001 Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen, Frankfurt am Main

seit 2002 Abteilungsleiter GMP-Herstellung spezieller Zellprodukte

Sonstiges

- Gründungsmitglied Interdisziplinäre Gruppe für Labormedizin und Durchflusszytometrie (IGLD)
- Experte in der „Coordinated Research Study - Safety of Cellular Immune Therapies - Council of Europe“



**Projektleitung:
Dr. med.
Torsten Tonn**

Die Arbeitsgruppe von Prof. Seifried, geleitet von Dr. Tonn, versucht, zelluläre Therapien zu entwickeln, wobei der Schwerpunkt der Arbeiten auf der Entwicklung einer Strategie zur Therapie der Hämophilie A (Bluterkrankheit) mit gentechnisch veränderten Blutstammzellen beruht. Die Therapie der Hämophilie A beruht bisher im Wesentlichen auf einer kontinuierlichen Substitution des fehlenden oder defekten FaktorVIII-Gerinnungsfaktors. Aufgrund der monogenetischen Ursache und des einfachen zu messenden Therapieerfolges stellt die Hämophilie ein attraktives Erkrankungsbild für einen gentherapeutischen Ansatz dar. Die Arbeitsgruppe hat es sich zum Ziel gemacht, einen Ansatz auszuarbeiten, bei dem das FVIII-Protein durch gentechnisch manipulierte hämatopoetische Blutstammzellen substituiert werden soll. Um dieses Projekt effizient verfolgen zu können, konnte die Arbeitsgruppe von Dr. Manuel Grez im Georg-Speyer-Haus in Frankfurt als Kooperationspartner gewonnen werden. Ein zweites Projekt ist die Etablierung einer Immunzelllinie (Natürliche Killerzelllinie NK-92) als zelluläres Therapeutikum für maligne Erkrankungen. Der von der Arbeitsgruppe verfolgte Therapieansatz bösartiger Erkrankungen beruht auf der Entdeckung und Isolierung einer natürlichen Killerzelllinie von einem Patienten im Jahre 1992 durch Prof. Dr. Hans-G. Klingemann am kanadischen Krebsforschungszentrum in Vancouver, Kanada, mit dem fortdauernd eine enge Kooperation besteht.

Working Group: Experimental Celltherapy Dr. med. Torsten Tonn, head

The group of Prof. Dr. Ehrhard Seifried, headed by Dr. Torsten Tonn, is developing cellular therapies for inherited diseases, such as hemophilia A, as well as immune therapies of malignancies. With regard to hemophilia the group is focusing on the development of gene therapeutic approaches, employing hematopoietic stem cells and their progeny as target cells for the recombinant expression of the coagulation factor VIII. Current treatment options for hemophilia involve the substitution of the missing factor VIII protein by transfusion of plasma derived or recombinant FVIII preparations. However, due to its well characterized genetic defect hemophilia is an appealing disease for gene therapeutic approaches. The group has established a close collaboration with Dr. Manuel Grez from the Biomedical Research Institute Georg-Speyer-Haus in Frankfurt. In addition to gene therapy of hemophilia, the group is also engaged in the establishment of a natural killer cell line (NK-92) for adoptive cellular immunotherapy of malignancies. NK-92 cells have been isolated and established as a continuously growing cell line by Prof. Dr. Hans-G. Klingemann at the British Columbia Cancer Agency in Vancouver. NK-92 cells have been shown to have substantial anticancer activity in immunodeficient mice, and are currently tested in phase I/II clinical trials. With regard to this project, the group has close cooperations with Prof. Dr. Hans-G. Klingemann (Chicago, USA) and partners at the Johann Wolfgang Goethe University in Frankfurt

Dendritische Zellen

Standort: Mannheim

Projektleitung: Dr. med. Xuan-Duc Nguyen

Studium

1987 – 1994 Studium der Medizin in Tübingen

1994 Staatsexamen

1997 Promotion

Berufliche Tätigkeit

1996-1998 Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Inneren Medizin im Städtischen Klinikum Pforzheim

seit 1998 Tätigkeit als Assistenzarzt im Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie, Fakultät für

Klinische Medizin Mannheim, Universität Heidelberg, DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen

2003 Facharzt für Transfusionsmedizin

Sonstiges

Wissenschaftliche Schwerpunkte im Bereich der Immuntherapie, der Etablierung von Techniken zur Gewinnung von dendritischen Zellen (DC) aus Vorläuferzellen sowie von Methoden zur funktionalen Qualitätsuntersuchung

Dr. med. Xuan-Duc Nguyen, Facharzt für Transfusionsmedizin, und Günter Gerlich, Medizinisch-Technischer Assistent, Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie, Fakultät für klinische Medizin Mannheim, Universität Heidelberg, Friedrich-Ebert-Str.107, 68167 Mannheim.

Working Group: Dendritic Cells Dr. med. Xuan-Duc Nguyen, head

Dr. med. Xuan-Duc Nguyen, Consultant, and Günter Gerlich, Technician, Institute of Transfusion Medicine and Immunology, Faculty of Clinical Medicine Mannheim, University Heidelberg, Friedrich-Ebert-Str.107, 68167 Mannheim.



**Projektleitung:
Dr. med.
Xuan-Duc Nguyen**



Projektleitung:
Priv.-Doz. Dr. med.
Hermann Eichler

Stammzellen aus Nabelschnurblut

Standort: Mannheim

Priv.-Doz. Dr. med. Hermann Eichler, Leiter

Studium

1982 – 1989 Studium der Humanmedizin in Würzburg

1989 Staatsexamen

1990 Dissertation

2002 Habilitation

Berufliche Tätigkeit

seit 1999 Leitender Oberarzt und Herstellungsleiter am Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen, Mannheim

Sonstiges

1996 Facharzt für Transfusionsmedizin

Forschung in den Bereichen Aufbau der allogenen Nabelschnurblutbank, Etablierung von Techniken zur Prozessierung und Expansion von hämatopoetischen und mesenchymalen Stammzellen aus Nabelschnurblut sowie Methoden zur Qualitätsuntersuchung von Stammzell-Präparationen.

Diese Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit der Gewinnung und arzneimittelrechtlich-konformen Verarbeitung und Lagerung von hämatopoetischen Stammzellen aus Nabelschnurblut zur Transplantation. Im Mittelpunkt des Projektes steht die Entwicklung von präparativen Methoden zur optimierten Gewinnung und Aufarbeitung von Plazentarestblut-Transplantaten, wobei besonderes Gewicht auf eine möglichst hohe Ausbeute und Qualität der hämatopoetischen Zellen gelegt wird. Eine weitere von der Arbeitsgruppe ausgehende multizentrische Studie zur Wertigkeit von Qualitätskontroll-Untersuchungen bei Stammzell-Präparationen soll zeigen, ob eine Vergleichbarkeit von bei Stammzellpräparationen eingesetzten QK-Parametern (z. B. CD34-Quantifizierung, Colony assay etc.) gegeben ist, und ggf. Vorschläge zu einer Harmonisierung der Testungen erarbeiten. Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit der Isolierung und in vitro-Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (MSCs) aus Nabelschnurblut.

Der Arbeitsgruppe Nabelschnurblut um Priv.-Doz. Dr. med. Hermann Eichler, Facharzt für Transfusionsmedizin, Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie, Mannheim, gehören Dr. rer. nat. Karen Bieback, Diplom-Biologin, Postdoc; Susanne Kern, Diplom-Biologin, Doktorandin; Christian Beck, Arzt, Doktorand; Ayse Günaydin, Diplom-Biotechnologin, und Monika Latta, Medizinisch-Technische Assistentin, an.

Working Group: Stem Cells from Umbilical Cord Blood

Priv.-Doz. Dr. med. Hermann Eichler, head

The group works on the development of methods for the processing and clinical use of cord blood stem and progenitor cells. The major goal is to test for new techniques that meet the guidelines laid out under good manufacturing practice (GMP) in order to obtain a high quality blood component for further cell manipulation, such as expansion or selection of hematopoietic and non-hematopoietic stem cells. In addition, the validity of in vitro assays to assess the quality of hematopoietic stem cell products as well as to evaluate processing and storage conditions are studied in international trials. The working group also deals with the issue multipotent mesenchymal stem cells cord blood, and ongoing investigations to define optimized conditions for the isolation of these cells out of cord blood and their possible impact in hematopoietic stem cell transplantation have been performed.

Priv.-Doz. Dr. med. Hermann Eichler, Consultant, Institute of Transfusion Medicine and Immunology, Red Cross Blood Service of Baden-Württemberg – Hessen, Faculty of Clinical Medicine Mannheim, University of Heidelberg; Dr. rer. nat. Karen Bieback, Biologist, Postdoc; Susanne Kern, Biologist, Doctoral candidate; Christian Beck, Physician, Doctoral candidate; Ayse Günaydin, Biotechnologist; Monika Latta, Technician.

Zelluläre Immuntherapie und Stammzelltransplantation

Standort: Ulm

Dr. med. Markus Wiesneth, Leiter

Studium

1972 - 1978 Studium der Humanmedizin in Ulm

1978 Staatsexamen

1978 Dissertation

Berufliche Tätigkeit

1978 - 1988 wissenschaftlicher und klinischer Assistent, Universitätsklinik Ulm

Seit 1988 Leiter der Blutspende- und Aphereseabteilung der DRK-Blutspendezentrale Ulm und der Abteilung Transfusionsmedizin der Universität Ulm

Seit 1990 Leiter des Labors für Knochenmark- und Blutstammzell-Präparation und des Bereichs Zelltherapie

Seit 1992 stellv. Ärztlicher Direktor der DRK-Blutspendezentrale Ulm

Seit 1997 Leiter der Produktionsabteilung und Herstellungsleiter

Seit 2002 Stellv. Ärztlicher Direktor und Herstellungsleiter des Instituts für Klinische Transfusionsmedizin und Immunogenetik Ulm

Sonstiges

- Arzt für Innere Medizin, Hämatologie und Internistische Onkologie, Transfusionsmedizin
- Auszeichnung der Arbeitsgruppe mit dem COBE-Preis der DGTI und dem Forschungspreis der Franziska-Kolb-Stiftung



Projektleitung:
Dr. med.
Markus Wiesneth

Die Arbeitsgruppe hat als Schwerpunkt die Entwicklung spezifischer Zellpräparate für den klinischen Einsatz. Neben immunmagnetisch hochgereinigten Lymphozytensubpopulationen wie CD4-positiven T-Helferzellen wurden CD56-positive/CD3-negative NK-Zellen für eine adoptive Immuntherapie nach haploidenter Blutstammzelltransplantation zur Induktion und Verstärkung einer Immunreaktion gegen Tumorzellen und Infektionserreger etabliert.

In Kooperation mit der Abteilung Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Ulm wurde an der Charakterisierung von immunogenen leukämie-assoziierten Antigenen bei myeloischer Leukämie zur Entwicklung einer Vakzine gearbeitet. Von Patienten mit therapierefraktärer akuter myeloischer Leukämie wurden autologe dendritische Zellen für den therapeutischen Einsatz im Rahmen eines Studienprotokolls generiert und klinisch getestet. In enger Zusammenarbeit mit der HNO-Klinik wurde in einem Biomodell auf der Chorioallantois-Membran ein bispezifischer trifunktionaler Antikörper der Firma Fresenius HemoCare getestet, der durch eine Dreifachbindung „Tumorzelle-Dendritische Zelle-Lymphozyt“ zu einer gezielten T-Zellreaktion und somit einer spezifischen zytotoxischen Immunantwort gegen den Tumor führen soll. Mit der Abteilung Kardiologie wird derzeit am Aufbau eines gemeinsamen Projektes zur In vivo-Transdifferenzierung adulter hämatopoetischer Stammzellen zu Kardiomyozyten gearbeitet, die genetisch markiert und zur Behandlung einer dilatativen Kardiomyopathie eingesetzt werden sollen.

Working Group: Cellular Immunotherapy and Stem Cell Transplantation

Dr. med. Markus Wiesneth, head

The focus of the group is the development and further advance of specific cell populations for clinical trials and applications. Immunomagnetic procedures were established to enrich and purify lymphocyte subpopulations such as CD4-positive T cells or CD56-positive/CD3-negative natural killer cells for an adoptive immunotherapy to enhance the immune response against tumor cells and infectious agents following peripheral blood stem cell transplantation.

Leukemia associated antigens were characterized in cooperation with the Department of Haematology and Oncology of the University Hospital of Ulm, to develop a vaccine based on autologous dendritic cells. Dendritic cells from patients with refractory acute myeloid leukemia were generated according to GMP guidelines and administered as part of a clinical trial. Furthermore a bispecific trifunctional antibody (Fresenius HemoCare) is being tested in vitro on the chorioallantois membrane in close interaction with the Department of Otorhinolaryngology. Bridging between the tumor cell, T cell and dendritic cell, the antibody is to induce a specific, cell mediated tumor cytotoxicity. Together with the Department of Cardiology a project for the in vivo-transdifferenziation of genetically labeled adult hematopoietic progenitor cells into cardiomyocytes for the treatment of patients with dilative cardiomyopathy has been brought to life.

Grundlagen des Organ-Homings transplanteder Blutstammzellen

Ziel des Projektes:

Die grundlegenden Mechanismen des Stammzell-Homings für die Herstellung und Anwendung von Präparaten in der Zelltherapie sollen untersucht und entsprechend ihrer Bedeutung eingeordnet werden.

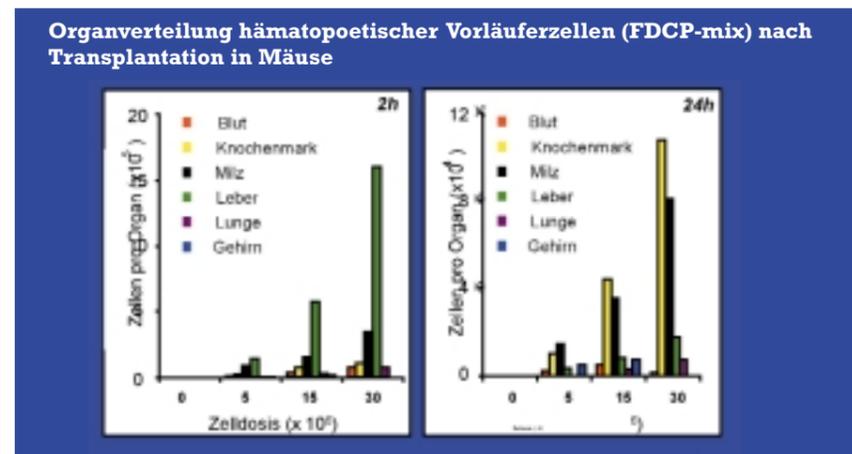


Abb. 1 Anreicherung dreier verschiedener Zelldosen transplanteder hämatopoetischer Vorläuferzellen in Organen von C57BL/6 Mäusen 2 und 24 Stunden nach Transplantation. Nachweis der Frequenz (y-Achse) mittels Durchfluss-Zytometrie.

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Die intravenöse Infusion ist unter allen Applikationsarten die effektivste Methode der Transplantation blutbildender Stammzellen. Allerdings liegt die Effizienz dieser Zellen, das blutbildende Knochenmark auch zu erreichen, nur bei 5 bis 20 %. Bisher ist auch unklar, auf welchem Wege nicht wiedergefundene transplantede Zellen im Empfängerorganismus verloren gehen oder mit welchen Zellpopulationen sie – im positiven wie im negativen Sinne – dabei interagieren können.

Deswegen wird angestrebt, transplantede Zellen oder ihren Empfängerorganismus zukünftig so vorzubehandeln, dass die Versagerquote der Stammzelltransplantation auf ein Minimum reduziert werden kann. Darüber hinaus werden Verfahren entwickelt, die eine schnellere Regeneration der Blutbildung ermöglichen. Besonders große Bedeutung gilt dem zielgerichteten Einsatz der ex vivo-manipulierten Zelltherapeutika.

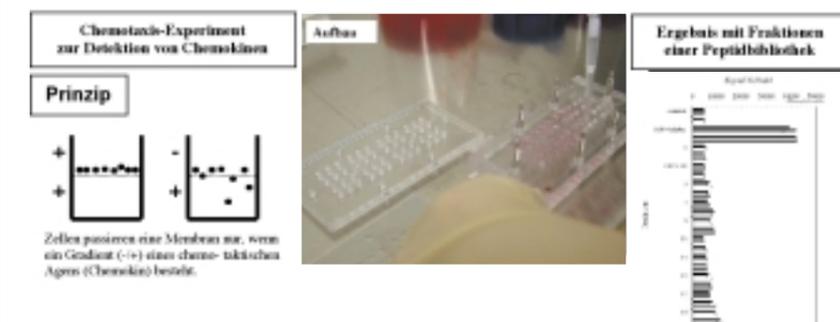


Abb. 2 Screening humaner Peptidbibliotheken auf Aktivitäten, die die Stammzellmigration induzieren.

Standort: Frankfurt
 Projektleitung:
 Dr. med.
 Reinhard Henschler

Die wichtigsten Ergebnisse

Bisher wurden **in vitro-Modelle etabliert, in denen 1) Stammzellen durch hämatopoetische Repopulation nachgewiesen und 2) das Migrations- und Homing-Verhalten von Stamm- oder Vorläuferzellen verfolgt und manipuliert werden können.**

Dabei wurde klar, dass transplantede Vorläuferzellen innerhalb von Minuten bis Stunden nach Transfusion durch Blut und Lungen rezirkulieren und dann zu höheren Anteilen in Knochenmark und Milz gelangen. Die stärksten Anreicherungen fanden wir interessanterweise zunächst in der Leber (Abb. 1). Weitere Studien ergaben, dass die Aktivierung von Adhäsionsrezeptoren auf hämatopoetischen Vorläuferzellen durch Proteine im Blutplasma erfolgen kann. Aktiviert werden zum Beispiel die sog. Homing-Rezeptoren Very Late Antigen (VLA)-5 und CXC-Chemokin-Rezeptor (CXCR)-4. Diese Aktivitäten werden nach Vorbehandlung von Stammzell- Spendern mit dem Wachstumsfaktor G-CSF, mit oder ohne zusätzliche Chemotherapien, im Blutplasma induziert.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W.G. Forssmann am Institut für Peptidforschung in Hannover wurden Methoden entwickelt und eingesetzt, um solche Aktivitäten aus dem Proteom des humanen Plasmas zu isolieren. Hierfür werden Plasma-Peptidbibliotheken aus Plasma von anderweitig gesunden niereninsuffizienten oder von chemotherapierten Patienten hergestellt und in in vitro-Migrationsassays (z.B. der Chemotaxis-Assay) untersucht (Abb. 2).

Allgemeinverständlicher Überblick

Zur Therapie verschiedener Erkrankungen des blutbildenden Systems im Knochenmark ist es erforderlich, blutbildende Stammzellen vom Spender in den betroffenen Patienten zu transplantieren. Die effektivste Methode ist dabei die intravenöse Infusion.

Um Anzahl und Wirksamkeit der Zellen, die das blutbildende Knochenmark tatsächlich erreichen, zu optimieren, werden die Methoden ständig angepasst und verbessert.

Summary:

Mechanisms of organ homing of transplanted blood stem cells

Intravenous infusion has so far been the most effective way to deliver transplanted hematopoietic stem cells. Yet the 'seeding efficiency' of transplanted hematopoietic stem and progenitor cells was found to be in the range of only between 5 and 20 %. So far the fate of the remainder of the transplanted cells within the host organism is unclear. We intend search for these cells, and to define ways to pretreat transplanted stem and progenitor cells in order to reduce transplantation failure rates and allow more rapid hemtopoietic regeneration. This may allow improved organ targeting of ex vivo manipulated cellular therapeutics.

Projektkennzahlen

Förderung:	BMBF Projekt 0312683 und Projekt 07 ITU 04, Deutsche José Carreras Leukämie-Stiftung e.V., Novartis Stiftung, Clotten-Stiftung, DFG Projekt Sonderforschungsbereich 364, DFG-Postdoktoranden-Stipendium
Laufzeit:	kontinuierlich
Projektleitung:	Dr. med. Reinhard Henschler
Mitarbeiter:	MUDr. Zuzana Fehevizyova, Dr. Oliver Seitz, Dr. Lars Dressel, Roxana Bistran, M.D., Dipl.-Biol. Bithiah Grace, cand. biol. Christian Claßen, Sabrina Böhme, Viktoria Karpf, Burcu Ozbizer
Kooperationen:	Dr. R. Richter, Prof. Dr. W.G. Forssmann, Niedersächsisches Institut für Peptidforschung (IPF Pharmaceuticals), Medizinische Hochschule Hannover Prof. Dr. A. Müller, Institut für Medizinische Strahlenkunde und Zellforschung, Universität Würzburg Dr. G. Bug, Dr. O. Ottmann, Dr. H. Martin, Medizinische Klinik III (Hämatologie/Onkologie), Universitätsklinikum Frankfurt

Kontakt:

Dr. med. Reinhard Henschler

Institut für
 Transfusionsmedizin und
 Immunhämatologie
 Frankfurt

DRK-Blutspendedienst
 Baden-Württemberg –
 Hessen gGmbH
 Sandhofstraße 1
 60528 Frankfurt am Main

Telefon
 069 – 6782 - 191

Fax
 069 – 6782 - 258

E-Mail
 rhenschler@bsdhessen.de

Interaktionen des hämostatischen Systems mit Blutvorläuferzellen

Ziel des Projektes:

Es sollen mögliche Wechselwirkungen von Komponenten des Hämostase-Systems und des blutbildenden Systems bei der Stammzelltransplantation untersucht werden.

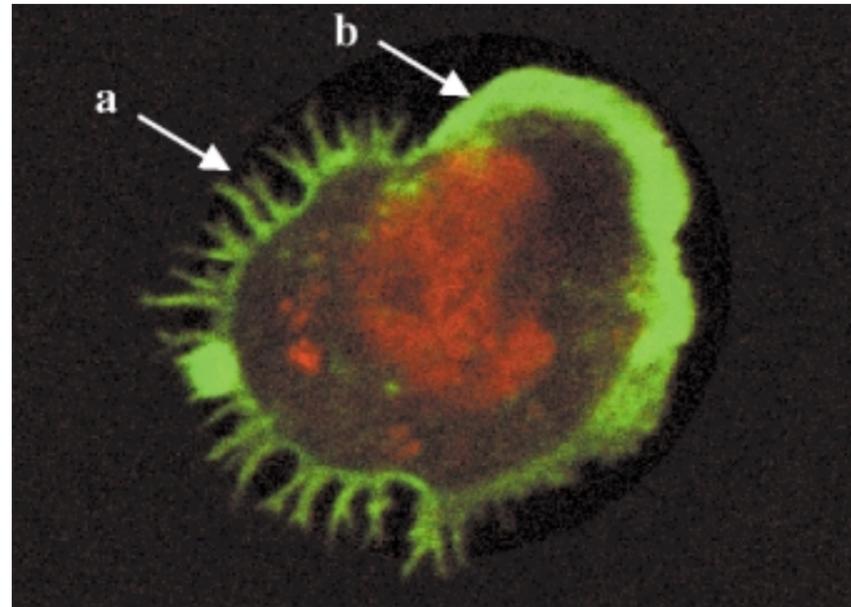


Abb. 1 Multipotente hämatopoetische Vorläuferzelle FDCP-mix: Anfärbung des Zellkerns (rot) und des Aktin-Zytoskeletts (grün). Diese Zellen können in vitro zu Vorläuferzellen für Granulozyten/Makrophagen, Erythrozyten und Megakaryozyten differenziert werden. Sie können vor Transplantation in syngene Mäuse zur Bildung von Membranausstülpungen (Filopodien, a; Lamellipodien, b) induziert werden, die bei der Migration aus der Blutbahn ins Gewebe erforderlich sind. Vergrößerung 1000-fach.

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Neuere Befunde geben Anlass zu der Hypothese, dass während der Stammzelltransplantation eine enge Verbindung zwischen bestimmten Komponenten des Hämostase-Systems (einschließlich der Blutplättchen) und dem blutbildenden System besteht. Außerdem ist die Erholung der Blutplättchenbildung bei vielen Patienten nach Stammzelltransplantation am stärksten und zum Teil lebensbedrohlich verzögert, besonders wenn Nabelschnurblut als Zellquelle und Transplantat dient.

Im vorliegenden Projekt werden daher mögliche positive und negative Wechselwirkungen löslicher Gerinnungsfaktoren und der Blutplättchen auf den Prozess des Stammzell-Homings untersucht. Ein zweiter Schwerpunkt liegt auf der Rolle megakaryozytärer (Blutplättchen-) Vorläuferzellen bei der Rekonstitution der Thrombopoese nach Transplantation. Megakaryozytäre Vorläuferzellen und Thrombozyten werden hierfür in vitro aus multipotenten hämatopoetischen Vorläuferzellen differenziert.

Die wichtigsten Ergebnisse

Die Kultur-Bedingungen als Voraussetzung für den klinischen Einsatz multipotenter hämatopoetischer Vorläuferzellen konnten verbessert werden. Im Tiermodell und in in vitro-Funktionsanalysen wurden die Homing- und Zirkulationseigenschaften der Vorläuferzellen charakterisiert.

Zusätzlich konnte belegt werden, dass die Bildung sog. Podien in der Zellmembran hämatopoetischer Vorläuferzellen von der Aktivierung intrazellulärer Signalmoleküle der Familie der sog. kleinen GTPasen der Rho-Familie abhängt.

Allgemeinverständlicher Überblick

Wahrscheinlich besteht während der Stammzelltransplantation eine enge Verbindung zwischen den Komponenten des zirkulierenden Blutes und des blutbildenden Systems. Zur Zeit werden in diesem Zusammenhang die Wechselwirkungen von verschiedenen Gerinnungsfaktoren einschließlich der Blutplättchen und der transplantierten Stammzellen untersucht.

Summary:

Interactions of hemostasis system and blood progenitor cells

Recent findings support the hypothesis that during stem cell transplantation, there may be a coordinated interplay between components of the hemostatic system – including blood platelets – and the hematopoietic system. In addition, regeneration of blood platelet formation is delayed in a substantial proportion of patients, especially after transplantation of cord blood stem cells.

This project investigates the effects of soluble coagulation factors and platelets on individual steps and aspects of stem cell homing. In addition, we will focus on the role of megakaryocytic progenitor cells in reconstitution of hematopoiesis after transplantation, and attempt to expand and differentiate megakaryocytic progenitor cells from more primitive hematopoietic progenitor cells in culture.

Projektkennzahlen

Förderung:	Deutsche José Carreras Leukämie-Stiftung e.V.
Laufzeit:	01.02.2002 - 31.01.2005
Projektleitung:	Dr. Reinhard Henschler Prof. Dr. Erhard Seifried
Mitarbeiter:	Roxana Bistran, M.D. cand. biol. Christian Claßen Viktoria Karpf

Kontakt:

Dr. med. Reinhard Henschler

**Institut für
Transfusionsmedizin und
Immunhämatologie
Frankfurt**

**DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH**
Sandhofstraße 1
60528 Frankfurt am Main

Telefon
069 – 6782 - 191
069 – 6782 - 201

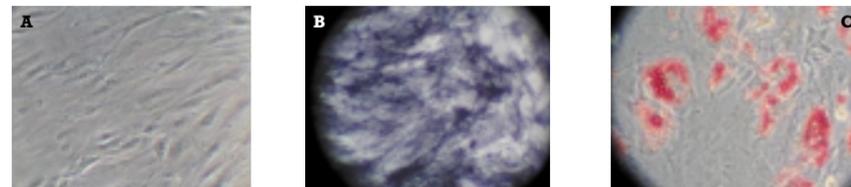
Fax
069 – 6782 - 258

E-Mail
rhenschler@bsdhessen.de

Aktivierung der Migration von Stamm- und Vorläuferzellen für mesenchymale Gewebe und Endothel

Ziel des Projektes:

Mesenchymale, osteogene und chondrogene Vorläuferzellen werden auf ihre Fähigkeit zur Einwanderung an den Ort der Geweberegeneration untersucht.



Mikroskopische Darstellung von MSC während ihrer (A) Expansion in Kultur nach Induktion der (B) Differenzierung in Knochenzellen (Nachweis durch Sekretion der alkalischen Phosphatase, blau) und (C) bindegewebige Zellen - Fibroblasten und Adipozyten (Nachweis durch Oil Red O). Vergrößerung 400fach.

Standort: Frankfurt
Projektleitung:
Dr. med.
Reinhard Henschler

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Das Knochenmark dient als eine Reserve sowohl für hämatopoetische (blutbildende) Stammzellen als auch für nicht-hämatopoetische (d.h. zur Erneuerung weiterer, nicht blutbildender Gewebe befähigter) Stammzellen. Besondere Aufmerksamkeit kommt derzeit den sog. mesenchymalen Stammzellen (MSC) zu.

Das laufende Forschungsprojekt beschäftigt sich mit der Fähigkeit von MSC und kommittierter osteogener, chondrogener oder weiterer Vorläuferzellen für Bindegewebe oder für Endothel, an entsprechende Orte der Geweberegeneration einzuwandern. Dabei unterscheidet sich die Migration lokal applizierter MSC in die Knochenneubildungszonen und bindegewebigen Regenerationsareale (sog. interstitielle Migration) von der Einwanderung dorthin auf dem Wege der Blutbahn.

Die wichtigsten Ergebnisse

Die ersten notwendigen Faktoren für die Mobilisierung und Migrationsinduktion von MSC konnten bislang identifiziert werden. Kooperationen hierzu bestehen mit den Frankfurter Universitätskliniken für Kieferchirurgie und Orthopädie.

Allgemeinverständlicher Überblick

Das Knochenmark ist der Ausgangspunkt für die Stammzellen des blutbildenden (= hämatopoetischen) Systems und für Stammzellen zur Erneuerung nicht blutbildender Gewebe wie beispielsweise Bindegewebe. Von großer Bedeutung ist daher die Fähigkeit der Zellen, an die entsprechenden Orte der Geweberegeneration einzuwandern. Notwendige Faktoren, die die Umgebung und die Funktion der Zellen dabei beeinflussen, stehen deshalb im Mittelpunkt verschiedener Forschungsprojekte.

Summary:

Activation of the migration of stem and progenitor cells from mesenchymal and endothelial tissue

Bone marrow has been considered as a reserve for both hematopoietic and non-hematopoietic stem cells. Among non-hematopoietic stem cells, mesenchymal stem cells (MSC) have gained increasing attention during the last years. This project deals with the ability of MSC as well as committed e.g. osteogenic or chondrogenic precursor cells, to migrate to areas of tissue regeneration. We consider both intra-tissue migration processes and migration through the circulation.

Projektkennzahlen

Förderung:	BMBF Projekt 0312683
Laufzeit:	01.01.2002 – 31.12.2004
Projektleitung:	Dr. Reinhard Henschler
Mitarbeiter:	Dr. Oliver Seitz Dr. Lars Dressel Dipl.-Biol. Bithiah Grace Sabrina Böhme Burcu Özbizer
Kooperationen:	Dr. R. Richter, Prof. Dr. W.G. Forssmann, Niedersächsisches Institut für Peptidforschung (IPF Pharmaceuticals), Medizinische Hochschule Hannover Dr. M. Rauschmann, Orthopädische Universitätsklinik Friedrichsheim, Frankfurt PD Dr. Dr. C. Klein, Klinik für Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Frankfurt

Kontakt:

Dr. med. Reinhard Henschler

**Institut für
Transfusionsmedizin und
Immunhämatologie
Frankfurt**

**DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH**
Sandhofstraße 1
60528 Frankfurt am Main

Telefon
069 – 6782 - 191

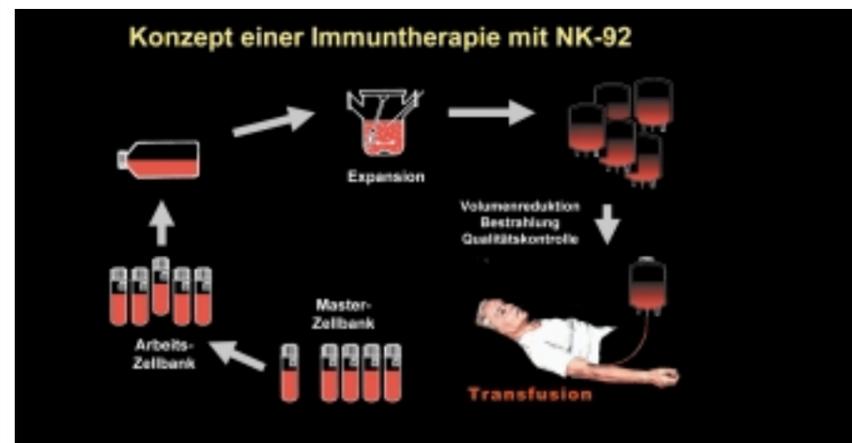
Fax
069 – 6782 - 258

E-Mail
rhenschler@bsdhessen.de

Adoptive Immuntherapie maligner Erkrankungen

Ziel des Projektes:

Zur Behandlung maligner Erkrankungen soll eine Zelltherapie auf der Basis hocheffizienter Natürlicher Killerzelllinie NK-92 entwickelt werden.



Hintergrund und Projektbeschreibung:

Jüngste Untersuchungen zeigen, dass natürliche Killer-(NK)-Zellen einen substantiellen Beitrag zum GvL-(Graft-versus-Leukemia)-Effekt leisten können, ohne das Risiko einer GvH-(Graft-versus-Host)-Reaktion mit sich zu bringen. NK-Zellen stellen die erste Welle der körpereigenen Immunabwehr gegen virusinfizierte und maligne entartete Zellen dar. NK-Zellen sind in ihrer Immunantwort nicht MHC-restringiert, ihre Interaktion mit gesunden und malignen entarteten bzw. virusinfizierten Zellen wird jedoch durch eine Vielzahl inhibitorischer und aktivierender NK-Zellrezeptoren reguliert. NK-Zellen exprimieren mindestens einen, oftmals jedoch auch mehrere inhibitorische Rezeptoren, die mit autologen HLA-Klasse I Antigenen interagieren und so verhindern, dass ein Angriff auf die körpereigenen, gesunden Gewebezellen erfolgt. NK-Zellreaktionen gegen „Fremd“ erfolgen, wenn der HLA-Typ des NK-Zellspenders ein KIR-Epitope beinhaltet, welches nicht Teil des HLA-Typs der allogenen Zielzelle ist. In der Abwesenheit eines solchen Liganden wird die allogene (fremde) Zelle abgetötet, vorausgesetzt, dass eine weitere Aktivierung durch bisher nicht im Detail charakterisierte Rezeptoren erfolgt. Vor diesem Hintergrund gibt es derzeit eine Vielzahl verschiedener Therapieansätze, die alle versuchen, die körpereigenen NK-Zellen oder NK-Zellen von Spendern für die Tumorthherapie einzusetzen. Hierzu werden NK-Zellen, die etwa 5% der Lymphozyten im peripheren Blut ausmachen, über immunmagnetische Verfahren selektiert, in vitro expandiert und dem Patienten transfundiert.

Da die gewonnenen NK-Zellpopulationen jedoch gewöhnlich eine Mischpopulation verschiedener NK-Subtypen mit einem unterschiedlichen Muster an inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren repräsentieren, ist die Wirkung dieser Therapie nicht immer vorherzusagen. Dazu kommt, dass die patienteneigenen NK-Zellen aufgrund der Chemo- oder Radiotherapie oftmals stark in ihrer Funktion eingeschränkt sind, und sie sich daher nicht für immuntherapeutische Behandlungsansätze eignen.

Die Arbeitsgruppe versucht daher, eine klonale NK-Zelllinie für die Krebstherapie zu entwickeln, die verschiedene Vorteile in sich vereint. NK-92 Zellen zeichnen sich durch das weitgehende Fehlen inhibitorischer NK-Zellrezeptoren aus, bei erhaltender und hoher Granzyme B und Perforin vermittelter lytischer Aktivität. Hierdurch zeigen NK-92 Zellen eine besonders breit gefächerte und hohe Aktivität gegen verschiedene Formen von Leukämien und Tumoren.

Vorteile einer Therapie mit NK-92 Zellen ergeben sich neben der in Tierexperimenten belegten Wirkung von NK-92 Zellen darüber hinaus in der leichten Verfügbarkeit der Zellen, unabhängig von der Vorschädigung des patienteneigenen Immunsystems und der Möglichkeit einer zentralen und standardisierten Herstellung der Zellpräparate. Die Verwendung einer allogenen NK-Zelllinie stellt ein völlig neues Konzept der adoptiven Immuntherapie dar, und es gilt daher insbesondere, auch die möglichen Nebenwirkungen einer solchen Therapieform zu untersuchen.

Am Universitätsklinikum Frankfurt wird die Immuntherapie maligner Erkrankungen mit der NK-92 Linie derzeit in klinischen Studien auf ihre Verträglichkeit und Effektivität hin untersucht. Bisher konnten insgesamt 10 Patienten mit zum Teil schon sehr hohen Dosen NK-92 Zellen behandelt werden. Die Therapie wurde von allen Patienten, die sich in einem sehr späten Stadium ihrer Krebserkrankung befanden, sehr gut toleriert, und es traten keine Nebenwirkungen auf. Besonderes Augenmerk gilt auch der möglichen Abstoßungsreaktion, die die „fremden“ NK-92 Zellen in den behandelten Patienten induziert. Erstaunlicherweise zeigten nur 2 der 10 Patienten eine humorale Antwort gegen NK-92 Zellen. Die Bildung von Antikörpern gegen die NK-92 Zellen trat hierbei erst 4 Wochen nach der Therapie auf, so dass die zytotoxische Wirkung der NK-Zelltherapie hiervon nicht beeinträchtigt wurde. Bei einem der behandelten Patienten zeigte sich bereits ein therapeutischer Effekt der NK-92 Zellen. Bei diesem Patienten, der an einem kleinzelligen Lungentumor litt, ging unter der NK-92 Zelltherapie eine Metastase vorübergehend zurück.

Die wichtigsten Ergebnisse

Als Ergebnis steht heute die komplette Infrastruktur und technische Expertise für eine Expansion von natürlichen Killerzellen im klinischen Maßstab zur Verfügung. Die 10 bisher mit hohen Dosen von bestrahlten NK-92 Zellen behandelten Patienten haben die Immuntherapie überaus gut und ohne Nebenwirkungen vertragen. Nach Abschluss der Dosis-Eskalationsstudie gilt es, ein geeignetes Behandlungsschema bei Patienten mit einer geringeren Tumorlast zu entwickeln.

Allgemeinverständlicher Überblick

Neben den bislang bekannten Tumorthapien wie Operation, Chemo- bzw. Strahlentherapie gewinnt die Zelltherapie immer mehr an Bedeutung. Hierbei wird für den Patienten eine schonende und wirksame Therapie mit so genannten Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) entwickelt. Diese Zellen werden in Zellbanken hergestellt und dem Patienten verabreicht. Da die bislang behandelten Patienten die Therapie überaus gut und nebenwirkungsfrei vertragen haben, wird das Behandlungsschema jetzt optimiert und in klinischen Studien weiter überprüft.

Summary:

Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line NK-92

For years activated natural killer cells (A-NK) have been explored with respect to their efficacy in anticancer therapy, but, except for some anecdotal reports, no clear clinical benefit has been shown. However, as the understanding about the interactions of NK cells and tumor cells advances, the use of A-NK cells might be revisited with more sophisticated approaches that pay tribute to mechanisms which allow tumor cells to escape immune surveillance. Here the highly cytotoxic NK cell line NK-92 seems to be an attractive alternative for use in adoptive immunotherapy, because it was shown to exhibit substantial antitumor activity against a wide range of malignancies in vitro as well as in xenografted SCID mice. NK-92 cells are characterized by an almost complete lack of killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR's) yet conserved ability to perforin and granzyme B-mediated cytolytic activity, which make them unique among established NK and T cell-like cell lines. The group is developing NK-92 cells for adoptive immunotherapy of malignancies and has initiated clinical phase I/II trials in patients with advanced cancer, receiving repeated doses of irradiated NK-92 cells.

Projektkennzahlen

Förderung:	Deutsche José Carreras Leukämie-Stiftung e.V. Held-Hecker-Stiftung, Universität Frankfurt
Laufzeit:	2001-2003
Projektleitung:	Dr. Torsten Tonn
Stv. Leitung:	Dr. Sven Becker
Mitarbeiter:	Dipl.-Biol. Christian Herder Dipl.-Biotechn. Nicola Krzossok
Kooperationen:	Prof. Dr. Hoelzer, PD Dr. O. Ottmann, Medizinische Klinik III, Universität Frankfurt Prof. Dr. T. Klingebiel, PD Dr. A. Schwabe, Klinik für Kinderheilkunde III (Pädiatrische Hämatologie und Onkologie), Universität Frankfurt

Weiterführende Informationen:

Tonn T, Becker S, Esser R, Schwabe D, Seifried E. Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line NK-92. J Hematol Stem Cell Res (2001);10(4):535-44

Standort: Frankfurt
Projektleitung:
Dr. med.
Torsten Tonn

Kontakt:

Dr. med. Torsten Tonn

Institut für
Transfusionsmedizin und
Immunhämatologie
Frankfurt

DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH
Sandhofstraße 1
60528 Frankfurt am Main

Telefon
069 – 6782 - 228

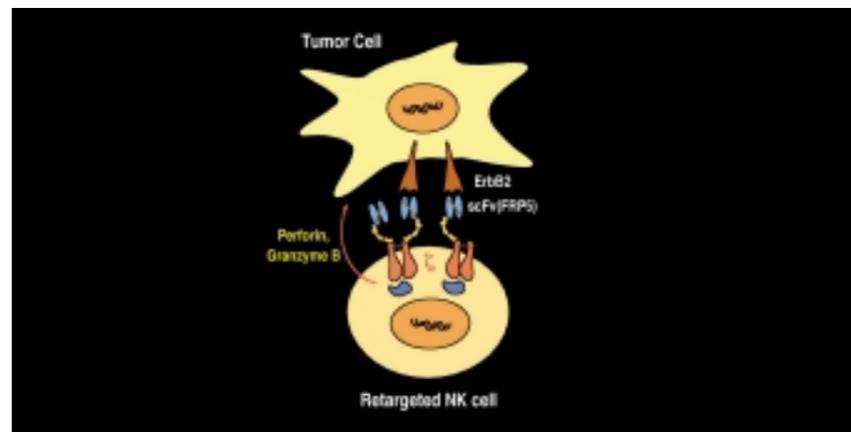
Fax
069 – 6782 - 259

E-Mail
ttonn@bsdhessen.de

Adoptive Immuntherapie bei Mammakarzinom: Retargeting von NK-Zellen

Ziel des Projektes:

Eine adoptive Immuntherapie von Mammakarzinomen mit spezifisch gegen ErbB2-gerichteten NK-92 Zellen soll entwickelt werden.



Quelle: Prof. Dr. W. Wels

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Trotz der hohen zytolytischen Aktivität der NK-92 Zellen gegenüber verschiedenen Tumoren und Leukämien scheint es einige Tumorentitäten zu geben, die eine besondere Resistenz gegenüber dem Angriff durch NK-Zellen im allgemeinen sowie auch gegenüber NK-92 Zellen entwickelt haben. Um diese Resistenzmechanismen zu durchbrechen, wurden NK-92 Zellen in der Arbeitsgruppe von Prof. Winfried Wels am Georg-Speyer-Haus in Frankfurt dahingehend verändert, dass sie speziell auf einzelne Tumorantigene ausgerichtet sind (Retargeting). Die hier angewandte Technologie beruht auf der Expression von chimären Antigenrezeptoren durch NK-92 Zellen, welche aus einem tumorspezifischen Antikörperfragment (scFv) und einer intrazellulären Signaltransduktionskette bestehen. Die Veränderung bewirkt, dass Tumorzellen, die den Wachstumsfaktorrezeptor ErbB2 auf ihrer Oberfläche exprimieren, nun von NK-92 erkannt und abgetötet werden. ErbB2 (Her2/Neu) wird von ca. 30 % aller Mamma- und Kolonkarzinome exprimiert und ist mit einer besonders schlechten Prognose für die betroffenen Patienten assoziiert.

Erste Untersuchungen mit den so veränderten NK-92 Zellen geben Hoffnung, dass sich die Zellen für eine effektive und schonende Therapie der o.g. Erkrankungen einsetzen lassen. Erste vorklinische Untersuchungen konnten zeigen, dass Mammakarzinom-Zellen effektiv und spezifisch ausgeschaltet werden können. Die Weiterentwicklung dieser hoffnungsvollen Zelltherapie findet in enger Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Wels am Georg-Speyer-Haus statt. Während dort weitere NK-92 Zellen mit anderer Tumorspezifität entwickelt werden und die nötigen Tierexperimente zur Vorbereitung klinischer Studien ablaufen, wird im Institut für Transfusionsmedizin derzeit eine klinische Studie zur Behandlung von Her2/Neu positiven Mammakarzinomen vorbereitet. Hierzu gilt es, eine entsprechende Umstellung der Labormethoden auf Bedingungen der Guten-Herstellungs-Praxis (GMP) zu erarbeiten, um eine Anwendung am Menschen zu ermöglichen.

Die wichtigsten Ergebnisse

Durch die Expression von Erb2-spezifischen, chimären Antigenrezeptoren in NK-92 Zellen können auch solche Tumore effizient lysiert werden, die sonst völlig resistent gegenüber einem Angriff durch NK-Zellen sind. Die Aktivität der NK-92 Zellen geht hierbei intrinsisch und spezifisch von dem chimären Antigenrezeptor aus, der – nach Bindung an das spezifische Antigen auf einer Tumorzelle – NK-92 Zellen dazu veranlasst, die betreffende Krebszelle abzutöten. Hierdurch ergeben sich völlig neue Behandlungsmöglichkeiten, weil NK-92 Zellen durch Austausch der Spezifität theoretisch gegen jede Tumorentität gerichtet werden können. Nachdem erste Ergebnisse in der Zellkultur und in Tierexperimenten auf die Wirksamkeit der veränderten NK-92 Zellen hinweisen, wird nun eine klinische Studie vorbereitet, die die Verträglichkeit und Wirksamkeit der NK-92-scFv Zellen bei Patientinnen mit Mammakarzinom untersucht.

Allgemeinverständlicher Überblick

Krebszellen haben oft Mechanismen entwickelt, mit denen sie dem Immunsystem entgehen können. Diese Mechanismen wirken oft auch dann, wenn man den Patienten mit im Labor vermehrten Immunzellen des Patienten selbst oder eines Spenders behandelt. Um dies zu umgehen, wurde hier eine Technik verwendet, bei der die Immunzellen (NK-92) spezifisch auf eine Krebszelle gerichtet werden und an diese binden. Die Immunzelle wurde so programmiert, dass nach der Bindung der Immunzelle an die Krebszelle Enzyme freigesetzt werden, die zu einer Zerstörung der Krebszelle führen. Die bisherigen Ergebnisse geben Hoffnung für eine neuartige Therapieform bei Patientinnen mit bösartigem Brustkrebs.

Summary:

Adoptive immunotherapy of HER2/neu positive breast cancer using retargeted natural killer-cells

The continuously growing natural killer (NK) cell line NK-92 is highly cytotoxic against malignant cells of various origins without affecting normal human cells. To further enhance the antitumor activity of NK-92 cells and expand the range of tumor entities suitable for NK-92-based therapies, NK-92 cells have been generated with grafted recognition of ErbB2 (HER2/neu) expressing tumor cells. Retargeting to ErbB2 expressing tumors has been achieved using a chimeric antigen receptor consisting of the ErbB2-specific scFv(FRP5) antibody fragment, and transmembrane and intracellular regions of the CD3-zeta chain. Retargeted NK-92 cells specifically and efficiently lysed established and primary ErbB2-expressing tumor cells that were completely resistant to cytolytic activity of parental NK-92 cells. Currently phase I clinical trials are prepared, analysing the safety and efficacy of retargeted NK-92 cells in patients with HER2/neu positive breast cancer.

Projektkennzahlen

Förderung:	Stiftung Hämotherapie-Forschung
Laufzeit:	2000-2001
Projektleitung:	Dr. Torsten Tonn
Stv. Leitung:	Dr. Sven Becker
Mitarbeiter:	Dipl. Biotechn. Nicola Krzossok
Kooperationen:	Prof. Dr. W. Wels, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt PD Dr. O. Ottmann, Medizinische Klinik III, Universität Frankfurt Prof. Dr. H.-G. Klingemann, Rush Cancer Institute Chicago, USA

Weiterführende Informationen:

Uherek C, Tonn T, Uherek B, Becker S, Schnierle B, Klingemann HG, Wels W. Retargeting of natural killer-cell cytolytic activity to ErbB2-expressing cancer cells results in efficient and selective tumor cell destruction. Blood. (2002);100(4):1265-73

Kontakt:

Dr. med. Torsten Tonn

Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie Frankfurt

DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gGmbH Sandhofstraße 1 60528 Frankfurt am Main

Telefon 069 – 6782 - 228

Fax 069 – 6782 - 259

E-Mail ttonn@bsdhessen.de

Standort: Frankfurt
Projektleitung:
Dr. med.
Torsten Tonn

Gewinnung und Prozessierung von Blutstammzellen aus Nabelschnurblut

Ziel des Projektes:

Projektziel ist die Entwicklung präparativer Methoden nach GMP-Standard zur optimierten Gewinnung und Aufarbeitung von Plazentarestblut-Transplantaten.



Abnahme von Nabelschnurblut durch Punktion der V. umbilicalis

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Im Rahmen der Forschungstätigkeit wurde ein neuartiger Leukozytenfilter getestet, der eine Volumenreduktion von Nabelschnurblut (NSB) durch Adhäsion und anschließende Elution der mononukleären Zellen ermöglicht. Besonderes Gewicht wurde dabei auf eine möglichst hohe Ausbeute und Qualität der hämatopoetischen Zellen gelegt. Da diese allogenen Transplantate aus Humanblut in Deutschland den Vorschriften des Arzneimittelgesetzes unterliegen, wurde zudem auf eine arzneimittelgerechte Herstellung entsprechend den Leitlinien einer Good Manufacturing Practice (GMP) geachtet. In einer multizentrischen Studie der BEST-Gruppe der ISBT wurden NSB-Proben mit diesem Filter oder der konventionellen Buffy-coat-Methode volumenreduziert und die Daten hinsichtlich Zellausbeute und Zellqualität verglichen. In Erweiterung dieser internationalen Studie wurde in Mannheim das biologische Verhalten von Filter-Transplantaten mit herkömmlich prozessierten NSB-Transplantaten verglichen. Hierfür wurden gepaarte Transplantationsexperimente im NOD/SCID-Mausmodell durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass die mit dem Filter volumenreduzierten Transplantate ein ebenso gutes Potenzial zur hämatopoetischen Rekonstitution besitzen wie nicht volumenreduzierte Transplantate. Die Ergebnisse der Untersuchung sollen in eine Zulassung des Filterpräparates durch das Paul-Ehrlich-Institut münden.

Die Anzahl der in Mannheim in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum und weiteren Entbindungseinrichtungen eingelagerten Nabelschnurblutpräparate lag Mitte 2002 bei ca. 2.200 Transplantaten, wobei ca. 1.800 Transplantate dem ZKRD bereits gemeldet worden waren. Im Jahr 2001 wurden erfolgreich zwei fremd-allogene (Hackensack, USA; Rouen, Frankreich) und eine familiär-allogene Transplantation (Berlin) mit NSB durchgeführt, bis Ende 2002 wurden drei weitere fremd-allogene Transplantate ausgegeben (Baltimore, USA; Sevilla, Spanien; Teheran, Iran). Bis Ende 2002 stieg somit die Gesamtzahl der durchgeführten Transplantationen auf zehn an.

Standort: Mannheim
Projektleitung:
Priv.-Doz. Dr. med.
Hermann Eichler

Die wichtigsten Ergebnisse

Es wurde ein neuartiger Leukozytenfilter zur Volumenreduktion von Nabelschnurblut und Anreicherung mononukleärer Zellen getestet und gezeigt, dass diese Zell-Eluate hinsichtlich ihres Potenzials zur hämatopoetischen Rekonstitution mit dem Potenzial nicht volumenreduzierter Transplantate vergleichbar sind.

Allgemeinverständlicher Überblick

Bei der Transplantation von Stammzellen zur Therapie von schweren Erkrankungen wie Leukämie spielt die Zahl und Qualität der transplantierten Zellen eine wichtige Rolle für die Effizienz der Therapie. Die Entwicklung von Methoden zur Gewinnung und Anreicherung qualitativ hochwertiger Stammzellen aus Nabelschnurblut hilft daher, die Stammzelltherapie weiter zu verbessern. Im Rahmen dieses Forschungsprojektes wurde ein neuartiges Filtersystem zur Anreicherung von Stammzellen getestet und gezeigt, dass die Qualität der gewonnenen Zellen mit der der bisher eingesetzten Stammzellen vergleichbar ist. Augenblicklich laufende Untersuchungen dienen der Quantifizierung der Stammzellen in den Filter-Präparaten.

Summary:

Multi-laboratory evaluation of procedures for volume reducing cord blood: influence on cell recoveries

Various procedures can be used to isolate stem and progenitor cells from cord blood. This study evaluated the traditional hydroxyethyl starch (HES) sedimentation, the Top & Bottom (T&B) isolation of buffy coat and two filter systems for processing cord blood (Asahi Medical and Terumo). Each of seven international laboratories were randomly assigned the evaluation of either the HES or T&B method and one of the filter methods. The median percent recovery of total nucleated cells were comparable with both traditional methods (HES 79 %, T&B 86 %) and statistically reduced with both filtration procedures (Asahi 59 %, Terumo 61 %). Mononuclear cell recovery was highest statistically with the T&B method (91 %) and reduced on using Asahi (77 %) and Terumo filter (70 %) and the HES method (72 %). CD34⁺ cell recovery was judged to be essentially comparable with the four methods, although the range of unit recoveries differed. These data indicate that filters that capture stem and progenitor cells may be an appropriate methodology for processing cord blood collected for banking. NOD/SCID mice transplantation experiments demonstrated a significant engraftment capacity of stem cells processed by filtration, and no negative effect on the engraftment potential of filtered cord blood cells vs. non-volume reduced cord blood cells could be observed.

Projektkennzahlen

Förderung:	Universität Heidelberg Industriemittel Eigenmittel
Laufzeit:	3 Jahre
Projektleitung:	Priv.-Doz. Dr. Hermann Eichler
Mitarbeiter:	Dr. Karen Bieback Dipl.-Biol. Susanne Kern (Doktorandin) Christian Beck (Arzt, Doktorand) Monika Latta (MTA)
Kooperationen:	Asahi Medical Universitäts-Frauenklinik Mannheim (Prof. Dr. F. Melchert, Prof. Dr. W. Zieger)

Kontakt:

Priv.-Doz. Dr. med. Hermann Eichler

Institut für
Transfusionsmedizin
und Immunologie Mannheim

DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH
Friedrich-Ebert-Straße 107
68167 Mannheim

Telefon
0621 – 3706 - 875

Fax
0621 – 3706 - 876

E-Mail
H.Eichler@blutspende.de

Vergleich der Kriterien zur Qualitätskontrolle von Stammzellpräparationen aus Nabelschnurblut

Ziel des Projektes:

Es werden die qualitative und quantitative Bewertung der Kriterien zur Qualitätskontrolle von Stammzellpräparationen aus Nabelschnurblut im Hinblick auf eine Harmonisierung der Qualitäts-Parameter vorgenommen.

Hintergrund und Projektbeschreibung:

In einer von der BEST-Arbeitsgruppe (Biomedical Excellence for Safer Transfusion) der ISBT ausgehenden multizentrischen Studie wurde die Vergleichbarkeit der bei der Stammzellpräparation angewandten Parameter zur Qualitätskontrolle (z. B. CD34-Quantifizierung, Colony assay etc.) untersucht. Die Ergebnisse werden zur Erarbeitung von Vorschlägen zur Harmonisierung der Testungen beitragen. Erste Arbeitsergebnisse dieser noch nicht abgeschlossenen Studie zeigten eine gute Übereinstimmung der Reproduzierbarkeit und Linearität bestimmter Untersuchungsparameter, wie etwa der automatischen Zellzahl-Bestimmung, mit dem Untersuchungsmaterial Nabelschnurblut. Andere Parameter dagegen differierten signifikant zwischen den teilnehmenden Laboratorien.

Die wichtigsten Ergebnisse

Der Vergleich der für die Stammzellpräparation angewandten verschiedenen Parameter zur Qualitätskontrolle zeigt für eine Reihe von Parametern eine gute, für andere eine nur mäßige Übereinstimmung der Reproduzierbarkeit und Linearität. Nabelschnurblut ist daher als ein prinzipiell kritisches Untersuchungsmaterial einzustufen.

Allgemeinverständlicher Überblick

Um die optimale Sicherheit für den Empfänger des Transplantates aus Plazentarestblut zu gewährleisten, ist es erforderlich, die Methoden der Gewinnung und Aufarbeitung zu optimieren. Besonderes Gewicht wird dabei auf hohe Ausbeute und Qualität der hämatopoetischen Zellen gelegt. Transplantate aus Humanblut unterliegen dabei in Deutschland den Vorschriften des Arzneimittelgesetzes. Deshalb müssen zur Herstellung der Transplantate entsprechende Arzneimittelvorschriften und Leitlinien eingehalten werden.

Standort: Mannheim
Projektleitung:
Priv.-Doz. Dr. med.
Hermann Eichler

Summary:

Evaluation of in vitro assays utilized to evaluate cord blood hematopoietic stem cell products

A number of in vitro assays are used to assess the quality of hematopoietic stem cell products as well as to evaluate processing and storage conditions. The most often used assays include: total nucleated cells obtained as the leukocyte level on performing a complete blood count with a hematology analyzer, CD34⁺ cell counts obtained using flow cytometry, progenitor colonies (CFU-GM, BFU-E), and overall cell viability. The Cellular Therapy Team of the BEST Working Party will conduct two studies to evaluate assay variability with methods currently in use. An intra-laboratory study will be conducted to assess reproducibility of selected cell number parameters including those measured with a hematology analyzer, the linearity of hematology measurements, and the reproducibility and linearity of the progenitor colony assay measurements. The second study will be planned as an inter-laboratory study involving the assaying of identical samples to be distributed by one laboratory.

Projektkennzahlen

Förderung:	BEST-Arbeitsgruppe der ISBT Eigenmittel
Laufzeit:	3 Jahre
Projektleitung:	Priv.-Doz. Dr. Hermann Eichler
Mitarbeiter:	Monika Latta (MTA)
Kooperationen:	International mit weiteren Forschungsstellen und Nabelschnurblutbanken

Kontakt:
Priv.-Doz. Dr. med. Hermann Eichler

**Institut für
Transfusionsmedizin und
Immunologie Mannheim**

**DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH**
Friedrich-Ebert-Straße 107
68167 Mannheim

Telefon
0621 – 3706 - 875

Fax
0621 – 3706 - 876

E-Mail
H.Eichler@blutspende.de

Optimierung der Zellausbeute in getauten Stammzellpräparationen durch Einsatz von rekombinanter humaner DNase

Ziel des Projektes:

Methoden zur Optimierung der Zellausbeute in kryokonservierten Stammzellpräparationen sollen entwickelt werden.

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Während des Auftauvorgangs von kryokonservierten Stammzellpräparationen kommt es gelegentlich zur Bildung von Zell-Aggregaten, die mit einem deutlichen Verlust an transplantierbaren Zellen verbunden sein können. Vor diesem Hintergrund beschäftigt sich die Arbeitsgruppe mit der Entwicklung von Methoden zur Optimierung der Präparation von gefrorenen und aufgetauten NSB-Transplantaten. Zur Vermeidung der Aggregatbildung wurde ein für Buffy-coat-Präparate optimiertes Auftau-Verfahren entwickelt, bei dem dem Präparat rekombinante humane DNase zugesetzt wurde. Die Substanz verursachte keine signifikante Expressionsminderung der Adhäsionsmoleküle CD11a, CD62L und CD54 auf der Oberfläche von Progenitor-Zellen aus Plazentarestblut. Negative Effekte auf die Homing-Funktion dieser Zellen nach Transplantation sind daher unwahrscheinlich. In einer klinischen Anwendung dieses Auftau-Verfahrens konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von 4%iger rekombinanter humaner DNase eine sichere Prozessierung von getauten Buffy-coat-Transplantaten ohne Einschränkung des Engraftment-Potenzials erlaubt.

Die wichtigsten Ergebnisse

Es wurde ein optimiertes Auftau-Verfahren für Buffy-coat-NSB-Präparate entwickelt, bei dem sich durch Zusatz einer 4%igen rekombinanten DNase die Bildung von Zellaggregaten während des Auftauvorgangs verhindern und so der Anteil transplantierbarer Zellen erhöhen ließ.

Allgemeinverständlicher Überblick

Die für die Stammzelltherapie verwendeten Zellen aus Nabelschnurblut werden nach der Präparation in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und erst vor der Anwendung nach bestimmten Verfahren wieder aufgetaut. Während dieses Auftauvorgangs kommt es jedoch häufig zur Bildung von Zellaggregaten, die dann für die Transplantation nicht mehr zur Verfügung stehen und die Effizienz und Wirksamkeit des Präparates mindern. Im Rahmen dieses Forschungsprojektes wurde eine Methode entwickelt, die Aggregatbildung zu verhindern und damit die Ausbeute transplantierbarer Zellen aus einem Präparat zu erhöhen.

Summary:

Effect of recombinant human deoxyribonuclease on the expression of cell adhesion molecules of thawed and processed cord blood hematopoietic progenitors

The integrity of granulocytic cells and platelets is compromised within cryopreserved stem cell transplants, and consequent DNA release during the thawing procedure can therefore lead to clotting phenomena or microaggregate formation that in turn causes progenitor cell loss. To circumvent this problem a new processing protocol was introduced by using recombinant human deoxyribonuclease I (rhDNase) for the prevention of cell aggregate formation, and the impact on CD34⁺ umbilical cord blood (UCB) cells was tested. At a minimal concentration of 10 U rhDNase per mL, clotting or microaggregate formation could be prevented for all tested samples, whereas cell clots could be observed for concentrations up to 8 U per mL. The expression of adhesion molecules L-selectin, LFA-1, and ICAM-1 untreated CD34⁺ UCB cells did not show any significant difference compared to cells that were incubated with up to 50 U per mL rhDNase. Therefore, the supplementation of rhDNase in a final concentration of 10 U per mL cell suspension is effective in preventing clot formation and does not lead to decreased expression levels of adhesion molecules.

Projektkennzahlen

Förderung:	Universität Heidelberg Eigenmittel
Laufzeit:	1 Jahr
Projektleitung:	Priv.-Doz. Dr. Hermann Eichler
Mitarbeiter:	Christian Beck (Arzt, Doktorand) Monika Latta (MTA)

Standort: Mannheim

Projektleitung:
Priv.-Doz. Dr. med.
Hermann Eichler

Kontakt:
Priv.-Doz. Dr. med. Hermann Eichler

**Institut für
Transfusionsmedizin und
Immunologie Mannheim**

**DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH**
Friedrich-Ebert-Straße 107
68167 Mannheim

Telefon
0621 – 3706 - 875

Fax
0621 – 3706 - 876

E-Mail
H.Eichler@blutspende.de

Aufreinigungsverfahren zur Anreicherung von CD34⁺ – Zellen aus Plazentarestblut-Transplantaten

Ziel des Projektes:

Es sollen Methoden zur Anreicherung von CD34⁺-Zellen aus getauten Plazentarestblut-Transplantaten entwickelt werden.

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Die Transplantation von Plazentarestblut bei erwachsenen Patienten ist durch die häufig zu geringe Zahl an transplantierbaren Zellen limitiert. Daher wird gegenwärtig intensiv an Methoden zur ex vivo-Expansion von hämatopoetischen Zellen aus Nabelschnurblut geforscht. Vor diesem Hintergrund beschäftigt sich dieses Forschungsprojekt mit der Entwicklung von präparativen Techniken zur Aufreinigung von CD34⁺- Zellen aus dem getauten Plazentarestblut-Transplantat. Die eine CD34-Selektion vorbereitenden Präparationsschritte an der getauten Zellsuspension konnten so optimiert werden, dass mehr als 80 % der kryokonservierten CD34⁺-Zellen gewonnen und der eigentlichen Aufreinigung zugeführt werden konnten. Mit der anschließenden CliniMACS-Selektion wurde für Progenitor-Zellen eine mittlere Wiederfindungsrate von bis zu 52 % bei einer Reinheit von bis zu 71 % erzielt. Eine vergleichbar hohe Zell-Recovery und Reinheit wurde für kryokonservierte Buffy-coat-Präparationen bislang nicht publiziert. Es konnte somit gezeigt werden, dass sich CD34⁺-Progenitoren effektiv aus getauten, volumenreduzierten Plazentarestblut-Transplantaten unter GMP-Bedingungen isolieren lassen.

Die biologische Funktion dieser selektierten CD34⁺-Zellen aus Nabelschnurblut wurde in einer tiereperimentellen Studie untersucht. Hierfür wurde an insgesamt sechs gepaarten Nabelschnurblut-Proben das Engraftment-Verhalten von CD34-selektierten und von nicht selektierten Zellen im NOD/SCID-Mausmodell verglichen, wobei den Tieren stets die gleiche Dosis an CD34⁺-Zellen verabreicht wurde. Dabei fand sich in der Gruppe der selektierten Proben eine eingeschränkte Engraftment-Kapazität im Vergleich zur nicht-selektierten Gruppe. Vor diesem Hintergrund wird diskutiert, ob die Frequenz sehr unreifer Stammzellen durch eine Selektion von CD34⁺-Zellen unter Umständen verringert wird oder ob sich das biologische Verhalten der Transplantate durch die Abreicherung akzessorischer Zellen im Rahmen der CD34-Selektion negativ verändert.

Die wichtigsten Ergebnisse

Es wurde eine effektive Methode entwickelt, CD34-Zellen aus getautem Plazentarestblut mit einer Reinheit von bis zu 71 % aufzureinigen.

Allgemeinverständlicher Überblick

Die Transplantation von Stammzellen aus Nabelschnurblut bei erwachsenen Patienten ist häufig durch die zu geringe Zahl an transplantierbaren Zellen limitiert. Daher wird gegenwärtig intensiv an Methoden zur Vermehrung dieser Zellen außerhalb des Organismus geforscht. Hierfür ist es unabdingbar, die Stammzellen zuvor aus aufgetauten Plazentarestblut-Transplantaten anzureichern. Im Rahmen dieses Forschungsprojektes wurde eine Methode entwickelt, mit der blutbildende Stammzellen in hoher Reinheit angereichert und für die Transplantation bzw. Expansion genutzt werden können.

Standort: Mannheim
Projektleitung:
Priv.-Doz. Dr. med.
Hermann Eichler

Summary:

NOD/SCID mice transplantation of volume reduced and thawed umbilical cord blood transplants following closed system immunomagnetic cell selection

Protocols for the expansion of umbilical cord blood progenitors need the selection of CD34⁺ cells from stored frozen and thawed units. A processing technique within a closed blood bag system for volume reduced UCB transplants by performing an immunomagnetic selection procedure was evaluated. In order to study the influence of CD34 selection procedure on the in vivo engraftment potential, paired NOD/SCID mice transplantation experiments with each CD34⁺ selected and unselected cells were performed. The purity of CD34⁺ cells after the selection procedure proved to be significantly correlated with the extent of removing the supernatant after the first washing step of the thawed unit, and therefore with an adequate removal of damaged or dead cells ($r = 0.86$, $p < 0.01$). In five experiments a sufficient CD34 cell purity of 71.1 percent, and a mean of 52 percent CD34⁺ cells could be recovered. However, paired NOD/SCID mice transplantation experiments indicate a potential impairment of engraftment capacity for the CD34⁺ enriched fraction.

Projektkennzahlen

Förderung:	Universität Heidelberg Industriemittel Eigenmittel
Laufzeit:	2 Jahre
Projektleitung:	Priv.-Doz. Dr. Hermann Eichler
Mitarbeiter:	Christian Beck (Arzt, Doktorand) Dipl.-Biol. Susanne Kern (Doktorandin) Monika Latta (MTA)
Kooperationen:	Dr. B. Schröder, MainGen, Frankfurt am Main

Kontakt:

Priv.-Doz. Dr. med. Hermann Eichler

**Institut für
Transfusionsmedizin und
Immunologie Mannheim**

**DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH**
Friedrich-Ebert-Straße 107
68167 Mannheim

Telefon
0621 – 3706 - 875

Fax
0621 – 3706 - 876

E-Mail
H.Eichler@blutspende.de

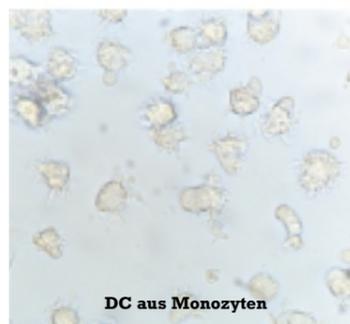
Dendritische Zellen (DC) aus CD34⁺- und CD14⁺-Zellen zur Immunvakzinierung

Ziel des Projektes:

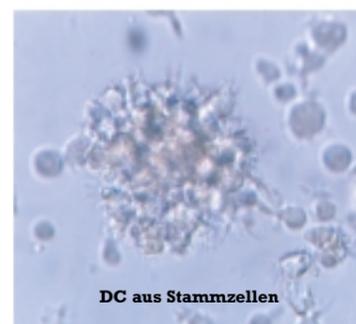
Die Ziele dieses Projektes liegen darin, generierte DC aus Monozyten (CD14-positive Zellen) oder Stammzellen (CD34-positive Zellen) aus Nabelschnurblut immunphänotypisch, funktionell und molekularbiologisch vergleichend zu untersuchen.

Die Studie soll weitere Erkenntnisse zur Optimierung einer Immuntherapie mit DC liefern.

Morphologie von dendritischen Zellen (DC)



DC aus Monozyten



DC aus Stammzellen

Hintergrund und Projektbeschreibung:

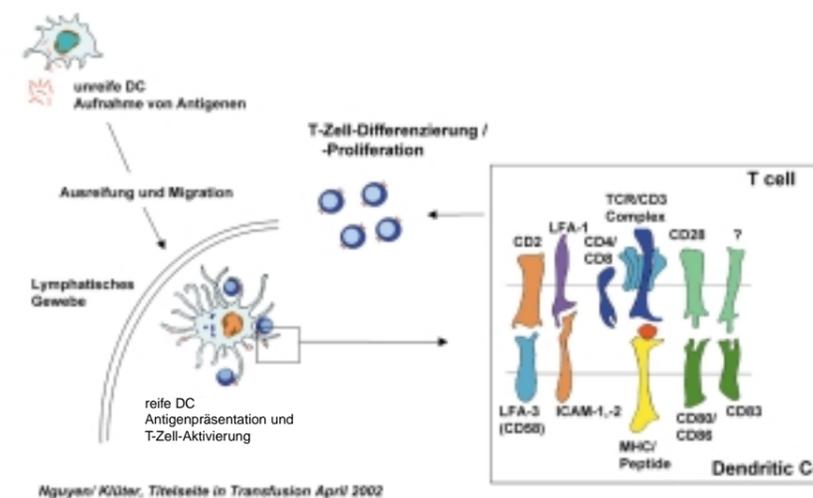
Dendritische Zellen (DC) sind effektive Antigen-präsentierende Zellen des lymphatischen und nicht-lymphatischen Gewebes. Sie gehören zu den potentesten Initiatoren der adaptiven Immunantwort, insbesondere bei der Einleitung von primären Antigen-spezifischen Immunreaktionen, in denen die nativen T-Zellen stimuliert werden. Aufgrund der Existenz von unterschiedlichen DC-Subpopulationen hinsichtlich der Toleranz und Immunität sind weitere Untersuchungen notwendig.

Im Rahmen dieses Projektes wurde die Gewinnung von Monozyten und Stammzellen zur Ausreifung zu dendritischen Zellen etabliert. Zur Funktionsüberprüfung der kultivierten DC wurden T-Zell-Stimulationsteste erarbeitet. Dabei wurde ein neues Testsystem zur exakten Quantifizierung der T-Zell-Proliferation am Durchflusszytometer entwickelt (Nguyen et. al, J Immunol Methods 2003). Die Ergebnisse zeigten, dass trotz der morphologischen Ähnlichkeit und gleichen Ausprägung des typischen DC-Markers (CD83) zwei unterschiedliche DC-Subpopulationen hinsichtlich der T-Zell-Stimulation, Antigen-Endozytose, Oberflächenmarker und Immungenetik existieren. Dabei liegt die Bereitschaft der Endozytose von löslichen Antigenen bei DC aus Monozyten signifikant höher als die von DC aus Stammzellen. Darüber hinaus scheint sich ein großer Teil der proliferierten T-Helfer-Zellen nach Stimulation mit DC aus Stammzellen zu T-Helfer-2-Zellen zu differenzieren. Hinsichtlich der Stimulation von zytotoxischen Zellen scheinen DC aus Stammzellen diese eher zu tolerieren als zu stimulieren. Dies hat insbesondere eine wichtige Bedeutung für den Einsatz dendritischer Zellen zur Tumor-Vakzinierung und zur Toleranzinduktion. Microarray-Untersuchungen von 10.000 Genen bestätigten in vielen Aspekten die phänotypische Analyse und lieferten Erklärungen für diese Beobachtungen. Weitere Bestätigungsuntersuchungen folgen.

Die wichtigsten Ergebnisse

Methoden zur Generierung von DC aus CD14-positiven (Monozyten) und CD34-positiven (Stammzellen) Zellen wurden etabliert. Zur Funktionsprüfung dieser Zellen wurde ein T-Zell-Proliferationstest entwickelt. Die Ergebnisse zeigen phänotypische, funktionelle und molekulargenetische Unterschiede von dendritischen Zellen aus CD34- bzw. CD14-Vorläuferzellen.

Aktivierung von T-Zellen durch dendritische Zellen (DC)



Nguyen/ Küter, Titelseite in Transfusion April 2002

Allgemeinverständlicher Überblick

„Dendritische Zellen“ (DC) bilden eine besondere Zellgruppe im zellulären Immunsystem. Sie sind mit bäumchenartigen Zellausläufern ausgestattet. Diese dendritischen Zellen (DC) sind einzigartig in ihrer Eigenschaft, bestimmte Immunzellen, die so genannten T-Zellen, Antigen-spezifisch zu aktivieren. Diese Eigenschaft macht sie für den Einsatz in der Immuntherapie von Tumorerkrankungen interessant. Es gibt jedoch auch weitere Subpopulationen von DC, die die T-Zellen hemmen oder tolerieren. Im Rahmen dieses Forschungsprojektes wurden unterschiedliche Vorläuferzellen isoliert und zu DC generiert. Je nach Vorläuferzelle entwickeln sich dabei DC mit unterschiedlichen Eigenschaften.

Summary:

Dendritic cells derived from CD34⁺ and CD14⁺ cells for immunovaccination

Dendritic cells (DC) are the most potent antigen-presenting cells and specialized to activate native T lymphocytes. DCs can be generated in vitro from blood progenitor cells such as CD34-positive and CD14-positive cells. Recently, the use of DCs has opened a new field in the immunotherapy of cancer. However, many subpopulations of DC with different functions have been shown to act on native T cells to differentiate to distinct T cell subsets. Notably, the existence of many dendritic subpopulations requires further functional investigation.

The aims of this study are to investigate CD14-derived and CD34-derived DC from cord blood in their morphological, phenotypical, functional and moleculargenetical aspects.

Projektkennzahlen

Förderung:	Universität Heidelberg Eigenmittel
Laufzeit:	1 Jahr
Projektleitung:	Dr. Xuan-Duc Nguyen
Mitarbeiter:	Günter Gerlich
Kooperationen:	Prof. Dr. D. Schadendorf (DKFZ, Universitätsklinikum Mannheim) PD Dr. H. Kropshofer (Roche Center for Medical Genomics, F Hoffmann-La Roche Ltd) PD Dr. H. Eichler, Dr. P. Bugert

Kontakt:

Dr. med. Xuan-Duc Nguyen

Institut für
Transfusionsmedizin und
Immunologie Mannheim

DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH
Friedrich-Ebert-Straße 107
68167 Mannheim

Telefon
0621 – 3706 – 8219

Fax
0621 – 3706 – 876

E-Mail
x.nguyen@blutspende.de

Adoptive Immuntherapie mit NK-Zellen nach haploidenter Blutstammzelltransplantation

Ziel des Projektes:

Eine adoptive Immuntherapie mit hochgereinigten Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) nach haploidenter Blutstammzelltransplantation zur Induktion und Verbesserung der Immunantwort sowohl gegen Tumorzellen als auch gegen Infektionserreger ist Ziel dieses Projektes.

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Die Übertragung von Lymphozyten des Knochenmark-/Stammzellspenders nach allogener Transplantation ist eine sehr effektive Behandlungsmethode zur Prophylaxe bzw. Therapie eines Rezidivs der malignen Grunderkrankung. Diese Behandlung ist allerdings mit einem hohen Risiko einer schweren Spender-gegen-Wirt-Reaktion (graft-versus-host-reaction) verbunden. Zur Vermeidung dieser Komplikation wurden deshalb im Rahmen einer Pilotstudie bei HLA-identer Transplantation hochgereinigte CD4-positive T-Lymphozyten verabreicht, die bei Patienten mit Plasmozytom und chronisch myeloischer Leukämie ebenfalls einen Anti-Tumor-Effekt (graft-versus-leucemia-reaction) zeigten.

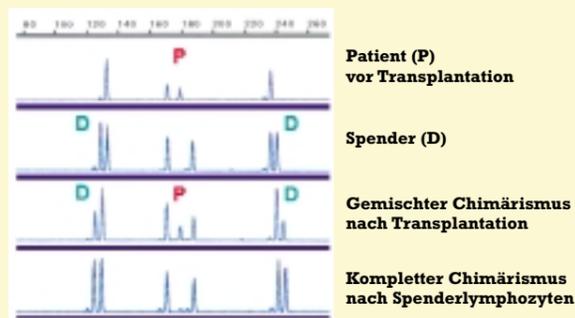
CD4-positive Zellen sind eine durch bestimmte Eigenschaften charakterisierte Untergruppe der T-Lymphozyten, die eine zentrale Stellung in der Immunabwehr einnehmen. Sie regen B-Zellen zur Produktion von Antikörpern an, wirken unterstützend bei der Zerstörung körperfremder Strukturen durch zytotoxische (zellvernichtende) T-Zellen und bilden eine Reihe von Botenstoffen, so genannte Lymphokine, durch die u. a. die Immunabwehr durch andere Immunzellen aktiviert wird.

Bei haploidenter, also HLA-nichtidenter Transplantation, ist die Gabe von T-Zellpopulationen aufgrund des nicht kalkulierbaren Risikos einer schweren graft-versus-host-reaction nicht sinnvoll, so dass bei diesen Patienten als adoptive Immuntherapie hochgereinigte Natürliche Killerzellen (NK) transfundiert werden sollen. Diese sollen einen Anti-Tumor-Effekt induzieren, durch eine beschleunigte Immunrekonstitution das Infektionsrisiko nach Transplantation verringern und das Risiko einer schweren graft-versus-host-reaction minimieren.

Natürliche Killerzellen sind ein wichtiger Bestandteil der immunologischen Abwehr sowohl von Tumorzellen als auch von Infektionserregern. Sie treten in der frühen Immunrekonstitution nach Transplantation auf und exprimieren den Marker CD56. Diese CD56-positiven Zellen wurden im Rahmen des Projektes mit einem Immunmagnetverfahren selektiert. Ca. 60 % der Zellen wurden bei diesem Reinigungsverfahren wiedergewonnen; der Anteil CD3-positiver T-Zellen lag bei etwa 30 %. Durch weitere Selektionsverfahren wie Immunmagnetdepletion oder Rosettierungsverfahren wurde der T-Zellgehalt auf unter 0,5 % gesenkt.

Zur Erfolgsbeurteilung einer NK-Zellen- bzw. Lymphozytentransfusion als Immuntherapie nach allogener Blutstammzelltransplantation wurde zur Chimärismusbestimmung eine neue DNA-analytische Methode für einen quantitativen bzw. semiquantitativen Nachweis von Short-Tandem-Repeat-Polymorphismen (STR) mit hoher Auflösung etabliert.

Chimärismus-Analyse vor/nach Lymphozytentransfusion (STR)



Standort: Ulm
Projektleitung:
Dr. med.
Markus Wiesneth

Die wichtigsten Ergebnisse

In einer Pilotstudie wurde gezeigt, dass die Gabe CD4-positiver Lymphozyten bei HLA-identer Stammzelltransplantation das Risiko einer schweren graft-versus-host-reaction reduzieren kann. Die Transfusion von NK-Zellen soll als Strategie zur Vermeidung derselben Komplikation bei Transplantation HLA-nichtidenter Stammzellen untersucht werden. Hierfür wurde ein immunmagnetisches Verfahren zur Selektion von CD56⁺/CD3⁻ (NK)-Zellen entwickelt, das die Herstellung hochgereinigter NK-Zellpräparate für den klinischen Einsatz ermöglicht.

Allgemeinverständlicher Überblick

Die Übertragung von Lymphozyten des Spenders nach allogener Transplantation, also nach Transplantation von einem Individuum (einer Art) auf ein anderes, ist eine wirksame Behandlungsmethode zur Prophylaxe eines Rezidivs (Wiederauftreten) einer Krebserkrankung. Problematisch ist dies allerdings aufgrund der Gefahr einer schweren Spender-gegen-Wirt-Reaktion, also einer Abwehrreaktion der Spenderzellen gegen den Empfängerorganismus. Handelt es sich bei der Transplantation um eine nicht HLA-identer Transplantation, ist das Risiko einer solchen Reaktion so groß, dass hier andere Wege beschritten werden müssen.

Das Ziel der Arbeitsgruppe ist es, als quasi „alternative“ Immuntherapie hochgereinigte NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) zu transfundieren, die sowohl eine Anti-Tumor-Wirkung ausüben als auch zu einer verbesserten Immunabwehr beitragen sollen, um das Infektionsrisiko des Empfängers nach Transplantation zu verringern. Gleichzeitig soll durch dieses Verfahren das Risiko einer schweren Spender-gegen-Wirt-Reaktion minimiert werden.

Die Natürlichen Killerzellen gehören zum unspezifischen Abwehrsystem des Menschen. Sie erkennen Veränderungen an der Oberfläche von Tumorzellen oder virusbefallenen Körperzellen, dringen in diese ein und töten sie ab. Der Virus kann sich nicht mehr vermehren und wird für das Abwehrsystem angreifbar gemacht.

Summary:

Natural killer cells for adoptive immunotherapy after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation

The aim of the project is to develop an adoptive immunotherapy with highly purified natural killer cells (NK) and to improve immune response against tumor cells and infectious agents following haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. To prevent a severe graft-versus-host disease a sequential, double immunomagnetic technique was established to select for CD56⁺/CD3⁻ (NK) cells which are suitable for clinical application.

Projektkennzahlen

Förderung:	Universität Ulm
Laufzeit:	2000 bis 2001
Projektleitung:	Dr. Markus Wiesneth
Mitarbeiter:	Dr. Anita Schmitt Birgit Maccari Christine Ulmann
Kooperationen:	PD Dr. D. Bunjes (Abteilung Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Ulm) PD Dr. W. Friedrich (Abteilung Kinderheilkunde, Universitätsklinikum Ulm)

Weiterführende Informationen:

Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic transplants. Ruggeri K., Capanni M., Urbani E. et al. – Science 295:2097 (2002)

T-cell therapy of leukemia. – Riddell SR., Murata M., Bryant S. and Warren EH. – Cancer Control 2:114 (2002)

Alloreactive killer cells: hindrance and help for hematopoietic transplants. Parham P. and McQueen KL. – Nat. Rev. Immunol (submitted)

www.ebmt.org, www.bmtctn.net, www.celltherapy.org, www.drst.de, www.haplo.org

Kontakt:

Dr. med. Markus Wiesneth

Institut für Klinische
Transfusionsmedizin und
Immunogenetik Ulm gGmbH

DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH
Helmholtzstraße 10
89081 Ulm

Telefon
0731 – 150 - 520

Fax
0731 – 150 - 500

E-Mail
m.wiesneth@blutspende.de

Immuntherapie mit Removall™: Untersuchung der antitumoralen Wirkung eines bispezifischen trifunktionalen Antikörperkomplexes im Chorioallantois-Modell

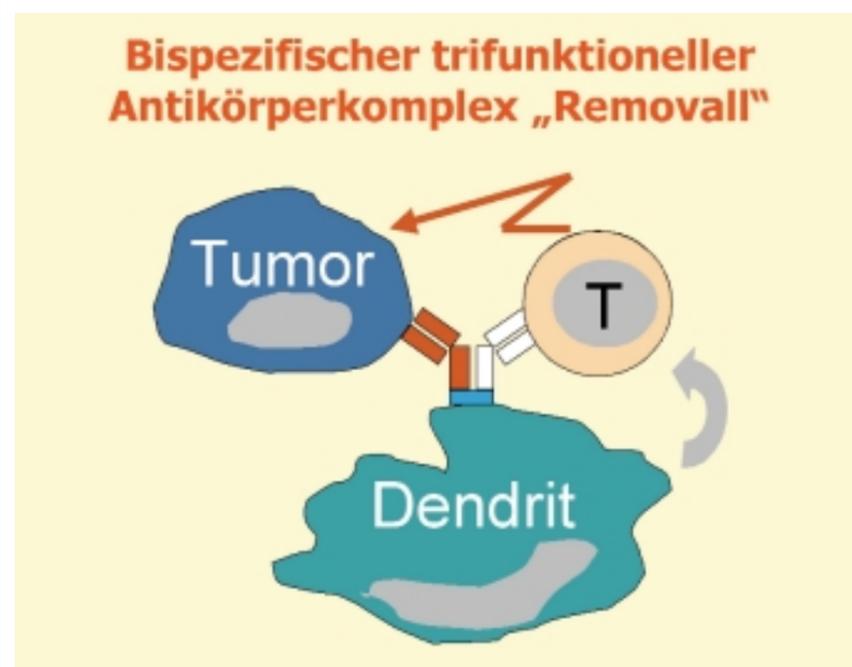
Ziel des Projektes:

Es sollen der in vitro-Nachweis der Antitumorwirkung eines bispezifischen trifunktionalen Antikörpers in Verbindung mit autologen Lymphozyten etabliert und eine Phase-I-Studie initiiert werden, in der der Antitumoreffekt bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom durch die mit Antikörper beladenen autologen Lymphozyten untersucht werden soll. Die Voraussetzungen für eine GMP-gerechte Herstellung unter Reinraumbedingungen werden dabei erfüllt.

Hintergrund und Projektbeschreibung:

In enger Kooperation mit der Universitätsklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde und der Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Universitätsklinik Ulm wurde die antitumorale Wirkung eines bispezifischen trifunktionalen Antikörperkomplexes (Removall™) bei Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes in einem Chorioallantois-Modell mit Hühnereiern untersucht. Basierend auf diesen Ergebnissen wird eine klinische Phase-I-Studie zur Gabe autologer zytotoxischer T-Zellen im Verbund mit dem Antikörperkomplex und ex vivo-Aktivierung initiiert. Dieser Antikörperkomplex bindet spezifisch Tumorzellen und T-Zellen sowie über die Fc-Region Effektorzellen wie Makrophagen oder dendritische Zellen. Ziel ist es, durch Bindung und sterische Anordnung von Tumorzelle, T-Zelle und Effektorzelle eine spezifische zytotoxische und somit effektive Antitumorwirkung zu erzielen.

Die ersten Ergebnisse bestätigen, dass das Chorioallantois-Modell ein zuverlässiges und aussagekräftiges Modell darstellt, das Untersuchungen zu einer spezifischen zytotoxischen Immunantwort gegen Tumorzellen erlaubt. Der Antikörperkomplex induziert in Verbindung mit autologen peripheren Blutlymphozyten eine Tumorzellapoptose bei 80 % der Plattenepithelkarzinom-Zellen von 25 Patienten. Die Aktivierung der T-Zellen ließ sich durch Interferon- γ -Produktion im Elispot-Assay nachweisen. Diese immunmedierte Tumorzell-Lyse erreichte den gleichen zytotoxischen Effekt wie eine Zytostatikainkubation.



Standort: Ulm
Projektleitung:
Dr. med.
Markus Wiesneth

Die wichtigsten Ergebnisse

Der bispezifische trifunktionelle Antikörperkomplex (Removall™) induzierte in Verbindung mit autologen peripheren Blutlymphozyten über eine Aktivierung der T-Zellen eine Tumorzellapoptose (Apoptose = programmierter Zelltod) bei Plattenepithelkarzinom-Zellen, die mit dem Effekt von Zytostatika vergleichbar ist. Die Aktivierung der T-Zellen ließ sich durch eine Interferon- γ -Produktion im Elispot-Assay nachweisen.

Allgemeinverständlicher Überblick

Um die antitumorale Wirkung bestimmter Behandlungsstrategien untersuchen zu können, werden Zellmodelle benötigt, die eine Übertragung der beobachteten Wirksamkeit auf die klinische Auswirkung beim Menschen zulassen. In diesem Fall wurde zum ex vivo-Nachweis, also außerhalb des Organismus, ein Chorioallantois-Modell gewählt. Die Chorioallantois ist die Haut, die das Hühnerembryo umgibt, in die Gefäße einsprossen und durch die Sauerstoff und Nährstoffe vom Embryo aufgenommen werden. In der ersten Phase des Projektes wurde nachgewiesen, dass das Modell ein zuverlässiges und aussagekräftiges autologes System darstellt, das Untersuchungen mit menschlichen Zellen im Hinblick auf eine antitumorale Wirkung von Substanzen erlaubt. In einer ersten Studienphase am Menschen, einer Phase-I-Studie, soll nun der im Zellmodell nachgewiesene antitumorale Effekt von autologen Lymphozyten, die mit Antikörpern gegen Tumorzellen beladen wurden, bei Patienten mit Plattenepithelkarzinom überprüft werden.

Summary:

Investigation of the antitumor effect of the bispecific trifunctional antibody Removall™ on the chorioallantois membrane model

This project demonstrates the antitumor effect of autologous lymphocytes opsonized with a bispecific trifunctional antibody on the chorioallantois membrane (CAM) of chicken eggs as an in vivo model. The antibody bridging between tumor cells, T-cells and antigen presenting cells leads to an enhanced lysis of tumor cells by a specific cytotoxic T-cell response against antigen bearing carcinoma cells which is comparable to the effect of cytotoxic drugs. A clinical study is now intended for this new approach of cellular immunotherapy.

Projektkennzahlen

Förderung:	Industriemittel
Laufzeit:	2001 bis 2003
Projektleitung:	Dr. Markus Wiesneth
Mitarbeiter:	Dr. Peter Reinhardt Dr. Anita Schmitt Marlies Götz Birgit Maccari
Kooperationen:	Dr. M. Schmitt (Abteilung Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Ulm) PD Dr. H. Riechelmann (HNO-Klinik, Universitätsklinikum Ulm) Dr. S. Gronau (HNO-Klinik, Universitätsklinikum Ulm) Dr. P. Müller (Fresenius HemoCare, Gräfeling)

Weiterführende Informationen:

Efficient tumor cell lysis by autologous, tumor-resident T lymphocytes in primary ovarian cancer samples by an EP-CAM-/CD3-bispecific antibody Wimberger P, Xiang W, Mayr D. et al. Int J Cancer 105:241-248 (2003)

Efficient carcinoma cell killing by activated polymorphonuclear neutrophils targeted with an Ep-CAMxCD64 (HEA125x197) bispecific antibody. Schweizer C., Strauss G., Lindner M. et al. Cancer Immunol Immunother 51:621-629 (2002)

Visualization of effective tumor targeting by CD8⁺ natural killer T cells: redirected with bispecific antibody F(ab')(2)HER2xCD3. Scheffold C., Kornacker M., Scheffold YC et al. Cancer Res.62:5785-5791 (2002)

Kontakt:

Dr. med. Markus Wiesneth

Institut für Klinische
Transfusionsmedizin und
Immungenetik Ulm gGmbH

DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH
Helmholtzstraße 10
89081 Ulm

Telefon
0731 – 150 - 520

Fax
0731 – 150 - 500

E-Mail
m.wiesneth@blutspende.de

Charakterisierung von immunogenen leukämieassoziierten Antigenen zur Entwicklung einer Vakzine

Ziel des Projektes:

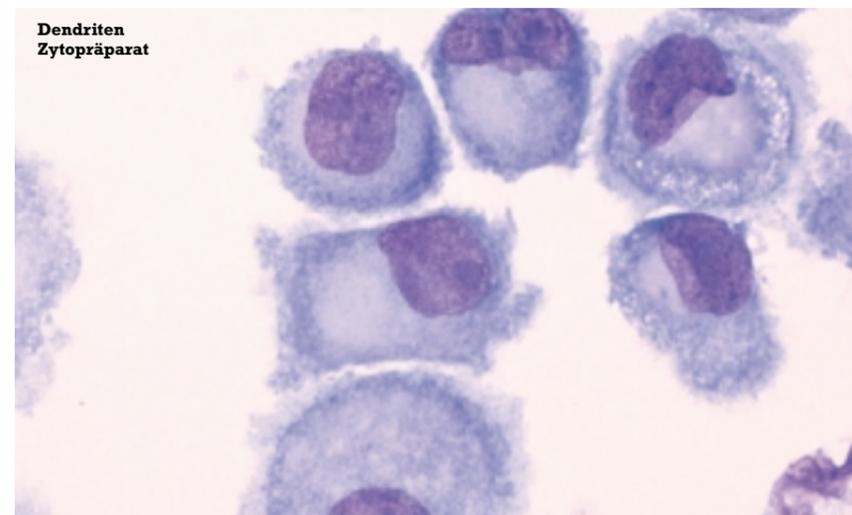
Ziel des Projektes ist die Charakterisierung von immunogenen leukämieassoziierten Antigenen bei myeloischer Leukämie und des spezifischen Antigenprofils von Nierenzell- und Prostatakarzinomen zur Entwicklung einer Vakzinierungstherapie.

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Eine wesentliche Aufgabe in der Krebsforschung ist die Charakterisierung spezifischer Merkmale von Krebszellen, um eine gezielte Behandlung von Tumoren mit möglichst geringer Schädigung körpereigener gesunder Zellen zu ermöglichen. Ziel dieses Projektes ist es daher, spezifische Antigene (Oberflächenmerkmale) sowohl der myeloischen Leukämie als auch der Nierenzell- und Prostatakarzinome nachzuweisen. Sind die Antigene charakterisiert, wird in einem zweiten Forschungsabschnitt versucht, den Nachweis einer spezifischen Induktion von zytotoxischen (zelltötenden) T-Lymphozyten (CTL) gegen diese Antigene zu erbringen, um diese in einem klinischen Vakzinierungskonzept mit dendritischen Zellen als antigenpräsentierende Zellen einzusetzen.

Die wichtigsten Ergebnisse

Bei 75 % der Patienten mit akuter myeloischer Leukämie konnten dendritische Zellen aus leukämischen Blasten generiert werden, die zumindest ein Leukämie-assoziiertes Antigen, d. h. WT-1, PRAME oder RHAMM aufweisen und somit eine spezifische zytotoxische T-Zellreaktion gegen die Leukämie induzieren können.



Allgemeinverständlicher Überblick

Das Ziel der Arbeitsgruppe besteht darin, durch die Bestimmung spezifischer Antigenmerkmale der verschiedenen Krebszellen eine Vakzinierung (Impfung) zu ermöglichen. Durch die Gabe von spezifischen Antigenen soll es zur Bildung von Antikörpern und damit zu einer Immunreaktion des Organismus gegen den Tumor kommen.

„Dendritische Zellen“ ist der Oberbegriff für eine erst in jüngster Zeit als eigene Zellgruppe definierte Zellart mit astartigen Zellausläufern. Mit diesen Zellausläufern können sie den immunkompetenten Lymphozyten Antigen-Komplexe präsentieren und damit eine Immunantwort hervorrufen.

Summary:

Characterization of immunogenic leukemia associated antigens for the development of anti-tumor vaccines.

The aim of the project is the characterization of immunogenic leukemia or tumor associated antigens for the development of specific strategies for anti-tumor vaccination. Dendritic cells (DC) generated from leukemic blasts show the preservation of at least one leukemia associated antigen, e. g. WT-1, PRAME or RHAMM and should induce a specific T-cell response against leukemic cells in vivo. Based on these results a clinical study is ongoing administering autologous DC to patients with refractory acute myeloid leukemia.

Projektkennzahlen

Förderung:	Eigenmittel
Laufzeit:	kontinuierlich
Projektleitung:	Dr. Michael Schmitt (Abteilung Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Ulm) Dr. Markus Wiesneth
Mitarbeiter:	Dr. Peter Reinhardt Dr. Anita Schmitt
Kooperationen:	Dr. J. Greiner (Abteilung Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Ulm) Dr. M. Ringhoffer (Abteilung Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Ulm) PD Dr. J. Gschwend (Abteilung Urologie, Universitätsklinikum Ulm)

Weiterführende Informationen:

Immunobiology: The immune system in health and disease. 5th ed. Janeway C. and Travers P. New York: Garland Publ. Inc. (2002)

Cancer vaccines based on the identification of genes encoding cancer regression antigens. Rosenberg SA. Immunol Today 18:175-182 (1997)

Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. Sahin U., Türeci Ö., Schmitt H. et al. Proc Natl Acad Sci USA 92:11810-11813 (1995)

Kontakt:

Dr. med. Markus Wiesneth

**Institut für Klinische
Transfusionsmedizin und
Immungenetik Ulm gGmbH**

**DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH**
Helmholtzstraße 10
89081 Ulm

Telefon
0731 – 150 - 520

Fax
0731 – 150 - 500

E-Mail
m.wiesneth@blutspende.de

Autologe dendritische Zellen zur Behandlung therapierefraktärer akuter myeloischer Leukämie

Ziel des Projektes:

Autologe dendritische bzw. antigenpräsentierende Zellen aus leukämischen Blasten sollen als Basis einer Vakzinierungstherapie bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie generiert werden.

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Dendritische Zellen sind von zentraler Bedeutung für die Induktion einer antigen-spezifischen, auf den „Major Histocompatibility Complex“ (MHC) beschränkten T-Zellimmunreaktion. Die Gengruppe des „Major Histocompatibility Complex“ auf Chromosom 6 codiert das HLA-System und ist damit ein zentrales Element der Steuerung des Immunsystems.

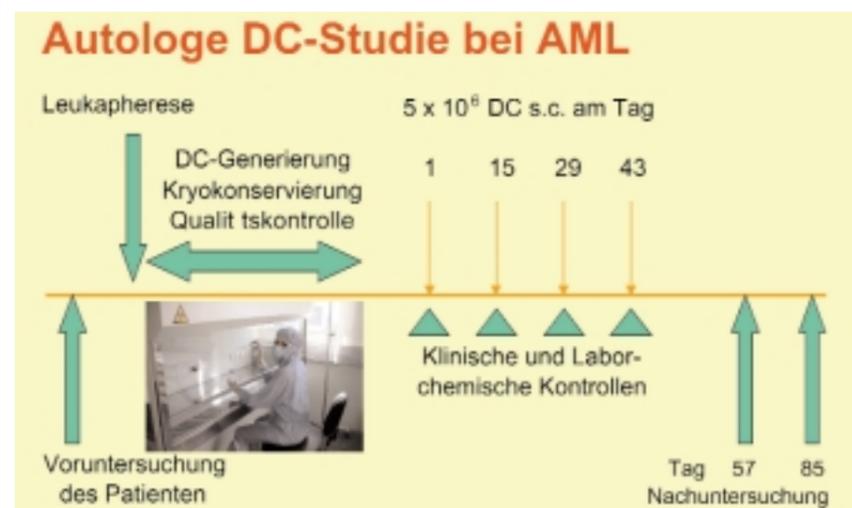
In Tierversuchen und klinischen Studien wurde gezeigt, dass tumorantigenbeladene dendritische Zellen eine spezifische, gegen den Tumor gerichtete T-Zellantwort induzieren und zumindest zu einer Tumorregression führen können. Bei myeloischen Leukämien haben dendritische Zellen den gleichen Vorläufer wie die Leukämiepopulation, so dass von diesen Patienten generierte dendritische Zellen möglicherweise autochthone leukämiespezifische Proteine aufweisen, bei Applikation dem Immunsystem präsentieren und somit zu einer spezifischen zytotoxischen Anti-Tumor-Reaktion führen.

In Vorversuchen ließen sich bei 19 von 25 Patienten mit akuter myeloischer Leukämie dendritische bzw. antigenpräsentierende Zellen generieren. Für den klinischen Einsatz wurde mit Hilfe einer Leukozytapherese eine große Anzahl an mononukleären Zellen aus dem Blut von bisher 3 Patienten gewonnen. Mit modernen Zellkulturverfahren wurden daraus unter Reinraumbedingungen dendritische Zellen hergestellt und in vierzehntägigen Abständen subkutan injiziert. Ausgehend von der Leukozytapherese ließ sich in dieser Studie eine ausreichend große Anzahl autologer dendritischer Zellen gewinnen. Die Applikation dieser Zellen führte zu einer spezifischen immunologischen anti-Leukämie-Reaktion.

Die wichtigsten Ergebnisse

Dendritische Zellen konnten aus Leukämiezellen in ausreichender Form gewonnen, kryokonserviert und bei Patienten appliziert werden.

Die Untersuchungsergebnisse geben Hinweise auf einen Vakzinierungseffekt bei Patienten mit myeloischer Leukämie. Der klinische Erfolg dieser Vakzinierung soll in einer laufenden Studie nachgewiesen werden.



Allgemeinverständlicher Überblick

„Dendritische Zellen“ (DC) ist der Oberbegriff für eine erst in jüngster Zeit als eigene Zellgruppe definierte Zellart mit astartigen Zellausläufern. Mit diesen Zellausläufern können sie den immunkompetenten Lymphozyten Antigen-Komplexe präsentieren und damit eine Immunantwort hervorrufen. DC sind einzigartig in ihrer Effizienz, T-Zellen antigenspezifisch zu aktivieren oder zu hemmen.

Die „Apherese“ ist ein Verfahren, mit dem alle Arten von Blutzellen wie Leukozyten, Thrombozyten oder Stammzellen durch Zentrifugation aus dem Blut extrahiert werden können. Dadurch, dass das restliche Blut, insbesondere die roten Blutkörperchen, dem Patienten sofort wieder zurückgegeben werden und nur eine sehr kleine Menge gezielt entnommen wird, ist dieses Verfahren besonders gut verträglich.

In dieser Studie wurden durch eine Leukozytapherese von Patienten Leukämiezellen entnommen und mit Hilfe von Zellkulturverfahren dendritische Zellen (DC) gewonnen. Später wurden die „gezüchteten“ DC den Patienten subkutan injiziert und geprüft, ob sich hierdurch ein Vakzinierungseffekt, also eine Immunisierung gegen die Leukämie, hervorrufen ließ. Ein entscheidender Vorteil eines solchen Verfahrens, bei dem als Grundlage einer „Immunisierung“ gegen bestimmte Krebszellen körpereigene dendritische Zellen dienen, ist die Vermeidung einer Abstoßungsreaktion gegen fremde Zellen.

Die akute myeloische Leukämie macht ca. 80 Prozent der akuten Leukämien im Erwachsenenalter aus und ist die zweithäufigste Leukämie des Kindesalters. Sie entsteht durch eine maligne Transformation einer myeloisch (Knochenmark-) determinierten Stammzelle.

Summary:

Autologous dendritic cells for therapy of patients with refractory acute myeloid leukemia

This project shows that dendritic cells (DC) can be raised from leukemic cells in patients with acute myeloid leukemia, and can be cryopreserved in liquid nitrogen.

Generation of DC concentrates for in vivo application was established under clean room conditions according to GMP-guidelines.

In vivo DC vaccination results in an increased immunological anti-leukemic response and will be further investigated in an ongoing clinical trial.

Projektkennzahlen

Förderung:	Universität Ulm Eigenmittel
Laufzeit:	seit 2001
Projektleitung:	Dr. Markus Wiesneth
Mitarbeiter:	Dr. Peter Reinhardt Dr. Anita Schmitt Birgit Maccari
Kooperationen:	Dr. M. Schmitt (Abteilung Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Ulm) Dr. M. Ringhoffer (Abteilung Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Ulm)

Weiterführende Informationen:

Identification of precursors of leukemic dendritic cells differentiated from patients with acute myeloid leukemia. Mohty M., Isnardon D., Blaise D. et al. Leukemia 16:2267-2274 (2002)

The dendritic cell system and its role in immunogenicity. Steinman RM. Annu Rev Immunol. 9:271-296 (1991)

Induction of leukemia-specific cytotoxic response by cross-presentation of late-apoptotic leukemic blasts by autologous dendritic cells of nonleukemic origin. Spisek R., Chevallier P., Morineau N. et al. Cancer Res. 62:2861-2868 (2002)

csi.washington.edu/education/info/dendritic.html
www.dc2002.de



Dendritische Zelle
x 2000

Kontakt:

Dr. med. Markus Wiesneth

Institut für Klinische
Transfusionsmedizin und
Immunogenetik Ulm gGmbH

DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH
Helmholtzstraße 10
89081 Ulm

Telefon
0731 – 150 - 520

Fax
0731 – 150 - 500

E-Mail
m.wiesneth@blutspende.de

Transdifferenzierung genetisch markierter adulter humaner Stammzellen zu Kardiomyozyten

Ziel des Projektes:

Eine klinische Studie zur Myokardregeneration durch die Transdifferenzierung von autologen hämatopoetischen Stammzellen zu Kardiomyozyten bei Patienten mit schwerer Kardiomyopathie soll initiiert werden.

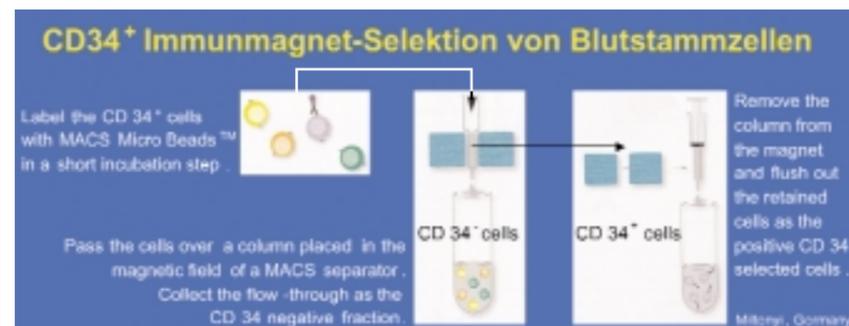
Hintergrund und Projektbeschreibung:

In Zusammenarbeit mit der Abteilung Kardiologie des Universitätsklinikums Ulm wird ein Stammzellprojekt vorbereitet, bei dem autologe hämatopoetische Stammzellen genetisch markiert und zur in vivo-Transdifferenzierung zu Kardiomyozyten bei Patienten mit schwerer dilatativer Kardiomyopathie eingesetzt werden sollen. Es soll untersucht werden, inwieweit autologe hämatopoetische CD34-positive Stammzellen bei Patienten mit schweren Myokardschäden zu einer Regeneration des Myokards führen.

Der Nachweis der Transdifferenzierung hämatopoetischer Stammzellen zu Kardiomyozyten soll über eine genetische Markierung mit Nukleofektion erfolgen. Die Transfektionsversuche mit CD34-positiven Zellen verliefen sehr viel versprechend und zeigten, dass die genetisch markierten Zellen zu reifen hämatologischen Zellen ausdifferenzieren.

Als Nächstes sollen die rechtlichen Voraussetzungen zur intrakoronaren Applikation dieser Zellen im Rahmen einer klinischen Studie geschaffen werden. Sobald die rechtlichen Grundlagen gegeben sind, soll bei Patienten mit schwerer dilatativer Kardiomyopathie die Transdifferenzierung der markierten CD34-positiven Zellen zu Kardiomyozyten nachgewiesen und geprüft werden, ob damit auch eine klinische Verbesserung der kardialen Funktion erreicht werden kann.

Der Gewebeersatz durch Transdifferenzierung von hämatopoetischen Stammzellen stellt möglicherweise eine richtungweisende Behandlungsmethode für verschiedene, bisher schwer therapierbare Erkrankungen unterschiedlichster Zellsysteme dar.



Die wichtigsten Ergebnisse

Erste Transfektionsversuche zur genetischen Markierung von CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen verliefen erfolgreich. Damit ist die Grundlage für eine klinische Studie gelegt, um bei Patienten mit schweren Myokardschäden eine Transdifferenzierung von autologen hämatopoetischen Stammzellen zu Kardiomyozyten und damit eine Regeneration des Myokards nachweisen zu können.

Allgemeinverständlicher Überblick

Der Gewebeersatz durch Transdifferenzierung von körpereigenen (autologen) adulten Stammzellen könnte eine wegweisende Therapieoption der Zukunft darstellen. Stammzellen sind eine Art „Mutterzellen“, aus denen sich alle Zellen des Organismus ableiten. Sie zeichnen sich durch zwei Fähigkeiten aus: Sie können sich unbegrenzt vermehren, d.h. dauerhaft selbst erneuern, und sie sind fähig, hoch differenzierte Nachkommenszellen zu produzieren.

Die blutbildenden – hämatopoetischen – Stammzellen sind durch mehrere Oberflächenmerkmale charakterisiert. Eines dieser Merkmale ist CD34 (CD34-positive Zellen), das auf den meisten hämatopoetischen Stammzellen zu finden ist.

Ziel des Forschungsprojektes ist es, die gezielte Transdifferenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu gewünschten Zelltypen wie Herzmuskelzellen zu vermitteln und zu belegen. So ließen sich zahlreiche Erkrankungen, die auf der Schädigung bzw. Zerstörung bestimmter Zelltypen beruhen, erfolgreich behandeln, da hämatopoetische Stammzellen auch bei Erwachsenen in ausreichendem Maße verfügbar sind.

Summary:

Transdifferentiation of genetic labeled adult hematopoietic stem cells to cardiomyocytes

The aim of this project is to initiate a clinical study for in vivo transdifferentiation of hematopoietic stem cells to cardiomyocytes in patients with severe cardiomyopathy. Transient genetic labeling of purified hematopoietic stem cells by nucleofection was established in vitro to investigate the homing and transdifferentiation capacity in vivo. Colony forming assays show that genetic labeling of the stem cells does not impair hematopoietic differentiation in vitro.

Projektkennzahlen

Förderung:	Universität Ulm
Laufzeit:	seit 2002
Projektleitung:	PD Dr. Jan Torzewski (Abteilung Kardiologie, Universitätsklinikum Ulm) Dr. Markus Wiesneth
Mitarbeiter:	Dr. Klaus Schwarz Juliane Hilker (Abteilung Kardiologie, Universitätsklinikum Ulm)
Kooperationen:	Dr. J. Greiner (Abteilung Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Ulm) Dr. M. Schmitt (Abt. Hämatologie und Onkologie, Universitätsklinikum Ulm)

Weiterführende Informationen:

Differentiation plasticity of hematopoietic stem cells. Graf T. Blood 9:3089 (2002)

Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction. Assmus B., Schächinger V., Teupe C. et al. Circulation 106:r53 (2002)

www.stemcellresearch.org

www.nih.gov/news/stemcell

www.bio-ethics.com

www.eurekalert.org

Kontakt:

Dr. med. Markus Wiesneth

Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immunogenetik Ulm gGmbH

DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gGmbH
Helmholtzstraße 10
89081 Ulm

Telefon
0731 – 150 - 520

Fax
0731 – 150 - 500

E-Mail
m.wiesneth@blutspende.de

„ **Wenngleich die den meisten Immundefekten zugrunde liegenden molekularen Veränderungen bekannt sind, bedeutet dies noch lange nicht, daß man sie ohne weiteres korrigieren könnte. Bevor sich die Gentherapie bei Immundefekten allgemein durchsetzt, wird man noch einiges über die Steuerung dieses komplexen Systems lernen müssen.** **“**

Rainer Flöhl
Angeborene Immundefekte besser zu behandeln
Frankfurter Allgemeine Zeitung, 15.01.2003

Gentherapie angeborener Erkrankungen des Blutes

Das Ziel der gentherapeutischen Forschung ist die Entwicklung von Ansätzen einer kausalen Therapie genetisch bedingter Erkrankungen. Prinzipiell lassen sich hierbei zwei verschiedene methodische Strategien unterscheiden: Entweder wird der Defekt im betroffenen Gen korrigiert und seine Funktion dadurch wieder hergestellt, oder aber das defekte Gen wird funktionell durch eine intakte Genkopie substituiert, die entweder in das Genom integriert wird oder aber als extrachromosomale DNA in Form eines Plasmids vorliegen kann. Dieser Ansatz wird heute von den meisten Gentherapieprotokollen verfolgt, da eine gezielte Reparatur molekularer Defekte bei vielen der für eine Gentherapie in Frage kommenden genetischen Erkrankungen gegenwärtig noch nicht möglich ist.

Eine der genetisch bedingten Erkrankungen, die augenblicklich im Fokus der gentherapeutischen Forschung stehen, ist die Hämophilie A, die als monogenetischer Defekt zu einer verstärkten Blutungsneigung in unterschiedlichen Schweregraden führt. Ursächlich für die Erkrankung sind Defekte im X-chromosomal lokalisierten Gen des Gerinnungsfaktors VIII (FVIII). Bislang wurden unterschiedlichste Mutationen beschrieben, die zu einem Mangel und/oder Funktionsverlust des FVIII-Proteins führen. Zwar ist die Hämophilie A durch Substitution des fehlenden Proteins mit FVIII-Konzentraten aus Plasma gewonnen oder gentechnisch hergestellt prinzipiell gut zu behandeln, die Herstellung der Konzentrate ist jedoch technisch aufwendig und kostenintensiv. Die Therapie steht daher weltweit nur etwa 20 Prozent aller Hämophilie-Patienten zur Verfügung. Die verbleibenden 80 Prozent der Patienten haben eine deutlich verkürzte Lebenserwartung sowie, angesichts auftretender Gelenkveränderungen, auch eine verminderte Lebensqualität.

Für die Hämophilie A als Modell für die Gentherapie spricht, dass Krankheit, Gen und Protein exzellent charakterisiert sind und ihre Mechanismen in zahlreichen guten Tiermodellen abgebildet werden. Der Erfolg einer Therapie lässt sich einfach anhand leicht bestimmbarer Laborparameter, in der Regel Gerinnungsfaktoraktivitäten, nachweisen. Bereits ein Anstieg der FVIII-Aktivität im Blut auf 2 bis 5 Prozent des Normalwertes überführt eine schwere Hämophilie in eine leichte Verlaufsform, die den Patienten unabhängig von einer prophylaktischen Substitutionstherapie machen würde. Dies ist nicht nur verbunden mit einem deutlichen Gewinn an Lebensqualität, sondern auch psychologisch wichtig, da in der Vergangenheit viele Patienten über Gerinnungskonzentrate Infektionen erworben haben, und diese auch jetzt wieder, z. B. im Zusammenhang mit der neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, in der Diskussion sind.

Gegenwärtig können die bekannten molekularen Defekte innerhalb des Faktor-VIII-Gens nicht direkt repariert werden. Daher wird versucht, mittels verschiedenster Gentransfersysteme (Vektorsysteme) intakte Gene für den fehlenden Gerinnungsfaktor zusätzlich in die entsprechenden Körperzellen zu integrieren. In den meisten Therapieprotokollen werden hierzu Viren als Vektoren eingesetzt.

Um eine intakte Genkopie möglichst effizient in die relevanten Zielzellen bringen zu können, werden heute zwei verschiedene Strategien verfolgt.

Bei der in-vivo-Strategie wird der genetisch modifizierte virale Vektor mit dem integrierten Faktor-VIII-Gen direkt in den Menschen injiziert und dringt alleine in das Innere der Zellen ein. Für eine Gentherapie der Hämophilie A werden die viralen Vektoren dabei sehr häufig in die Blutbahn injiziert und transfizieren dann auch Leberzellen als physiologischen Ort der FVIII-Synthese. Die

Methode birgt jedoch gewisse Risiken, da die viralen Vektoren durch ihre Präsenz bzw. das Eindringen in Zellen unter Umständen Immunantworten und toxische Reaktionen auslösen können. Ferner ist die Effizienz, mit der ein Vektorsystem die Zielzellen transfiziert, schwer zu kontrollieren.

Eine Alternative stellt die ex vivo-Strategie dar. Hierbei werden dem Organismus Zellen entnommen, in Zellkultur zur Teilung angeregt und während dieser Teilungsphasen mit dem modifizierten viralen Gentransfersystem behandelt. Das Gentransfersystem und damit das therapeutische Gen integrieren in das Erbmaterial einiger weniger Zellen. Diese Zellen werden anschließend isoliert, vermehrt und wieder in den Organismus reimplantiert. Je nach Wahl des Vektorsystems kann eine in vivo oder eine ex vivo Gentherapie sinnvoller sein. Da FVIII in Leberzellen synthetisiert wird, diese jedoch nicht ohne weiteres vom Patienten gewonnen werden können, müssen für den ex-vivo-Ansatz der gentherapeutischen Behandlung der Hämophilie A andere Zellen identifiziert werden, die sich nach genetischer Modifikation für eine Retransplantation eignen. Diese Zielzellen sollten leicht zu gewinnen sein und nach Retransplantation direkten Zugang zur Blutzirkulation des Patienten haben. Blutstammzellen könnten geeignete Kandidaten darstellen, da sie viele dieser Voraussetzungen erfüllen. Sie kommen physiologisch im Knochenmark und im Plazentarestblut vor und können durch gut etablierte Methoden gewonnen werden. Die hohe proliferative Kapazität von Blutstammzellen mit dem Potenzial zur Repopulation, verbunden mit der Fähigkeit, in unterschiedliche Gewebe zu transdifferenzieren, machen diese Zellen zu einem äußerst attraktiven Werkzeug für die Gentherapie.

Ein weiterer Bereich, der im Zentrum der gentherapeutischen Forschung steht, ist die Behandlung hereditärer Immundefekte. Für die Mehrzahl der heute bekannten Immundefekt-Erkrankungen steht zur Zeit nur die allogene Stammzelltransplantation als Therapiekonzept zur Verfügung. Für einige dieser Erkrankungen, wie etwa die SCID (Severe Combined Immunodeficiency), die auf einem kombinierten B-Zell- und T-Zell-Defekt basiert, sind monogenetische Defekte als Ursache bekannt. Diese Erkrankungen erscheinen daher geeignet für die Entwicklung gentherapeutischer Ansätze. Das menschliche Immunsystem ist in der Lage, sehr rasch auf Infektionen zu reagieren und seine Antwort an neue Erreger anzupassen. Grundlage dieser adaptiven Fähigkeit ist die hohe

Variabilität, mit der antigenbindende Rezeptoren auf der Oberfläche von B- und T-Zellen im Verlaufe der Entwicklung dieser Zellen nach deren Aktivierung durch Antigenkontakt entstehen. Die Expression der B-Zell-Rezeptoren (Immunglobuline) bzw. T-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche der jeweiligen Zellen ist daher ein wichtiger Schritt in der Entwicklung von B- und T-Lymphozyten aus ihren Vorläufern. Da die enorme Bandbreite der möglichen Rezeptoren nicht im Genom kodiert werden kann, werden die Varianten erst bei der Differenzierung der Lymphozyten ausgebildet. Dazu werden durch irreversible Neukombination von DNA-Sequenzen die Antigenrezeptor-kodierenden Gene im Genom der Zellen zusammengestellt. Die kodierenden Gene für diese Antigenrezeptoren werden in den Vorläuferzellen auf genomischer Ebene aus V- (Variable), D- (Diversity) und J- (Joining) Gensegmenten zusammengesetzt. Initiiert wird dieser Prozeß, der als V(D)J-Rekombination bezeichnet wird, durch bestimmte Rekombinationsenzyme (RAG1-, RAG2- und Artemis-Proteine; RAG: Recombination activating genes). Eine mutationsbedingte Störung in der Funktion dieser Enzyme führt zur Störung der V(D)J-Rekombination und damit zu einer fehlerhaften Entwicklung von B- und T-Zellen mit der Folge einer defekten Immunantwort. Die Korrektur der genetischen Defekte dieser Rekombinationsenzyme oder der Ersatz bzw. die Substitution der defekten Gene durch intakte Kopien stellt als kausale Therapie die Rekombinationsfähigkeit im Verlaufe der B- und T-Zell-Entwicklung und damit die Reaktionsfähigkeit der Immunantwort wieder her.

Experimentelle Zelltherapie



Projektleitung:
Dr. med.
Torsten Tonn
Prof. Dr. med.
Erhard Seifried

Standort: Frankfurt

Projektleitung: Dr. med. Torsten Tonn

Studium

1984 – 1991 Studium der Humanmedizin in Düsseldorf

1991 Staatsexamen

1996 Dissertation

Berufliche Tätigkeit

1991 – 1994 Abteilung Immunologie, Medizinisches Institut für Umwelthygiene, Düsseldorf

1994 – 1996 Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, DRK-Blutspendedienst Hessen

1996 – 1997 Terry Fox Laboratory, British Columbia Cancer Agency, Vancouver, Kanada

1997 – 1998 Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, DRK-Blutspendedienst Hessen

1999 – 2000 Chemotherapeutisches Forschungsinstitut, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt

seit 2001 Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen, Frankfurt am Main

seit 2002 Abteilungsleiter GMP-Herstellung spezieller Zellprodukte

Sonstiges

- Gründungsmitglied Interdisziplinäre Gruppe für Labormedizin und Durchflusszytometrie (IGLD)
- Experte in der „Coordinated Research Study - Safety of Cellular Immune Therapies - Council of Europe“

Die Arbeitsgruppe von Prof. Seifried, geleitet von Dr. Tonn, versucht, zelluläre Therapien zu entwickeln, wobei der Schwerpunkt der Arbeiten auf der Entwicklung einer Strategie zur Therapie der Hämophilie A (Bluterkrankheit) mit gentechnisch veränderten Blutstammzellen beruht. Die Therapie der Hämophilie A beruht bisher im Wesentlichen auf einer kontinuierlichen Substitution des fehlenden oder defekten Faktor VIII-Gerinnungs-faktors. Aufgrund der monogenetischen Ursache und des einfach zu messenden Therapieerfolges stellt die Hämophilie ein attraktives Erkrankungsbild für einen gentherapeutischen Ansatz dar. Die Arbeitsgruppe hat es sich zum Ziel gemacht, einen Ansatz auszuarbeiten, bei dem das FVIII-Protein durch gentechnisch manipulierte hämatopoetische Blutstammzellen substituiert werden soll. Um dieses Projekt effizient verfolgen zu können, konnte die Arbeitsgruppe von Dr. Manuel Grez im Georg-Speyer-Haus in Frankfurt als Kooperationspartner gewonnen werden. Ein zweites Projekt ist die Etablierung einer Immunzelllinie (Natürliche Killerzelllinie NK-92) als zelluläres Therapeutikum für maligne Erkrankungen. Der von der Arbeitsgruppe verfolgte Therapieansatz bösartiger Erkrankungen beruht auf der Entdeckung und Isolierung einer natürlichen Killerzelllinie von einem Patienten im Jahre 1992 durch Prof. Dr. Hans-G. Klingemann am kanadischen Krebsforschungszentrum in Vancouver, Kanada, mit dem fortdauernd eine enge Kooperation besteht.

Working Group: Experimental Celltherapy Dr. med. Torsten Tonn, head

The group of Prof. Dr. Erhard Seifried, headed by Dr. Torsten Tonn, is developing cellular therapies for inherited diseases, such as hemophilia A, as well as immune therapies of malignancies. With regard to hemophilia the group is focusing on the development of gene therapeutic approaches, employing hematopoietic stem cells and their progeny as target cells for the recombinant expression of the coagulation factor VIII. Current treatment options for hemophilia involve the substitution of the missing factor VIII protein by transfusion of plasma derived or recombinant FVIII preparations. However, due to its well characterized genetic defect hemophilia is an appealing disease for gene therapeutic approaches. The group has established a close collaboration with Dr. Manuel Grez from the Biomedical Research Institute Georg-Speyer-Haus in Frankfurt. In addition to gene therapy of hemophilia, the group is also engaged in the establishment of a natural killer cell line (NK-92) for adoptive cellular immunotherapy of malignancies. NK-92 cells have been isolated and established as a continuously growing cell line by Prof. Dr. Hans-G. Klingemann at the British Columbia Cancer Agency in Vancouver. NK-92 cells have been shown to have substantial anticancer activity in immunodeficient mice, and are currently tested in phase I/II clinical trials. With regard to this project, the group has close cooperations with Prof. Dr. Hans-G. Klingemann (Chicago, USA) and partners at the Johann Wolfgang Goethe University in Frankfurt.

Analyse und Genreparatur angeborener Immundefekte

Standort: Ulm

Projektleitung: Dr. med. Klaus Schwarz

Studium

1976 - 1981 Studium der Humanmedizin in Freiburg

1984 Staatsexamen

1986 Dissertation

Berufliche Tätigkeit

1984 - 1989 Wissenschaftlicher Assistent am Institut für Immunbiologie, Universität Freiburg

1989 - 1996 Assistenzarzt Kinderheilkunde, Projektleiter in der Sektion Molekularbiologie, Universität Ulm

seit 1996 Stellvertretender Leiter des Arbeitsbereichs Transplantationsimmunologie und Leiter der Forschungseinheit der Abteilung Transfusionsmedizin beim DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg, Institut Ulm

seit 2002 Kommissarischer Leiter des Arbeitsbereichs Transplantationsimmunologie im Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immunogenetik des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen

Sonstiges

1996 Anerkennung als Facharzt für Kinder- und Jugendmedizin



Projektleitung:
Dr. med.
Klaus Schwarz

Die Forschungsgruppe setzt sich aus dem Projektleiter Dr. med. Klaus Schwarz, den Postdoktorandinnen/-en Dr. D. Niewolik, Dr. U. Pannicke, Dr. F. Radecke, dem Doktoranden F. Koch sowie den Technischen Assistentinnen I. Brackmann, I. Janz, I. Peter, S. Radecke und E. Rump zusammen.

Die Schwierigkeit der Thematik erklärt, dass ein breites Spektrum grundlegender molekular- und zellbiologischer Methoden in der Gruppe fest etabliert ist, das hier nicht aufgezählt werden soll.

Darüber hinaus hat die Gruppe Erfahrung mit weiter reichenden Techniken wie der In-vitro-Mutagenese, der murinen ES-Zelltechnologie einschließlich der Herstellung von Knock-in-Mäusen und der transienten und stabilen Genexpression, um einige wenige zu nennen.

Die Gruppe hat sich international im Bereich der Analytik von angeborenen Immundefekten hervorragend positioniert und strebt an, dies in Zukunft für die Genreparatur ebenfalls zu erreichen.

Working Group: Analysis and Gene Repair of Hereditary Immunodeficiencies Dr. med. Klaus Schwarz, head

The group, headed by Dr. Klaus Schwarz, includes the post-docs Dr. D. Niewolik, Dr. U. Pannicke, Dr. F. Radecke, the doctoral candidate F. Koch and the technical assistants I. Brackmann, I. Janz, I. Peter, S. Radecke and E. Rump.

The difficulty of the research subjects easily explains why a broad spectrum of basic molecular and cell-biological methods is firmly established within the group; methods that are not to be referred to in this short survey.

Besides the basic techniques, the group has successfully mastered more sophisticated methods such as in vitro mutagenesis, murine ES-cell technology and transient and stable gene expression, to name a few.

Internationally the group is very renowned for its immunodeficiency research and aims at a similar reputation in gene repair in the future.

Entwicklung eines gentherapeutischen Behandlungsansatzes zur Behandlung der Hämophilie A

Ziel des Projektes:

Die Zielvorgabe der Arbeitsgruppe ist der gentherapeutische Ansatz für die Behandlung der Bluterkrankheit Hämophilie A. Dabei sollen die Patienten mittels eigener Blutstammzellen, die „in vitro“ zur Expressierung von Gerinnungsfaktor VIII (FVIII) angeregt werden, relativ sicher behandelt werden. Darüber hinaus sollen Faktoren identifiziert werden, die eine effizientere und physiologischere Herstellung von rekombinantem Faktor VIII-Protein ermöglichen.

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Entwicklung eines gentherapeutischen Ansatzes zur Behandlung der Hämophilie A

Die Ursache der Hämophilie A liegt in der unzureichenden Menge oder dem kompletten Fehlen von funktionellem Gerinnungsfaktor VIII (FVIII) in der Zirkulation des vaskulären Systems. Die Krankheit beruht auf einem Defekt des auf dem X-Chromosom lokalisierten Gens und betrifft 1 in 5.000 bis 10.000 männlichen Individuen. Als Hauptsymptome der Krankheit treten spontane Blutungen in Gelenken, Muskeln und inneren Organen auf, die einen lebensbedrohlichen Verlauf annehmen können. Derzeit werden Hämophile durch die intravenöse Infusion von plasmatischem oder rekombinant hergestelltem FVIII behandelt. Allerdings beinhaltet diese Therapieform die Notwendigkeit von lebenslangen Infusionen und birgt die potenzielle Gefahr der Übertragung von Infektionskrankheiten, was die Anwendbarkeit eines optimierten Gentherapieprotokolls wünschenswert erscheinen lässt. In dieser Arbeitsgruppe werden deshalb Gentherapieansätze zur Behandlung der Hämophilie A entwickelt, wobei sowohl an der Identifikation einer geeigneten Zielzelle als auch des optimalen Gentransfersystems gearbeitet wird.

Endotheliale Vorläuferzellen als Zielzellen einer Gentherapie der Hämophilie A

Unter physiologischen Bedingungen wird FVIII hauptsächlich in Hepatozyten und sinusoidalen Leberendothelzellen gebildet. Aus diesem Grund beschäftigte sich eine Vielzahl von Studien zur Entwicklung eines gentherapeutischen Ansatzes zur Behandlung der Hämophilie A mit der in vivo Transduktion von Leberzellen mit viralen Vektoren. In Hämophilie A-Mäusen konnten durch die systemische Applikation von adenoviralen, adeno-assoziierten viralen (AAV) sowie retroviralen und lentiviralen Vektoren bereits lang anhaltende, therapeutisch relevante FVIII Plasmaspiegel erreicht werden. Allerdings bestehen Bedenken bezüglich der Sicherheit dieser Ansätze. Diese betreffen potenzielle Nebenwirkungen, wie z.B. immunologische Abstoßungsreaktionen, Vektor-vermittelte Zytotoxizität und einen Gentransfer in Zellen der Keimbahn. Dennoch steht die Identifikation einer idealen Zielzelle noch aus. Idealerweise sollten diese Zellen einen direkten Zugang zum Blutstrom besitzen, auf Grund einer langen Lebensspanne eine anhaltende Transgenexpression gewährleisten sowie ein hohes proliferatives Potenzial besitzen, um genetisch modifizierte Zellen amplifizieren zu können. Hämatopoetische Stammzellen (HSC) und endotheliale Vorläuferzellen (EPC) erscheinen gleichermaßen interessant für eine nicht-physiologische Expression von FVIII geeignet, da sie leicht aus dem Knochenmark (BM), dem peripheren Blut (PB) oder Nabelschnurblut (CB) isoliert, von viralen Vektoren transduziert und in langlebige Vorläuferzellen differenziert werden können. In den Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass verschiedene hämatopoetische Zelllinien nach einem lentiviralen Gentransfer FVIII exprimieren (Tonn et al., 2002). Primäre Blutstammzellen, die sich durch die Expression des Oberflächenmarkers CD34 auszeichnen sind jedoch nicht in der Lage, signifikante Mengen an FVIII rekombinant freizusetzen. Dies trifft auch zu, wenn man die transduzierten Zellen in verschiedene Leukozytenpopulationen differenziert. Ursache hierfür ist wahrscheinlich eine Kombination verschiedener Faktoren, wie die ineffiziente Transkription, Translation und Sekretion. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass endotheliale Vorläuferzellen (EPC), welche man ebenfalls aus CD34 positiven Blutstammzellen differenzieren kann, sehr wohl geeignet sind, hohe Mengen an gerinnungsaktivem FVIII-Protein freizusetzen. Ein spezieller Vorteil in der Verwendung von EPC hingegen für einen Einsatz bei einer FVIII Gentherapie ist deren Expression des von Willebrand-Faktors (vWF). vWF stabilisiert FVIII im Plasma und könnte die FVIII Sekretion erhöhen, falls es in vitro in der gleichen Zelle koexpressiert wird.

Die wichtigsten Ergebnisse

Unter Verwendung retroviraler Vektoren (lentivirale Vektoren) konnte erstmals eine Sezernierung von FVIII-Protein durch hämatopoetische Zelllinien nachgewiesen werden. In Blutstammzellen und daraus abgeleiteten Leukozytenpopulationen wurde ebenfalls FVIII-Protein nachgewiesen. Allerdings scheint die Höhe der Expression nicht auszureichen, um einen therapeutischen Effekt erzielen zu können. Aus Nabelschnurblut gewonnene endotheliale Vorläuferzellen hingegen lassen sich problemlos vermehren und setzen überaus große Mengen an Gerinnungsfaktor VIII frei, nachdem sie stabil mit lentiviralen Vektoren transduziert wurden. Es wird nun versucht, Endothelzellen für gentherapeutische Anwendungen, aber auch für die rekombinante Herstellung des FVIII-Proteins zu entwickeln.

Allgemeinverständlicher Überblick

Etwa einer unter zehntausend Männern leidet an der Bluterkrankheit Hämophilie A. Bei dieser Erkrankung wird ein für die Blutgerinnung notwendiger Bestandteil, der Gerinnungsfaktor VIII, nur unzureichend oder gar nicht vom Organismus produziert. Der Patient leidet an einer gesteigerten Blutungsneigung und der Unstillbarkeit von Blutungen nach Verletzungen oder operativen Eingriffen. Da die technische Herstellung des Gerinnungsfaktors nur unzureichend funktioniert, werden weltweit bis heute nur ca. 25 % der betroffenen Patienten medizinisch adäquat behandelt. Ein Hauptproblem in der rekombinanten Herstellung des Faktor VIII-Proteins ist hierbei die ineffiziente Freisetzung des Proteins aus Zellen. Die Arbeitsgruppe untersucht daher Faktoren, die die Produktion des Gerinnungsfaktors FVIII effizienter und physiologischer gestalten und versucht, geeignete Zielzellen für gentherapeutische Behandlungsansätze zu identifizieren.

Summary:

Developing hematopoietic stem cells as targets for gene therapy of hemophilia

Considering the plasticity of hematopoietic stem cells (HSC), they would be ideal targets for gene therapy of hemophilia A by virtue of their progeny providing immediate access to the blood stream. However, several attempts to show expression of recombinant factor VIII (rFVIII) by primary hematopoietic cells and cell lines have failed; this failure was attributed to the inability of HSC to secrete rFVIII. Our group has reanalysed the secretion of FVIII protein using lentiviral vectors, highly suitable for the transduction of HSC. Using these vectors, we were able to achieve high amounts of FVIII secretion in hematopoietic cell lines, however, primary hematopoietic cell lines did not secrete therapeutical relevant amounts of the recombinant protein. We therefore aim to differentiate endothelial progenitor cells from CD34 pos cord blood cells and have identified this population highly suitable for the delivery of factor VIII.

Projektkennzahlen

Förderung:	Stiftung Hämotherapie-Forschung Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V. (GTH) Industriemittel
Laufzeit:	seit 1999
Projektleitung:	Dr. Torsten Tonn, Prof. Dr. Erhard Seifried
Stlv. Leitung:	Dr. Sven Becker
Mitarbeiter:	Dipl.-Biol. Christian Herder Dipl.-Biol. Stefan Heinz Daniela Bott Daniela Hilbig Nadine Sorg
Kooperationen:	Dr. R. Pepperkok, European Molecular Biology Lab (EMBL), Heidelberg Dr. M. Grez, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt Dr. R. Oostendorp, Klinikum Rechts der Isar, Universität München

Weiterführende Informationen:

Eigene Arbeiten.

Herder C, Tonn T, Oostendorp R, Becker S, Keller U, Peschel C, Grez M, Seifried E.

Use of endothelial progenitor cells from cord blood CD34+ cells for hemophilia A gene therapy. submitted

Becker S, Simpson C, Pepperkok R, Heinz S, Herder C, Grez M, Seifried E, Tonn T.

Trafficking of coagulation factor VIII (FVIII) protein in mammalian cells - implications for hemophilia A treatment. submitted

Generation and Characterization of human hematopoietic cell lines expressing factor VIII. T. Tonn, C. Herder, S. Becker, E. Seifried, M. Grez

J Hemotherapy & Stem Cell Research (11):695-704 (2002)

Kontakt:

Dr. med. Torsten Tonn

Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie Frankfurt

DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg - Hessen gGmbH Sandhofstraße 1 60528 Frankfurt am Main

Telefon 069 - 6782 - 228

Fax 069 - 6782 - 259

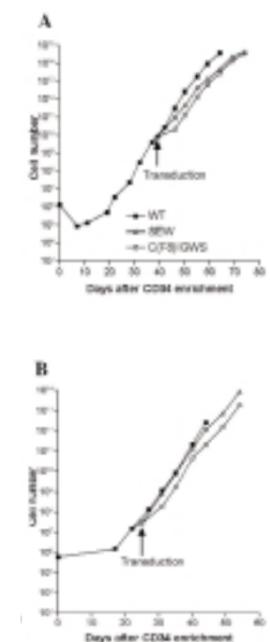
E-Mail ttonn@bsdhessen.de

Standort: Frankfurt

Projektleitung:
Dr. med.
Torsten Tonn

Prof. Dr. med.
Erhard Seifried

Proliferatives Potenzial von FVIII-transduzierten Endothel-Vorläuferzellen, generiert aus CD34+ Nabelschnurblutstammzellen

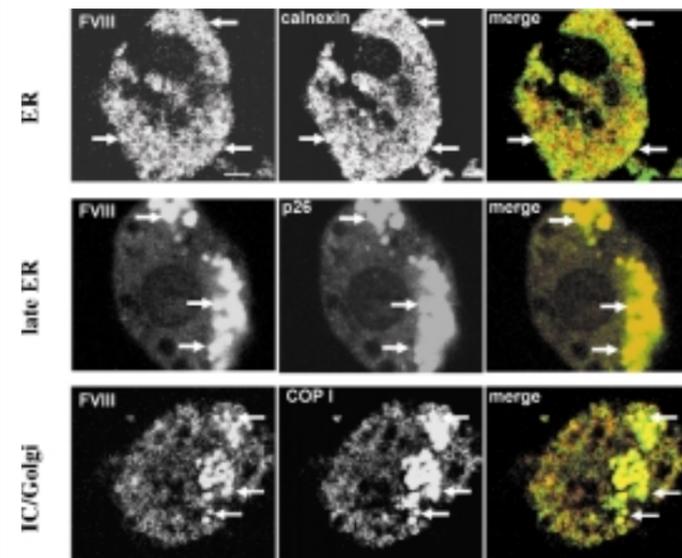


Untersuchung des Sekretionsweges von rekombinantem FVIII-Protein

Ziel des Projektes:

Mittels konfokaler Lasermikroskopie sollen wichtige Interaktionspartner identifiziert werden, um den Sekretionsweg von Faktor VIII-Protein innerhalb der Zelle zu charakterisieren. Diese scheinen für die Ausschleusung des FVIII-Proteins aus der Zelle ebenso wie für die Zurückhaltung des Proteins in der Zelle verantwortlich zu sein.

Der Sekretionsweg von nativem FVIII-Protein in primären, humanen Leberzellen



Hintergrund und Projektbeschreibung:

Die Ausbeute von FVIII aus rekombinanten Expressionssystemen ist relativ niedrig. Dabei erlaubt seine Komplexität keine Expression in Bakterien, sondern erfordert Säugerzellen, wie COS- oder CHO-Zellen zur rekombinanten Herstellung. Zumindest drei Ursachen wurden bisher für die geringe Expression gefunden: 1) ineffiziente Translation des FVIII mRNA Transkripts, 2) ineffizienter Transport des primären Translationsprodukts vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat und 3) die Schwierigkeit, FVIII im Überstand der transfizierten Zellen stabil zu akkumulieren, da das ungebundene Protein schnell proteolysiert wird. Von mehreren Arbeitsgruppen wurden bislang intrazelluläre Bindungspartner von FVIII identifiziert, die für die vollständige Faltung und Sekretion des Gerinnungsproteins notwendig sind. So bindet FVIII nach seiner Translation und Translokation zum ER an eine Reihe von Chaperonen, einschließlich BiP, Calnexin und Calreticulin. Hierbei scheint die FVIII B-Domäne, vermutlich über ihre 18 Asparagin gebundenen Oligosaccharide, die primäre Bindungsstelle für die ER-Chaperone darzustellen. Weiterhin bindet BiP an eine Region in der A1-Domäne des FVIII. BiP besitzt eine peptid-stimulierte ATP-ase Aktivität, von der man annimmt, dass sie die Sekretion von FVIII aus dem ER limitiert, da sie große Mengen intrazellulären ATPs und ATP-Hydrolyse für die Freisetzung von FVIII benötigt. Für den Transport von FVIII aus dem ER in das intermediäre Kompartiment (IC) wurde gezeigt, dass FVIII an den transmembranen Cargorezeptor ERGIC-53 bindet, und dass diese Bindung eine korrekte Faltung und Glykosylierung des Proteins voraussetzt. Während sich mehrere Studien mit der Analyse der Interaktion von FVIII mit verschiedenen Bindungspartnern mittels Koimmunpräzipitation beschäftigten, fehlt bisher eine ganzheitliche Untersuchung des FVIII-Sekretionsweges vom ER bis zum Trans-Golgi-Netzwerk (TGN). Weiterhin wurde kürzlich gezeigt, dass sehr große Proteine, wie das 1464 Aminosäuren große Prokollagen, zu groß sein können, um von den klassischen 60-80 nm großen - mit COPI und COPII beschichteten Transportvesikeln aufgenommen zu werden. Diese großen Proteine werden dann auf einem alternativen Sekretionsweg zum Golgi-Apparat transportiert. Um die Analyse der FVIII-Sekretion zu erweitern, untersucht die Arbeitsgruppe daher den intrazellulären Sekretionsweg von rekombinant exprimiertem FVIII (rFVIII-FL) und B-Domänen deletiertem FVIII (rFVIIIΔB) in humanen (293T) und nicht-humanen (COS) Zellen. Weiterhin wird deren Sekretionsweg mit dem von nativem FVIII in primären

Leberzellen verglichen. Durch die Verwendung von konfokaler Lasermikroskopie konnte gezeigt werden, dass sich der Sekretionsweg von sekretiertem rekombinantem FVIII nicht signifikant von dem des physiologischen FVIII in Leberzellen unterscheidet. Im Gegensatz zu FVIII in Leberzellen kommt es jedoch zur Aggregatbildung von großen Teilen FVIII-Proteins, die scheinbar nicht ausgeschleust werden. Zudem wurde beobachtet, dass FVIII während der Sekretion mit dem ER-Chaperon Calnexin colokalisiert und anschließend mit p26, einem Mitglied der p24 Cargorezeptor-Familie, einem Molekül, das zwischen dem ER und dem Golgi-Apparat pendelt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Transport von FVIII zwischen dem ER und dem Golgi in COPII beschichteten Strukturen verläuft. rFVIII wird hierbei entlang des klassischen Sekretionsweges, vom ER über COPII beladene Vesikel im IC zum Golgi-Apparat und über das TGN ausgeschleust. Zusammenfassend präsentieren diese Daten neue Einsichten in den Sekretionsweg von rFVIII und erlauben die Entwicklung von Strategien, die eine effizientere und physiologischere Produktion von FVIII zum Ziel haben.

Die wichtigsten Ergebnisse

Es wurden FVIII-Protein in verschiedenen Zelltypen exprimiert und die Zellkompartimente des FVIII-Proteins untersucht, die es bis zu seiner Ausschleusung aus der Zelle durchläuft. Ergänzend konnte erstmals der natürliche Sekretionsweg von physiologischem Faktor VIII in primären Leberzellen nachvollzogen werden. Mittels konfokaler Lasermikroskopie ist es zum ersten Mal gelungen, zelluläre Strukturen zu identifizieren, in denen Faktor VIII jenseits des endoplasmatischen Retikulums Richtung Golgi und Trans-Golgi ausgeschleust wird.

Allgemeinverständlicher Überblick

Neben dem gentherapeutischen Ansatz der Hämophilie A nimmt die Erforschung des gentechnisch hergestellten rekombinanten FVIII-Proteins einen immer größeren Raum ein. Einerseits profitiert die Gentherapie im engeren Sinne davon, andererseits die industrielle Herstellung. Deswegen werden verschiedene Zelltypen untersucht, die bei der technischen Herstellung von FVIII-Protein zur Anwendung kommen sollen. Schließlich stehen jene Zellbestandteile im Vordergrund der Forschung, die bei der Ausschleusung des Proteins aus der Zelle ins Blut eine Rolle spielen.

Summary:

Intracellular secretion of FVIII

Since the low efficient secretion is a major obstacle of recombinant FVIII secretion in gene therapy and manufacture, we are analysing the secretory pathway of factor VIII in mammalian cells. Here we were able to identify intracellular transport vesicles, that shuttle FVIII from the ER to the Golgi. However, confirming previous studies a large portion of factor VIII is intracellularly trapped within the ER. The factors responsible for this accumulation of FVIII in the ER are currently unresolved. However, besides the overexpression itself, factors such as the exhaustion of chaperones necessary for FVIII folding and secretion, or improper folding of the FVIII protein might account for this observation. Analysing the factors involved in FVIII secretion, we aim to identify factors that may ultimately facilitate the recombinant expression of factor VIII.

Projektkennzahlen

Förderung:	Stiftung Hämotherapie-Forschung Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V. (GTH) Industriemittel
Projektleitung:	Dr. Torsten Tonn Prof. Dr. Erhard Seifried
Stlv. Leitung:	Dr. Sven Becker
Mitarbeiter:	Dipl.-Biol. Christian Herder Dipl.-Biol. Stefan Heinz Daniela Bott Daniela Hilbig Nadine Sorg
Kooperationen:	Dr. M.Grez, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt Dr. R. Pepperkok, EMBL, Heidelberg

Kontakt:

Dr. med. Torsten Tonn

Institut für
Transfusionsmedizin und
Immunhämatologie
Frankfurt

DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH
Sandhofstraße 1
60528 Frankfurt am Main

Telefon
069 – 6782 - 228

Fax
069 – 6782 - 259

E-Mail
ttonn@bsdhsessen.de

Standort: Frankfurt

Projektleitung:
Dr. med.
Torsten Tonn

Prof. Dr. med.
Erhard Seifried

Analyse molekularbiologischer Ursachen angeborener Immundefekte

Ziel des Projektes:

Ziel der Arbeitsgruppe ist die Erforschung und Diagnostik hereditärer Immundefizienzen des Menschen. Im Mittelpunkt der Forschung steht die SCID-Erkrankung („Severe Combined Immunodeficiency“), die auf einem kombinierten B- und T-Zelldefekt basiert.

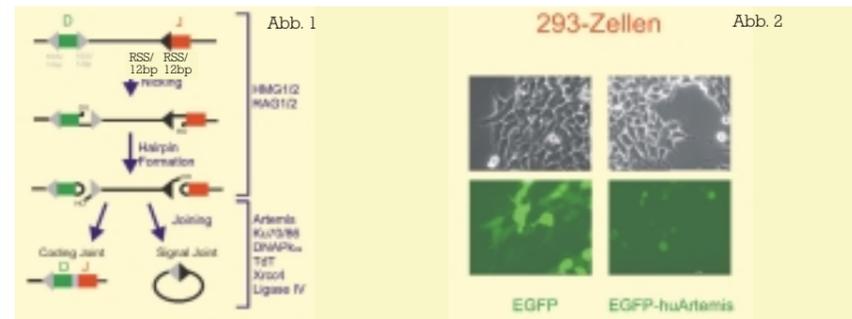


Abb. 1: Die V(D)J-Rekombination Schema mit daran beteiligten Proteinfaktoren am Beispiel der Verknüpfung eines D- und eines J-Elements

Abb. 2: Expressionsanalyse von ARTEMIS Expression von EGFP bzw. einem EGFP-Artemisfusionsprotein in hu-manen 293-Zellen. EGFP alleine verteilt sich gleichmäßig in Kern und Zytoplasma. Das EGFP-Artemisfusionsprotein liegt ausschließlich im Kern, dem Ort der V(D)J-Rekombination, vor

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Ein wichtiger Schritt in der Entwicklung von B- und T-Lymphozyten aus ihren Vorläufern ist die Expression der B-Zell-Rezeptoren (Immunglobuline) beziehungsweise T-Zell-Rezeptoren auf deren Oberfläche. Die kodierenden Gene für diese Antigenrezeptoren werden in den Vorläuferzellen auf genomischer Ebene aus V- („Variable“), D- („Diversity“) und J- („Joining“)-Gensegmenten zusammengesetzt (Abb. 1). Initiiert wird die V(D)J-Rekombination durch die RAG1- und RAG2- („Recombination activating genes 1/2“) Proteine. Mutationen in den RAG1- bzw. RAG2-Genen können u. a. die Ursache von B-/T-SCID-Erkrankungen sein - so die Ergebnisse der Arbeitsgruppe.

Ein weiterer Schwerpunkt zur Charakterisierung von SCID-Erkrankungen sind Bestrahlungsexperimente mit primären humanen Fibroblasten. Dazu wurde ein Assay etabliert, mit dessen Hilfe strahlungssensitive, DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturdefekte Fibroblasten von normalen Fibroblasten unterschieden werden können. Fibroblasten von Patienten mit Mutationen in den RAG-Genen verhalten sich im Test wie Fibroblasten gesunder Kontrollpersonen, während die Fibroblasten von Patienten mit Mutationen im Artemis-Gen, einem zweiten von uns untersuchten Gen, strahlensensitiv sind (Abb. 2). Die Arbeitsgruppe konnte die Funktion des Artemis-Gens in Kollaboration mit M. Lieber (USC, USA) aufklären und so Strahlensensitivität und Immundefekt einiger SCID-Patienten molekular erklären.

Zur Überprüfung, ob Patientenzellen in der Lage sind, V(D)J-Rekombination durchzuführen, wurde ein in vivo-Assay entwickelt, bei dem in die Zielzellen (primäre Fibroblasten der Patienten) ein Plasmid mit der cDNA für ein autofluoreszierendes Protein eingeführt wird. Nur Zellen, die die V(D)J-Rekombination durchführen können, sind in der Lage, das fluoreszierende EGFP („Enhanced Green Fluorescent Protein“) zu exprimieren (Abb. 2). Dieses System ermöglicht es der Arbeitsgruppe, veränderte Artemis-Proteine auf ihre Funktionalität zu überprüfen und nach neuen wichtigen Genen der V(D)J-Rekombination und der DNA-Reparatur zu fahnden.

Die Arbeitsgruppe beschränkt sich in ihrer Arbeit nicht allein auf die V(D)J-Rekombination, sondern untersucht auch Immundefekte anderer Ursachen. Dazu gehören die Analysen der Gene für die IL2R γ c, die Purinnukleosidphosphorylase und IL7R α bei SCID-Patienten sowie – als ein weiterer Schwerpunkt – Untersuchungen zum Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein. In Zusammenarbeit mit anderen Arbeitsgruppen werden die Folgen von Mutationen des Wiskott-Aldrich-Syndrom-Proteins auf das Aktin-Zytoskelett von hämatopoetischen Zellen untersucht.

Als Routinemaßnahme wird ein Großteil der im deutschsprachigen Raum anfallenden Diagnosen (Patienten, Überträger/-innen und Pränataldiagnostik) von molekularen Defekten der oben genannten Gene durchgeführt.

Die wichtigsten Ergebnisse

Die Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass B-/T-SCID-Erkrankungen auf Mutationen zum einen in den Genen für RAG1 und RAG2 basieren können sowie zum anderen auf einen Defekt des ARTEMIS-Gens zurückzuführen sind.

ARTEMIS kodiert für ein Protein mit wichtiger Funktion in der V(D)J-Rekombination. Dieses Gen enthält Domänen analog zu DNA-Reparaturenzymen. In funktionellen Studien wurden dem Artemis-Protein Endo- und Exonuklease-Aktivitäten zugeordnet. Zudem konnte gezeigt werden, dass Artemis durch DNA-PKcs („DNA-dependent proteinkinase catalytic subunit“) gebunden, phosphoryliert und in seiner enzymatischen Aktivität moduliert wird.

Allgemeinverständlicher Überblick

SCID („Severe Combined Immunodeficiency“) ist eine seltene vererbte Erkrankung des Immunsystems, bei der die Patienten nicht über Lymphozyten, die weißen Blutzellen der Immunabwehr, verfügen. Damit fehlt diesen Patienten jegliche Fähigkeit der Abwehr von Infektionen durch Bakterien, Viren oder Pilze. Bekannt geworden ist die Erkrankung durch den spektakulären Fall des „Bubble boys“, der 12 Jahre lang in einer hermetisch abgeschirmten, absolut keimfreien Plastikgugel lebte.

Es existieren verschiedene Formen dieser Erkrankung, die auf unterschiedliche Gendefekte zurückgehen. Im Rahmen dieses Forschungsprojektes konnten weitere Mutationen gefunden und charakterisiert werden, die für diese Erkrankung verantwortlich sind. Damit wurde ein wichtiger Beitrag zum Verständnis, zur Diagnostik und perspektivisch auch zur Therapie des SCID geleistet.

Summary:

Molecular Analysis of inherited Immunodeficiencies

The aim of the group is the molecular characterization of hereditary immunodeficiencies, especially severe combined immunodeficiencies (SCID), which exhibit developmental and/or functional defects of B-/T-cells. An essential event in the development of B-/T-cells is the VDJ-recombination of B-/T-cell-receptor genes. The RAG-1/-2 proteins perform the initial steps of VDJ-recombination. We showed that a subpopulation of patients lacking B-/T-cells carry mutations in the RAG-1/-2 genes. Another subpopulation of patients deficient for B-/T-cells are sensitive to irradiation (Radiosensitive SCID). The protein defective in these patients is involved in the development of B-/T-cells and in DNA double-strand break repair. We found mutations in the ARTEMIS gene of these patients and proofed ARTEMIS endo- and exonuclease activity. We demonstrated that the endonuclease activity is essential for VDJ-recombination and mapped the active site of ARTEMIS.

We are also interested in the molecular mechanism of the Wiskott-Aldrich-Syndrome (WAS) which results in a defect of the actin cytoskeleton in hematopoietic cells.

In addition, molecular diagnoses for patients, carriers and prenatal analyses for different genes were established (i.e. IL2 γ c, PNP, RAG1, RAG2, ARTEMIS, ZAP70, IL7R α , and WAS).

Projektkennzahlen

Förderung:	Europäische Kommission: Projekt BIOMED BMH4 CT 98 3007, Projekt QLG1 1999-01090 Universität Ulm
Laufzeit:	5/1998 – 3/2003
Projektleitung:	Dr. Klaus Schwarz
Mitarbeiter:	Dr. Ulrich Pannicke Dr. Doris Niewolik Dr. Zheng Xiao Dr. Markus Ege (Pädiatrie, Gast i. R. eines IZKF-Projektes) Irmgard Brackmann Ingrid Janz Sarah Radecke Eva-Maria Rump

Kontakt:

Dr. med. Klaus Schwarz

Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Immunogenetik Ulm gGmbH

DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gGmbH
Helmholtzstraße 10
89081 Ulm

Telefon
0731 – 150 – 642

Fax
0731 – 150 – 575

E-Mail
klaus.schwarz@medizin.uni-ulm.de

Etablierung von Modellsystemen zur Genkorrektur

Ziel des Projektes:

Verschiedene Modellsysteme (Zellkulturen und Labormaus) für die Genkorrektur an einem endogenen, chromosomalen Locus sollen entwickelt werden.

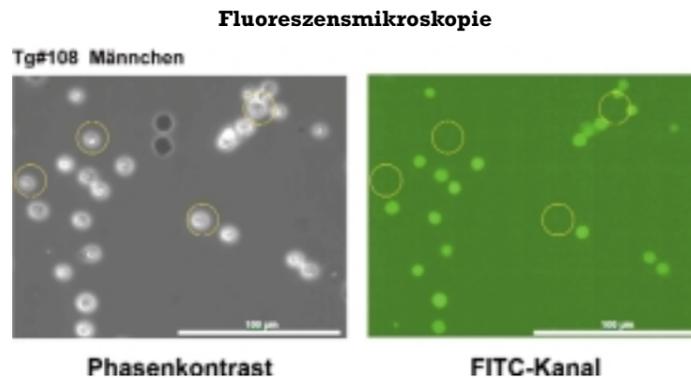
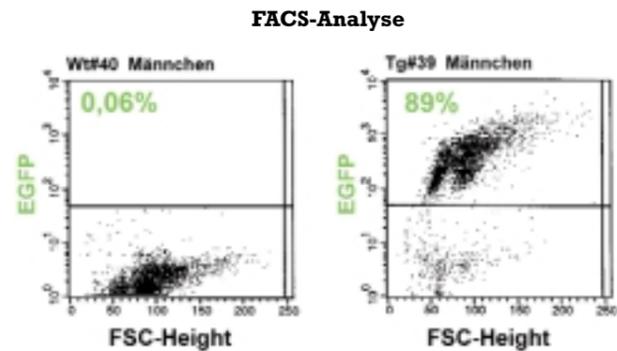


Abb. 1: **Analyse EGFP-transgener Mäuse**
Knochenmarkzellen nach Erythrozytolysen in FACS- und Fluoreszenzmikroskop-Darstellung

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Zur Untersuchung der Genkorrektur in verschiedenen Modellsystemen verwendet die Arbeitsgruppe ein leicht zu untersuchendes Zielgen: Es handelt sich um eine mutierte (m), durch ein vorzeitiges Stopp-Codon veränderte Version des Gens für das autofluoreszierende „Enhanced Green Fluorescent Protein“ (EGFP). Dieses EGFP kann allein durch Blaulicht zu seiner spezifischen Grünfluoreszenz angeregt werden. Wird ein künstlich eingeführtes vorzeitiges Stopp-Codon des mEGFP-Gens „gentherapeutisch“ revertiert, kommt es zur Synthese von funktionellem EGFP, das den Nachweis einer erfolgreichen nukleotidgenauen Korrektur in der lebenden Einzelzelle durch Fluoreszenzdetektion am Mikroskop oder mittels Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) ermöglicht.

Dieses mEGFP-Gen wurde durch homologe Rekombination in die murine ES-Zelllinie BK4 als Einzelkopie auf dem X-Chromosom eingeführt. Diese mEGFP-ES-Zelllinie wurde zum Kleintiermodell weiterentwickelt. Analog zur Integration des mEGFP-Gens wurden auch mit der Wildtyp-Form des Marker-Gens transgene ES-Zelllinien und zwei Mausstämme geschaffen. Das „Knock-in“-Marker-Gen war in allen bisher untersuchten Organen durch die spezifische Fluoreszenz mikroskopisch bzw. in der FACS-Analyse leicht nachweisbar (Abb 1).

Die Existenz dieser Mausstämme lässt zum einen eine extrem leichte Verfolgung von transplantierten Stammzellen jeder Genese zu (EGFP-Mäuse), zum anderen sind die mEGFP-Mäuse grundsätzlich auch für Gentherapie-Studien an nicht-hämatopoetischen Zellen geeignet.

Alle verwendeten Mausstämme sind unter Hetero- und Homozygotie gesund und fertil. Damit steht ein Kleintiermodell zur Verfügung, an dem ein ex vivo- oder in-vivo-Reparaturprotokoll für hämatopoetische Stammzellen etabliert werden kann. Das Modell erlaubt zudem, Genkorrekturprotokolle von der Zellkultur auf den Organismus zu übertragen. Durch Einkreuzen in andere Maus-Linien kann in Zukunft der Einfluss einer anderen genetischen Konstitution auf die Genkorrektur ermittelt werden.

Auf dem Weg der nichthomologen Rekombination wurden zudem analoge mEGFP-Konstrukte in Modellzelllinien (HEK 293) integriert. Hierbei wurden Klone selektioniert, die sich in der Lage der genomischen Transgen-Loci sowie in der Kopienzahl der Expressionskassetten unterscheiden. Die Expressions-Plasmide können zudem zur transienten Kotransfektion mit Reparatur-Oligonukleotiden eingesetzt werden.

Die wichtigsten Ergebnisse

Die Arbeitsgruppe hat Modellsysteme (Zelllinien, Labormausstämme) etabliert, die es erlauben, Genreparaturvorgänge von Zelllinien bis hin zu Primärzellen zu analysieren. Die entwickelten Maus-Modelle ermöglichen die Überprüfung und Weiterentwicklung von Gentherapieprotokollen bei deren Übertragung auf Primärzellen und Organismen.

Allgemeinverständlicher Überblick

Viele Erkrankungen beruhen auf Gendefekten, denen eine Punktmutation zu Grunde liegt. Gelänge es, gezielt diese Gendefekte zu beheben, könnten viele Erkrankungen geheilt werden. Um Methoden zur Behandlung von Gendefekten zu entwickeln, werden „Modelle“ (sowohl Zell- als auch Tiermodelle) benötigt, die den Nachweis einer gezielten und erfolgreichen Gentherapie ermöglichen. Das von dieser Arbeitsgruppe verwendete EGFP- („Enhanced Green Fluorescent Protein“-) Gen ist insofern ausgezeichnet geeignet, als es nur bei gelungener Genkorrektur zur Bildung des fluoreszierenden Proteins kommt, das im Anschluss mit entsprechenden Verfahren leicht nachgewiesen werden kann.

Summary:

Establishment of Gene Repair Models

To allow for a highly sensitive detection of gene correction at the level of single living cells a mutated (m) version of the 'Enhanced Green Fluorescent Protein' (EGFP)-gene is employed. Upon conversion of an artificial premature stop codon into the wild-type codon, cells produce functional EGFP with specific green autofluorescence.

Our first model comprises cell lines cotransfected with the target mEGFP plasmid and an oligonucleotide for gene correction. A second model is based on HEK-293 cells carrying the repair target gene non-homologously introduced in different copy numbers and genomic loci.

For a further model, the mEGFP gene was inserted as single copy transgene into a murine ES cell line. This cell line was developed into two mouse lines with different genetic backgrounds. These animal models can now be used in ex vivo gene therapy studies of hematopoietic cell compartments and possibly other tissues. Wild-type EGFP 'knock-in' mouse lines were also generated. In all tissues of the 'green' mouse, fluorescence-microscopy and FACS analyses revealed expression of the EGFP transgene. These EGFP-mice can serve as donors of genetically marked cells for transplantation experiments.

Projektkennzahlen

Förderung:	Universität Ulm IZKF-Projekt C05
Laufzeit:	01.09.1996-31.08.2002
Projektleitung:	Dr. Klaus Schwarz
Mitarbeiter:	Dr. Frank Radecke Franz Koch Ingrid Peter Sarah Radecke Eva-Maria Rump

Kontakt:

Dr. med. Klaus Schwarz

**Institut für Klinische
Transfusionsmedizin und
Immungenetik Ulm gGmbH**

**DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH**
Helmholtzstraße 10
89081 Ulm

Telefon
0731 – 150 - 642

Fax
0731 – 150 - 575

E-Mail
klaus.schwarz@medizin.uni-ulm.de

Standort: Ulm
Projektleitung:
Dr. med.
Klaus Schwarz

Genkorrektur-Experimente am mEGFP-Locus

Ziel des Projektes:

Projektziele sind die Entwicklung und Erprobung von Genkorrektur-Verfahren.

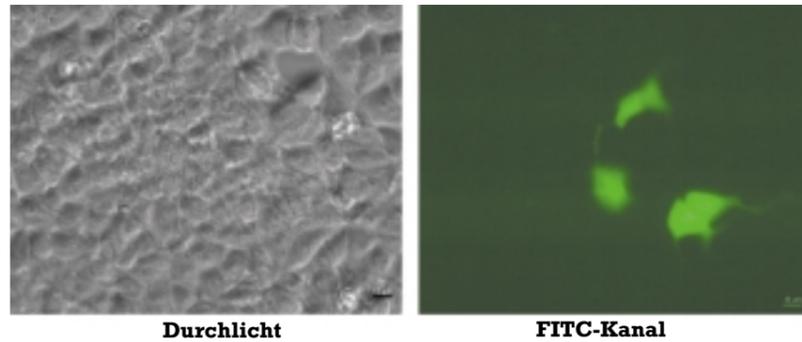


Abb. 1: **Genreparatur**
Oligonukleotid-vermittelte Reparatur des stabil integrierten mEGFP-Gens in 293mEGFP-C35-Zelle.
Fluoreszenzmikroskopische Analyse 3 Tage nach Transfektion

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Grundlage der Genkorrektur-Experimente der Arbeitsgruppe ist die transiente Kotretransfektion des mEGFP-Expressionsplasmids und eines chimären RNA/DNA-Oligonukleotids (Chimärplasten) in HEK293- und CHO-Zellen. Das mEGFP-Gen codiert eine mutierte (m), durch ein vorzeitiges Stopp-Kodon veränderte Version des auto-fluoreszierenden „Enhanced Green Fluorescent Protein“ (EGFP). Wird das vorzeitige Stopp-Kodon des mEGFP-Gens „gentherapeutisch“ revertiert, kommt es zur Synthese von funktionellem EGFP. Obwohl der Chimärplast das vorzeitige Stopp-Kodon im mEGFP-Leseraster in das Wildtyp-Codon umwandeln sollte, konnten zunächst keine EGFP-positiven Zellen detektiert werden. Ein Negativkontroll-Konstrukt, das wie der Chimärplast strukturiert war, jedoch nur DNA-Basen enthielt, führte im Parallelansatz zu 1–2 grünen (revertierten) Zellen unter rund 106 Zellen. Als Kontrolle dieser Experimente wurden einzelsträngige DNA-Oligonukleotide auf ihre Genkorrekturpotenz hin untersucht, wobei an episomalen mEGFP-Genen Reparaturraten von 1–2 %, an chromosomalen Loci Raten um 0,1 % erzielt wurden (Abb. 1). Die Spezifität der Genreparatur wurde mit zwei weiteren einzelsträngigen Oligonukleotiden untersucht: Ein Kontroll-Oligonukleotid war identisch zur Zielgenesequenz, das andere konnte an nicht relevante Bereiche des mEGFP-Leserasters binden. Beide DNA-Moleküle erbrachten keine grün-fluoreszierenden Zellen.

Die Arbeitsgruppe arbeitet darüber hinaus auch daran, mittels Strukturveränderungen der einzelsträngigen Korrektur-Oligonukleotide deren Reparatureffizienz zu verbessern. Hierzu wurden die Parameter Moleküllänge, Nuklease-Resistenz und Methylierungsmuster variiert. Überraschenderweise waren alle bislang eingesetzten Varianten auf den jeweiligen Zielloci vergleichbar aktiv.

Standort: Ulm
Projektleitung:
Dr. med.
Klaus Schwarz

Die wichtigsten Ergebnisse

Kotretransfiziertes episomales mutiertes EGFP- Reporter-gen wurde mit einzelsträngigen DNA-Oligonukleotiden in 1-2 % der Zellen spezifisch korrigiert; somit wurde das Prinzip nukleotidgenauer Genreparatur aufgezeigt. Bei Versuchen an stabil integrierten mEGFP-Transgenen war die Genreparaturrate ca. 5-10 mal niedriger, die Korrekturraten korrelierten stark mit der Kopienzahl des Transgens, waren jedoch unabhängig von Substitutionen des Oligonukleotids.

Das parallel zu den Reparaturexperimenten etablierte „Knock-in“-mEGFP-Labormaus-Modell wird es erlauben, Ergebnisse aus den Zelllinien auf primäre Zellen und auf einen Organismus zu übertragen.

Allgemeinverständlicher Überblick

Während das Ziel des Projekts mit dem Titel „Etablierung von Modellsystemen zur Genkorrektur“ darin bestand, Systeme zu entwickeln, die die Erforschung der Genkorrektur erlauben, befasst sich dieses Projekt ganz konkret mit der Genkorrektur in definierten Zellen. Auch hier steht das EGFP- („Enhanced Green Fluorescent Protein“)-Gen im Mittelpunkt der Genkorrektur-Experimente. Nur bei gelungener Genkorrektur kommt es zur Bildung dieses fluoreszierenden Proteins, so dass sich der Erfolg eines Genkorrektur-Experiments leicht feststellen lässt.

Summary:

Gene Correction at the mEGFP Locus

Our gene correction experiments started with cotransfections of HEK-293 or Chinese Hamster Ovary (CHO) cells with an mEGFP expression plasmid and a chimeric RNA/DNA oligonucleotide (chimeraplast). The mEGFP gene, the correction target, is a point-mutated (m) version of the gene encoding the 'Enhanced Green Fluorescent Protein'. Thus, upon a 'therapeutic' conversion of the stop codon to the wild-type sequence, functional EGFP will be made. Initial experiments with a chimeraplast resulted in no EGFP-positive cell. Corresponding all-DNA molecules however yielded 1–2 green-fluorescent cells in 106 cells.

As a control, single-stranded DNA oligonucleotides were tested for their gene repair capability, surprisingly resulting in 1–2 % of green-fluorescent cells when cotransfected episomal mEGFP genes were targeted. Correction at integrated mEGFP genes showed rates of ~0.1 %. Varying the lengths, the nuclease protection, and the methylation patterns of the oligonucleotides exhibited no improvement of the repair rates.

Projektkennzahlen

Förderung:	Universität Ulm IZKF-Projekt C05
Laufzeit:	01.09.1996-31.08.2002
Projektleitung:	Dr. Klaus Schwarz
Mitarbeiter:	Dr. Frank Radecke Franz Koch Ingrid Peter Sarah Radecke Eva-Maria Rump

Dr. med. Klaus Schwarz

**Institut für klinische
Transfusionsmedizin und
Immungenetik Ulm gGmbH**

**DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH**
Helmholtzstraße 10
89081 Ulm

Telefon
0731 – 150 - 642

Fax
0731 – 150 - 575

E-Mail
klaus.schwarz@medizin.uni-ulm.de

Zell-Microarray-Technologie zum Hochdurchsatz-Screening von Transfektanten

Ziel des Projektes:

Etablierung eines Microarray-basierten Transfektions-Systems zur späteren Hochdurchsatz-Analyse von Funktionsvarianten von Immundefekt (ID)-Genen oder zur Verbesserung der Gentherapie-Protokolle.

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Ein System zur funktionellen Hochdurchsatz-Analyse unterschiedlicher Genprodukte soll entsprechend [Ziauddin und D.M. Sabatini [Microarrays of cells expressing defined cDNAs. Nature 2001 May 3; 411 (6833): 107-110] etabliert werden. Hierbei werden eukaryote Zellen auf einem Glas-Chip ausplattiert, der zuvor auf definierten Positionen mit Expressions-Plasmiden beladen wurde. Über diesen Positionen wachsende Zellen nehmen, vermittelt durch ein Transfektionsagens, die DNA auf. Es bilden sich Gruppen transfizierter Zellen (sog. Zell-Spots) in einem Rasen von untransfizierten Zellen. Die Auswertung eines solchen Zell-Chips kann, je nach Gestaltung des Experiments, mittels (Fluoreszenz-) Mikroskopie, Fluoreszenz-Reader, Western Blotting oder auch Autoradiografie erfolgen.

Bei der Etablierung der Methode soll auch eine funktionelle Analyse des unmittelbar frühen Promotor/Enhancers des Zytomegalievirus erfolgen. Durch gezielte und/oder zufällige Mutagenese hergestellte Promotorkonstrukte sollen in einem Dual-Reporter-System (Fluoreszenzproteine EGFP und DsRed-Express) quantitativ analysiert werden. Durch Sequenzanalyse auffälliger Promotormutanten (unterstützt von Transkriptionsfaktordatenbanken) soll eine funktionelle Kartierung des Wildtyp-Promotors erfolgen. Außerdem sollen Promotorkonstrukte einer „in vitro Evolution“ zugeführt werden, um Mutanten mit neuer Zellspezifität zu erhalten.

Dieser Assay soll nach erfolgreicher Etablierung adaptiert werden, so dass er erlaubt, DNA-Expressionsplasmide und ggf. „small molecular compounds“ zu identifizieren, die z. B. die Genreparatur beeinflussen.

Die wichtigsten Ergebnisse

Die Etablierung der Zell-Microarray-Technologie erfolgte zweigleisig: Zum einen wurde ein PCR-Protokoll zur zufallsgemäßen in-vitro-Mutagenisierung von Genabschnitten erstellt, mit dem viele Varianten des unmittelbar frühen Promotor/Enhancers des Zytomegalievirus generiert wurden. Des Weiteren konnten Bedingungen für das Pipettieren auf einen Chip erarbeitet werden, die zu klar begrenzten Zellarealen mit hoher Transfektionsrate führen. Derzeit wird die Umsetzung dieser Ergebnisse auf den miniaturisierten Hochdurchsatz-Zellarray implementiert.

Allgemeinverständlicher Überblick

Die Verbindung der Mikroarray-Technologie mit der Transfektion lebender Zellen eröffnet die Möglichkeit zum funktionellen Hochdurchsatz-Screening von Genexpressionen. Das Projekt dieser Arbeitsgruppe dient der Etablierung dieser Zell-Microarray-Technologie. Zudem soll am Beispiel des frühen Promotor/Enhancers des Zytomegalievirus ausgelotet werden, ob neben qualitativen auch (semi-)quantitative Aussagen über Expressionsmuster möglich sind.

Summary:

Cell-microarray Technology for High-throughput Screening of Transfectants

A method for functional high-throughput analysis of different plasmid DNA constructs shall be established [J. Ziauddin and D.M. Sabatini, Nature 2001 May 3;411(6833):107-110]:Eucaryotic cells are plated on glass chips carrying arrays of expression plasmids. Mediated by transfection agents the growing cells take up DNA and form 'expression spots' in a lawn of untransfected cells. Expression levels of the cell spots may be detected by (fluorescence-) microscopes, fluorescence readers, Western blots or autoradiograms dependant on the experimental setting.

The establishment of this technology is performed by a functional examination of the CMV-IE promoter/enhancer. Mutants of this promoter are created by directed and/or random mutagenesis protocols and quantitatively analysed. Sequencing of mutants shall allow a functional mapping of the promoter. Finally, an in vitro evolution of promoter mutants shall be carried out, which allows the production of 'alternative constructs', e. g. promoters optimized for expression in certain cell lines.

Projektkennzahlen

Förderung:	Eigenmittel
Laufzeit:	2 Jahre
Projektleitung:	Dr. Klaus Schwarz
Mitarbeiter:	Franz Koch Dr. Frank Radecke Ingrid Peter Sarah Radecke

Dr. med. Klaus Schwarz

Institut für Klinische
Transfusionsmedizin und
Immungenetik Ulm gGmbH

DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH
Helmholtzstraße 10
89081 Ulm

Telefon
0731 – 150 - 642

Fax
0731 – 150 - 575

E-Mail
klaus.schwarz@medizin.uni-
ulm.de

„ Die sprunghafte Entwicklung in der naturwissenschaftlichen Medizin der letzten 30 Jahre hat auch für die Lehre von der Blutstillung und der Thrombose eine fast unübersichtliche Fülle von neuen Ergebnissen und Erkenntnissen gebracht. Waren es früher meistens in den Kliniken angesiedelte Forscher, die sich dem Spezialgebiet von Blutung und Thrombose zuwandten und auf den Theorien von Alexander Schmidt und Paul Morawitz aufbauten, sind es heute im wesentlichen Grundlagenforscher, die unter Einbeziehung der modernen Erkenntnisse in der Biochemie und Molekularbiologie mit neu zur Verfügung stehender Methodologie dem Geheimnis der Blutstillung näher zu kommen suchen. “

Hanns-Gotthard Lasch, Geleitwort

In: C. Müller-Berghaus; B. Pötzsch (Hrsg.): Hämostaseologie, Springer Verlag 1998

Hämostaseologie

Bei der Blutgerinnung, der sogenannten Hämostase, handelt es sich um ein komplexes System, an dem im Wesentlichen Thrombozyten, das Gefäßendothel, plasmatische prokoagulatorische und inhibitorische Gerinnungsfaktoren sowie das Fibrinolyse-System beteiligt sind. In einem komplexen Netzwerk von über 100 bisher bekannten Proteinen mit zahlreichen regulatorischen Wechselwirkungen gewährleistet dieses System einerseits die Fließfähigkeit des Blutes und damit die Versorgung des gesamten Organismus und andererseits die lokal begrenzte, kaskadenartig ablaufende Blutgerinnung am Ort einer Verletzung. Monogenetische Defekte in diesem System können entweder zu einer verstärkten Blutungsneigung (z. B. Hämophilie) oder einem erhöhten Thromboembolierisiko (z. B. Antithrombin- oder Protein-C-Mangel) führen. Darüber hinaus gibt es zahlreiche, in der Normalbevölkerung zum Teil hochfrequente Polymorphismen, die in ihrer Gesamtheit das Risikoprofil für das Auftreten von komplexen Krankheiten wie arterielle und venöse Thromboembolien (Herzinfarkt, Schlaganfall, Thrombose) beeinflussen. Andere Polymorphismen haben Bedeutung für Profile zur Verträglichkeit/Dosierung von hämostaserelevanten Therapeutika.

Durch Identifizierung und Charakterisierung der zugrunde liegenden genetischen Veränderungen in Patienten- und Normalkollektiven können verschiedene pathophysiologische Zusammenhänge zur Blutungs- oder zur Thrombose- neigung aufgedeckt werden. Schwerpunkte stellen hierbei u.a. die genetischen Mangelzustände der Gerinnungsfaktoren Faktor VIII (Hämophilie A) und Faktor XIII, die genetische Variabilität der Blutgerinnungsfaktoren in der Normalbevölkerung sowie die Aufklärung der Struktur des Vitamin K-Zyklus dar.

Die Hämophilie A als der wichtigste Vertreter der Hämophilien ist mit einer Inzidenz von 1:5000 der männlichen Neugeborenen die häufigste schwere Form einer erblich bedingten Blutungsneigung. Ursächlich für diese X-chromosomal rezessiv vererbte Erkrankung sind unterschiedlichste Mutationen im Faktor-VIII (FVIII)-Gen, die zu einem Mangel und/oder Funktionsverlust des Faktor-VIII-Proteins führen. Die bisher ermittelten Mutationsdaten von fast 2000 Hämophilie-A-Patienten aus Deutschland erlauben detaillierte Auswertungen zur Verteilung und Häufigkeit von Mutationen sowie insbesondere auch zur Korrelation der Mutationen zum klinischen Verlauf der Patienten.

Im Gegensatz zu den Hämophilien sind arterielle und venöse thromboembolische Ereignisse mit einer Inzidenz von 3-5 Fällen pro 1000 Individuen pro Jahr sehr häufig. Die Thrombophilien lassen sich einerseits in Phänotypen einteilen, denen seltene Mutationen in einzelnen Genen von inhibitorisch wirkenden Gerinnungsfaktoren (Antithrombin, Protein C, Protein S) zugrunde liegen und andererseits in Phänotypen, die mit häufigen Polymorphismen (z. B. FV-Leiden, Prothrombin 20210) assoziiert sind. Nur etwa 5 % der familiär auftretenden Thrombophilien sind durch einen Mangel der klassischen Inhibitoren Antithrombin, Protein C oder Protein S bedingt, bei einem wesentlich größeren Anteil wird die klinische Manifestation durch das Vorliegen eines oder mehrerer der o. g. Polymorphismen getriggert. Daher werden heute familiäre venöse Thromboembolien als komplexe Erkrankungen aufgefasst, bei denen sich mehrere Gendefekte gegenseitig beeinflussen und schließlich zu einer manifesten Erkrankung führen. Äußere Faktoren, wie zum Beispiel Immobilisation, verstärken das Risiko.

Neben dem komplexen System der plasmatischen Gerinnungsfaktoren, spielen auch die Thrombozyten eine wesentliche Rolle in den hämostaseologischen Prozessen und sind Gegenstand intensiver Forschungsaktivitäten. Bei den bereits im 19. Jahrhundert beschriebenen Thrombozyten handelt es sich um kleine kernlose Zellfragmente, die ebenso wie Erythrozyten und Leukozyten im Knochenmark gebildet und in der Milz abgebaut werden. Die normale Plättchen-Zahl im peripheren Blut liegt zwischen 150.000–380.000/µl. Den Thrombozyten kommt durch ihre Fähigkeit zur Aggregation und die Freisetzung verschiedener Wachstums-, Gerinnungs- und chemotaktischer Faktoren eine wesentliche Rolle bei der primären Hämostase, aber auch bei der Inflammation und Geweberegeneration zu. Die genaue Charakterisierung der thrombozytären Faktoren und ihrer Bedeutung im komplexen Prozess der Wundheilung hat zum Ziel, den Einsatz von autologen und allogenen Thrombozytenfaktoren-Präparaten bei Knochenmark-Aufbaumaßnahmen wie auch in der topischen Wundbehandlung zu verbessern.

Neben ihrer Eigenschaft der Ausschüttung prokoagulatorischer und wachstumsfördernder Faktoren spielen die Thrombozyten aber auch bei der direkten Vermittlung zellulärer Interaktionen am Orte einer Inflammation eine wichtige Rolle. So werden neutrophile Granulozyten, die als wesentliche Effektorzellen der Inflammation gelten, durch die Zellinteraktion mit Thrombozyten am entzündeten bzw. beschädigten Endothel festgehalten. Diese zelluläre Interaktion zwischen Thrombozyten und Neutrophilen führt durch verschiedene Wege der Signaltransduktion zur Aktivierung bzw. Inaktivierung einer Vielzahl von

Genen in den Neutrophilen, deren Bedeutung für den Prozess der Inflammation und Geweberegeneration Gegenstand intensiver Forschung ist. Die initiale Zellinteraktion zwischen Thrombozyten und Granulozyten wird durch das auf Thrombozyten und Endothelzellen exprimierte Membranprotein P-Selektin und dem ebenfalls Membran-verankerten Liganden PSGL-1 auf den Neutrophilen vermittelt. Polymorphismen beider Gene könnten Veränderungen der Bindungseigenschaften hervorrufen und dadurch eine Rolle bei der Entstehung von thromboembolischen Prozessen mit Folgen wie Schlaganfall, akuter Hörsturz und koronare Herzkrankheiten (KHK) spielen.

Bei der „neonatalen Alloimmunthrombozytopenie“ (NAIT) aus dem Bereich der Thrombozytenimmunologie handelt es sich um ein Krankheitsbild, bei dem es zur Immunisierung der Mutter gegen die Antigene der fetalen (kindlichen) Thrombozyten kommt. Diese Konstellation, die mit einem beschleunigten Abbau der fetalen Thrombozyten verbunden ist, tritt bei etwa einer von 1000 Geburten auf und führt in jedem 4.-5. Fall zu schwerwiegenden fetalen Blutungen. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass sowohl intakte fetale Zellen als auch freie fetale DNA im Blutkreislauf der Mutter zirkulieren und für diagnostische Zwecke genutzt werden können. Die Möglichkeit einer nichtinvasiven, pränatalen Typisierung der fetalen Plättchenantigene wäre ein deutlicher Fortschritt in der Frühdiagnose der NAIT. Im Rahmen einer internationalen Studie zur „Thrombozyten-Diagnostik bei NAIT“ sollen ursächliche Antikörper gefunden und neue Nachweismethoden entwickelt werden.

Molekulare Hämostaseologie



Projektleitung:
Priv.-Doz. Dr. med.
Johannes Oldenburg

Standort: Frankfurt

Projektleitung: Priv.-Doz. Dr. med. Johannes Oldenburg

Studium	2000 – 2001 C2-Oberassistent am Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin in Bonn
1981 – 1983 Studium der Biologie in Bonn	
1983 – 1988 Studium der Humanmedizin in Bonn	
1988 Staatsexamen	seit 2001 Leiter der Abteilungen Immunhämatologie und Molekulare Hämostaseologie am DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen
1992 Dissertation	
1998 Habilitation	seit 1995 Aufbau und Leitung der Arbeitsgruppen für Molekulare Hämostaseologie in Bonn, Würzburg und Frankfurt
Berufliche Tätigkeit	Sonstiges
1989 – 1995 Wissenschaftlicher Assistent am Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin in Bonn, Schwerpunkt Hämophiliebehandlung	seit 1995 Mitglied des Arbeitskreises Blut am RKI
1995 – 2000 Wissenschaftlicher Assistent am Institut für Humangenetik in Würzburg	1996 Johann-Lukas-Schönlein-Preis
1997 Facharzt für Transfusionsmedizin	2002 Alexander-Schmidt-Preis der GTH
	2003 Vorstandsmitglied der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e. V. (GTH)

Die Arbeitsgruppe mit weiteren Standorten an den Universitäten in Bonn und Würzburg hat ein überregionales Zentrum für die molekulargenetische Diagnostik von Gerinnungsstörungen etabliert. Für praktisch alle klassischen Gene der Blutgerinnung sind leistungsfähige Mutationsscreeningtechniken etabliert, die eine Diagnostik von erblich bedingten Gerinnungsstörungen erlauben. Anhand eines Normalkollektivs aus Blutspendern wird die genetische Variabilität von Genen der Blutgerinnung in der Normalbevölkerung untersucht. Aufbauend auf den identifizierten genetischen Veränderungen werden pathophysiologische Zusammenhänge zur Blutungsneigung, zur Thromboseneigung und der für die Behandlung von Gerinnungsstörungen verwendeten therapeutischen Substanzen experimentell untersucht.

Schwerpunkte der Arbeitsgruppe stellen die genetischen Mangelzustände der Gerinnungsfaktoren Faktor VIII (Hämophilie A) und Faktor XIII, die Genotypisierung von Patienten mit Hereditärem Angioödem, die Erstellung von Polymorphismuskarten bei Genen der Blutgerinnung sowie die Aufklärung der Struktur des Vitamin K-Zyklus dar. Die Projekte der Arbeitsgruppe werden u. a. von den Forschungsprogrammen „Deutsches Humangenomprojekt“ und „Funktionelle Proteomforschung“ des BMBF unterstützt.

Working Group: Molecular Hemostaseology **Priv.-Doz. Dr. med. Johannes Oldenburg, head**

The group of which part is working in Bonn and Würzburg has established an overregional center for the molecular genetic diagnosis of blood coagulation disorders. Protocols for highly efficient mutation screening procedures have been set up for most of the classical blood coagulation genes. In a cohort of healthy blood donors the group is addressing the genetic variation of the genes of the coagulation cascade aiming to establish individual hemostasis profiles. On the basis of the identified genetic alterations in patient and normal cohorts the pathomechanism associated with bleeding, thrombosis or the use of specific therapeutic drugs are elucidated.

The main fields of the group are the genetically caused deficiencies of factor VIII (Hemophilia A) and factor XIII, the genotyping of patients with Hereditary Angiooedema and the exploration of the structure of the vitamin K cycle. The projects are supported by the BMBF programs 'German Human Genom Project' and 'Functional Proteom Research'.

Molekularbiologie

Standort: Mannheim

Projektleitung: Dr. rer. nat. Peter Bugert

Studium	Berufliche Tätigkeit
1985 – 1988 Grundstudium Biologie in Würzburg mit Abschluss Vordiplom	1995 – 2000 Postdoc im Labor für Molekulare Onkologie der Abteilung Urologie, Uniklinik Heidelberg
1988 – 1990 Hauptstudium Biologie (Diplom) in Heidelberg	seit 2000 Tätigkeit am Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie in Mannheim; Aufbau und Leitung des Molekularbiologischen Labors; aktuelle Forschungsprojekte der Arbeitsgruppe befassen sich mit immunogenetischen Aspekten der Thrombozyten
1991 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Zellbiologie, Ladenburg	
1991 – 1995 Promotion am Max-Planck-Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg	Sonstiges
	- Projektleiter gemäß Gentechnikgesetz - Strahlenschutzbeauftragter gemäß Strahlenschutzverordnung

Die im März 2000 gegründete Arbeitsgruppe - Molekularbiologie - am Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie, Mannheim, besteht neben dem Leiter, Diplom-Biologe Dr. rer. nat. Peter Bugert, aus einer MTLA (bis März 2002: Sonja Mattler; seit April 2002: Gabriele Rink) und drei Medizinstudenten als Doktoranden (Marion Vosberg, Andrea Lese und Linda Rütten).

Die methodischen Schwerpunkte der Arbeitsgruppe sind: - Entwicklung neuer Verfahren zur Genotypisierung verschiedener Polymorphismen (PCR-SSP, Arrayhybridisierung etc.), - Anwendung von Microarraysystemen zur Analyse von Genexpression, - Bereitstellung aller gängigen molekularbiologischen Methoden für die Forschungsprojekte im Institut.

Die molekulare Immunogenetik der Thrombozyten bildet den thematischen Schwerpunkt der Arbeitsgruppe mit folgenden Fragestellungen: - Identifizierung thrombozytärer Rezeptorpolymorphismen, - neue Genfunktionen in Megakaryozyten/Thrombozyten, - Aktivierung inflammatorischer Gene durch Thrombozyten.

Working Group: Molecular Biology **Dr. rer. nat. Peter Bugert, head**

In March 2000 the – Molecular Biology Group – was founded at the Institute of Transfusion Medicine and Immunology, Mannheim. The group members are Dr. Peter Bugert (Head), Sonja Mattler (Technician, March 2000 to March 2002), Gabriele Rink (Technician since April 2002) and three Medical students (Marion Vosberg, Andrea Lese and Linda Rütten).

The focus on methods and techniques includes: - Development of novel techniques for genotyping of different polymorphisms (PCR-SSP, array hybridisation, etc.), - Application of microarray systems for gene expression profiling, - Support of all research projects in the Institute with molecular biological standard techniques.

The molecular immunogenetics of platelets represent the research focus of the group including the following issues: - Identification of polymorphisms in platelet receptors, - novel gene functions in megakaryocytes/platelets, - Activation of inflammatory genes by platelets.



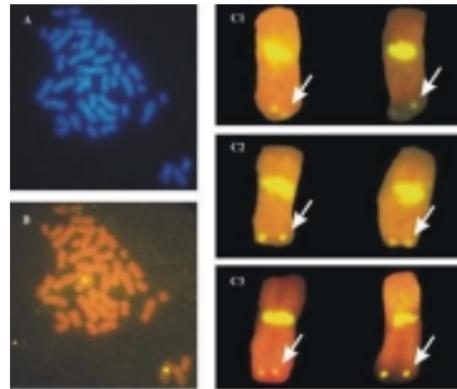
Projektleitung:
Dr. rer. nat.
Peter Bugert

Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Hämophilie A

Ziel des Projektes:

Das Faktor-VIII-Gen ist mit 26 Exonen und 9.6 kb mRNA eines der großen Gene des humanen Genoms. Mit effizienten Hochdurchsatzscreeningmethoden soll eine genetische Charakterisierung der 3500 schwer betroffenen Hämophilie-A-Patienten in Deutschland durchgeführt werden. Diese Daten sollen Aufschluss über den Einfluss der Mutation auf den klinischen Krankheitsverlauf der Patienten geben. Bei Patienten ohne kausalen Mutationsbefund sollen weiterführende Untersuchungen wie mRNA-Diagnostik und genomweite Kopplungsanalyse zur Identifizierung neuer, für eine Hämophilie A ursächliche Kandidatengene durchgeführt werden.

Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) des Faktor des VIII-Gens



Das Faktor-VIII-Gen liegt am äußersten Ende des langen Arms des X-Chromosoms (Pfeile), (Abb.: Tanja Förster)

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Die klassischen Hämophilien gliedern sich in die Formen der Hämophilie A (FVIII-Mangel), der Hämophilie B (FIX-Mangel) und der von-Willebrand-Erkrankung.

Im Rahmen dieses Projektes werden die Mutationsdaten schwer betroffener Hämophilie-A-Patienten einem zentralen Register zugeführt und dort mit dem Phänotyp bzw. klinischen Verlauf der Patienten, insbesondere der Hemmkörperbildung, korreliert. Diese stellt die heutzutage häufigste und schwerste Komplikation der Hämophiliebehandlung dar.

Auf der Basis der Ergebnisse sollen bestehende Behandlungsregimes und -präparate optimiert und darüber hinaus neue Therapieansätze entwickelt werden.

Die Erkenntnisse von Art und Verteilung der Mutationen im FVIII-Gen sollen zu einem besseren Verständnis der Mutationspathomechanismen im FVIII-Gen und der Struktur-/Funktionsbeziehungen der einzelnen FVIII-Proteindomänen beitragen.

Das Gesamtprojekt bezieht sich auf die zweite Förderphase des Deutschen Human-genom-Projekts, Teil E „Pharmako-Genomik: Verknüpfung der Humangenomforschung mit Pharmakologie und Medizin“.

Die wichtigsten Ergebnisse

Bisher konnten 1600 Patienten aus 1100 Hämophilie-A-Familien molekular-genetisch charakterisiert werden. Missense-Mutationen (40 %) und Intron 22 Inversionen (30 %) stellen die häufigsten Mutationsereignisse dar. Nonsense-Mutationen und kleine Deletionen/Insertionen hatten nur einen Anteil von jeweils etwa 10 %. Andere Mutationen wie große Deletionen, Spleißstellenmutationen und Intron 1 Inversionen traten mit 1 % und 3 % vergleichsweise selten auf. Insgesamt wurden 250 neue Allele des FVIII-Gens identifiziert.

Die Mutationspathomechanismen betreffend zeigte sich, dass etwa 25 % aller Punktmutationen nach der Zygotenbildung während der frühen Embryogenese als somatische Mosaikmutationen entstehen und nicht bereits in den Keimzellen vorliegen (Leuer, Oldenburg et al. 2001). Diese Erkenntnis hat weit reichende Auswirkungen für die genetische Beratung, da sich hinter scheinbaren Neumutationen bei Müttern von Hämophilen somatische Mosaikmutationen mit einem erhöhten Wiederholungsrisiko für die Geburt eines weiteren hämophilen Sohnes verbergen können.

Als weiteres wichtiges Ergebnis ist zu werten, dass der Typ der Mutation ganz entscheidend für das Risiko der Hemmkörperbildung ist, die bei 20-30 % der Betroffenen auftritt. Insgesamt konnten 11 verschiedene Mutationstypen- und Subtypen mit unterschiedlichen Hemmkörperisiken von 3 % bei z. B. Missense-Mutationen, bis 88 % bei großen Deletionen identifiziert werden. Ein hohes Risiko haben insbesondere solche Mutationen, die nicht mit endogener Faktor-VIII-Proteinbildung einhergehen und/oder im Bereich der VWF-/Phospholipidbindungsregion liegen.

Allgemeinverständlicher Überblick

Die Hämophilie A ist mit 1:5000 der männlichen Neugeborenen die häufigste schwere Form einer erblich bedingten Blutungsneigung. Ursächlich für die Erkrankung sind unterschiedlichste Mutationen im Faktor-VIII(FVIII)-Gen, die zu einem Mangel und/oder einem Funktionsverlust des Faktor-VIII-Proteins führen. Schweregrad und Häufigkeit der Blutungen sind abhängig vom Ausmaß der FVIII-Verminderung. Die Therapie erfolgt durch die Gabe von aus Plasma oder gentechnisch hergestelltem FVIII-Konzentrat.

Molekulargenetische Untersuchungsmethoden dienen dazu, die zur Hämophilie A führenden Mechanismen aufzuklären und den Krankheitsverlauf der Patienten besser zu verstehen. Auf dieser Grundlage können neue Therapieansätze entwickelt werden.

Summary:

Genotype-phenotype correlation in hemophilia A

Mutation analysis is performed in about 3500 patients from Germany with severe hemophilia A. Obtained genotypic and phenotypic data are registered and correlated with the clinical course of the patients, especially the risk of inhibitor formation. So far we have identified 11 mutation (sub)types with distinct different risk of inhibitor development, ranging from inhibitor prevalences of 5 % in missense mutations to 88 % in large deletions. The main factors driving the risk of inhibitor formation are the presence of endogenous factor VIII protein and the localisation of the mutation within the FVIII gene. Furthermore our data revealed that somatic mosaicisms represents a common mutation origin in hemophilia A and therefore must be considered in genetic counselling. The project is supported by an initiative of the German Human Genome Project.

Projektkennzahlen

Förderung:	BMBF
Laufzeit:	01/2000 bis 06/2004
Projektleitung:	Priv.-Doz. Dr. Johannes Oldenburg
Mitarbeiter:	MuDr. Anna Pavlova (Post Doc) Maria Lim-Eimer (MTA)
Kooperationen:	Prof. Dr. C. Müller-Reible, Dr. J. Schröder (Institut für Humangenetik, Universität Würzburg) Dr. H.-H. Brackmann, PD Dr. R. Schwaab (Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Bonn) Prof. Dr. W. Schramm (Abteilung für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin, LMU München) Prof. Dr. J. Graw (GSF München)

Kontakt:

Priv.-Doz. Dr. med. Johannes Oldenburg

Institut für
Transfusionsmedizin und
Immunhämatologie
Frankfurt

DRK-Blutspendedienst
Baden Württemberg –
Hessen gGmbH
Sandhofstraße 1
60528 Frankfurt am Main

Telefon
069 – 6782 - 177

Fax
069 – 6782 - 204

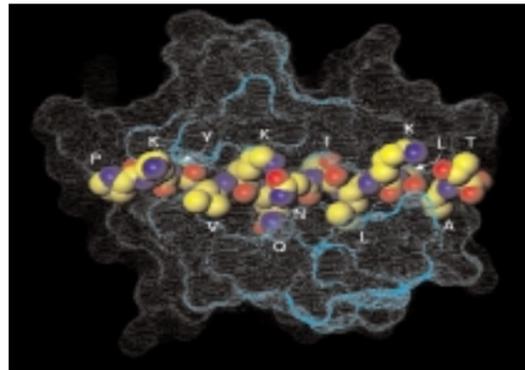
E-Mail
joldenburg@bsdhessen.de

Immungenetik der Hemmkörper-Hämophilie-A

Ziel des Projektes:

Bei einem Kollektiv von 150 Hämophilie-A-Patienten mit Hemmkörperbildung und einer entsprechenden Kontrollgruppe mit bekannten Mutationen im Faktor-VIII-Gen soll der Einfluss von Merkmalen des HLA-Systems auf die Hemmkörperbildung untersucht werden.

Einbettung eines Peptids in die räumliche Struktur eines HLA-Klasse II-Moleküls



Standort: Frankfurt
 Projektleitung:
 Priv.-Doz. Dr. med.
 Johannes Oldenburg

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Als schwerste Komplikation der Substitutionstherapie mit Faktor-VIII-Konzentraten gilt heute die Bildung von Hemmkörpern bei Hämophilie-A-Patienten. Dabei neutralisieren die Hemmkörper den zugeführten Gerinnungsfaktor, so dass dieser therapeutisch unwirksam bleibt. Alternative (Bypass-)Gerinnungspräparate haben keine vergleichbar sichere hämostatische Wirkung, obwohl sie in der Regel eine ausreichende akute Blutstillung erlauben. Eine Prophylaxe ist allerdings mit diesen Präparaten nicht möglich, weshalb die Patienten ein hohes Blutungsrisiko haben und langfristig einer Progression von Blutungsfolgen, insbesondere der Gelenkarthropathie, ausgesetzt sind. Ihre Prognose hinsichtlich Lebensqualität und Lebenserwartung ist deutlich eingeschränkt und nur durch die Eradikation des Hemmkörpers, die bei etwa 80 % der Patienten gelingt, wieder zu normalisieren.

Der Pathomechanismus der Hemmkörperbildung basiert auf einer Immunantwort des Patienten in Form einer Anti-FVIII-Alloantikörperbildung, da der zugeführte FVIII ein körperfremdes Protein darstellt. Seit kurzem ist bekannt, dass der Typ der Mutation einen entscheidenden Einfluss auf das Risiko der Hemmkörperbildung hat. Unter Berücksichtigung des Einflusses der Mutation im FVIII-Gen, z. B. Untersuchung von Patienten mit gleichem Mutationstyp, lässt sich die Bedeutung von Merkmalen des HLA-Systems für die Hemmkörperbildung feststellen.

Die wichtigsten Ergebnisse

Bisher konnte bei 150 Patienten mit einem Faktor-VIII-Hemmkörper die für die Hämophilie A ursächliche Mutation charakterisiert werden, so dass bei dieser Patientengruppe und einer gleich großen Kontrollgruppe mit entsprechendem Alters- und Mutationsprofil der Einfluss von bestimmten HLA-Merkmalen auf die Hemmkörperbildung untersucht werden kann.



Allgemeinverständlicher Überblick

Die Bildung von Hemmkörpern nach Substitution von FVIII-Gerinnungskonzentrat stellt die schwerst wiegendste Komplikation der Hämophiliebehandlung dar. Die Hemmkörper neutralisieren die Wirkung des zugeführten Gerinnungsfaktors, wodurch die Standardtherapie unwirksam wird. In dieser Studie sollen die Einflussfaktoren auf die Hemmkörperbildung, insbesondere die Rolle des HLA-Systems untersucht werden, um genetische Merkmale zu identifizieren, anhand derer sich eine Hemmkörperbildung vorhersagen lässt

Summary:

Immunogenetic background of inhibitor formation in hemophilia A

Inhibitor formation affects 20-30 % of patients with severe hemophilia A and represents the major complication of substitution therapy with factor VIII concentrates. Since prophylactic treatment is not possible in those patients they are at risk for progressive joint damage. The pathomechanism of inhibitor formation is only partly understood. Beside the FVIII mutation genetic determinants of the immune response genes have been suggested to play an important role for inhibitor formation. In the present study a cohort of 150 patients with inhibitors and known FVIII gene mutation have been gathered to study the influence of the HLA system on the risk of inhibitor formation.

Projektkennzahlen

Förderung:	Industriemittel
Laufzeit:	01/2002 bis 12/2003
Projektleitung:	Priv.-Doz. Dr. Johannes Oldenburg
Mitarbeiter:	MuDr. Anna Pavlova (Post Doc)
Kooperationen:	Prof. Dr. C. Müller-Reible Dr. J. Schröder (Institut für Humangenetik, Universität Würzburg) Dr. H.-H. Brackmann, PD Dr. R. Schwaab (Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Bonn)

Kontakt:

Priv.-Doz. Dr. med. Johannes Oldenburg

Institut für
 ransfusionsmedizin und
 Immunhämatologie
 Frankfurt

DRK-Blutspendedienst
 Baden Württemberg –
 Hessen gGmbH
 Sandhofstraße 1
 60528 Frankfurt am Main

Telefon
 069 – 6782 - 177

Fax
 069 – 6782 - 204

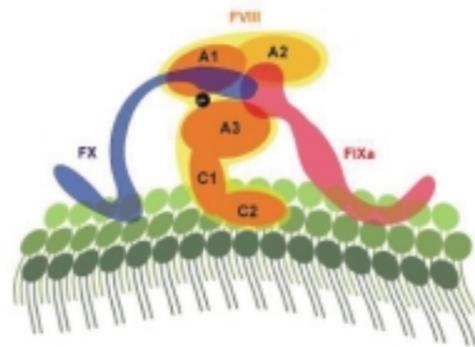
E-Mail
 joldenburg@bsdhessen.de

Molekulare Grundlagen hoher Faktor-VIII-Spiegel bei venöser Thrombembolie

Ziel des Projektes:

Ziel des Projektes ist es, Faktoren zu ermitteln, welche die Transkription des Faktor-VIII-Gens beeinflussen. Des Weiteren sollen mittels Yeast-Two-Hybrid-Technik bisher unbekannte Protein-Protein-Interaktionen des Faktor VIII identifiziert werden.

Schematische Darstellung der Funktion des Faktor-VIII-Proteins im Tenase-Komplex



Hintergrund und Projektbeschreibung:

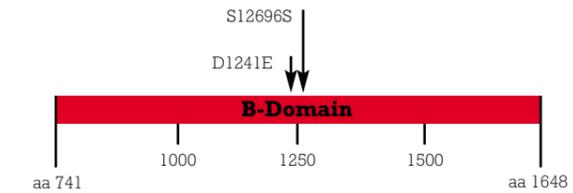
Bis Anfang der 90er Jahre war bei nur ca. 10 % der familiären venösen Thrombembolien ein hereditärer Defekt des Gerinnungssystems nachzuweisen. Dies änderte sich mit der Entdeckung der APC-Resistenz (und des zugrunde liegenden Gendefektes, der Faktor-V-Leiden-Mutation) und des Prothrombin-20210-Polymorphismus grundlegend. Heute spricht man von einer komplexen Erkrankung, wobei sich mehrere Gendefekte gegenseitig beeinflussen und schließlich zu einer manifesten Erkrankung führen. Äußere Faktoren, wie zum Beispiel Immobilisation, verstärken das Risiko.

Inzwischen wird dem Faktor VIII eine zentrale Bedeutung bei der Pathogenese venöser Thrombembolien zugeschrieben. Das Risiko hoher Faktor-VIII-Spiegel ist für ein erstmaliges thrombotisches Ereignis ähnlich hoch wie das Risiko infolge einer APC-Resistenz (Odds ratio=4,8 vs. 6,6 laut der Leiden-Thrombophilia-Study, Van der Meer et al. 1997). Thrombosepatienten mit erhöhten Faktor-VIII-Spiegeln haben mit einer ebenso hohen Rezidivwahrscheinlichkeit zu rechnen wie symptomatisch gewordene Faktor-V-Leiden-Träger. Neue Hinweise gehen in Richtung einer Erbllichkeit der Faktor-VIII-Erhöhen. Verschiedene exogene Einflussfaktoren wie die Akutphase-Eigenschaft, die Höhe des von Willebrand-Faktor-Spiegels, die Art der Blutgruppe und das Alter erschweren die Untersuchungen allerdings. Auch ist die Funktion der B-Domäne des Faktor-VIII-Proteins, die 40 % der Gesamtgröße des Moleküls ausmacht, weitgehend unbekannt.

Die wichtigsten Ergebnisse

Die DNA-Sequenz und -Struktur des Faktor-VIII-Gens bei der Ratte, die als Modell für die Transkriptionsstudien dienen soll, wurde aufgeklärt. Die cDNA der Ratte besteht aus 6777 Nukleotiden und codiert ein 2258 Aminosäuren großes Faktor-VIII-Protein. Verglichen mit dem Faktor-VIII-Protein anderer Spezies ist die Homologie zum humanen Faktor VIII am geringsten ausgeprägt.

Hohe Konserviertheit der B domain des humanen faktor VIII



In der kaukasischen Bevölkerung sind lediglich 2 Polymorphismen in der B-Domäne des humanen Faktor VIII bekannt.

Allgemeinverständlicher Überblick

Die familiären venösen Thrombembolien werden heute als komplexe Erkrankungen bezeichnet. Ursache sind mehrere gleichzeitig vorliegende Gendefekte, die sich gegenseitig beeinflussen. Äußere Faktoren wie beispielsweise Immobilisation verstärken das Risiko.

Die Erforschung der Mechanismen erhöhter Faktor-VIII-Spiegel hat eine wichtige Bedeutung für das Verständnis der Entstehung thrombotischer Krankheitsbilder und für die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien bei der Gentherapie der Hämophilie A.

Summary:

Molecular basis of increased factor VIII levels in the pathogenesis of thrombotic disease

Arterial and venous thrombembolism are frequent disorders, with a combined incidence of 5 to 10 cases per 1000 individuals per year. Many genetic risk factors as factor V Leiden mutation and prothrombin 20210 gene mutation have been identified. Most recently, increased factor VIII levels have been found to play an important role for the clinical manifestation of thrombosis. In the present study the molecular basis of increased factor VIII levels, especially those affecting the transcription of the factor VIII gene, will be investigated. To allow for using rat as an animal model the sequence and structure of the rat FVIII cDNA has been dissolved, revealing a quite divergent factor VIII protein when compared to human factor VIII. Finding the molecular basis of increased FVIII levels will be important for the pathogenesis of thrombosis as well as for the efficacy of future gene therapy protocols for hemophilia A.

Projektkennzahlen

Förderung:	DFG
Laufzeit:	07/2001 bis 06/2004
Projektleitung:	Priv.-Doz. Dr. Johannes Oldenburg
Mitarbeiter:	Dr. Matthias Watzka (Post Doc)
Kooperationen:	PD Dr. C. Schambeck, Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Universität Würzburg

Standort: Frankfurt

Projektleitung:
Priv.-Doz. Dr. med.
Johannes Oldenburg

Kontakt:

Priv.-Doz. Dr. med. Johannes Oldenburg

Institut für
Transfusionsmedizin und
Immunhämatologie
Frankfurt

DRK-Blutspendedienst
Baden Württemberg –
Hessen gGmbH
Sandhofstraße 1
60528 Frankfurt am Main

Telefon
069 – 6782 - 177

Fax
069 – 6782 - 204

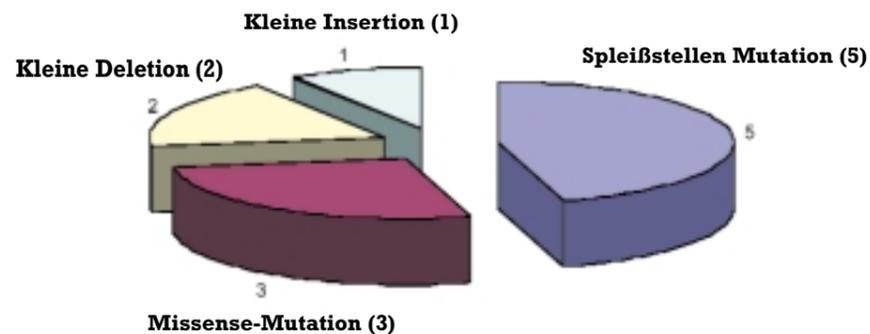
E-Mail
joldenburg@bsdhessen.de

Molekulare Diagnostik von erblich bedingten hämorrhagischen und thrombembolischen Krankheitsbildern der Blutgerinnung

Ziel des Projektes:

Projektziel ist die molekulargenetische Diagnostik verschiedener erblich bedingter hämorrhagischer und thrombembolischer Krankheitsbilder.

Mutationen bei Faktor-XIII-Mangel



Hintergrund und Projektbeschreibung:

Schwerwiegende Mangelzustände der Gerinnungsfaktoren Fibrinogen, Faktoren II, V, VII, X, XI und XIII und damit einhergehende erbliche Blutungsneigungen sind sehr selten und weisen Inzidenzen von nur 1:500.000 bis 1:>1.000.000 auf. Dagegen sind arterielle und venöse thrombembolische Ereignisse mit 3-5 Fällen pro 1000 Individuen und Jahr vergleichsweise häufige Ereignisse, wobei nur etwa jeder 20. Fall auf Mutationen in einem Gen der inhibitorisch wirkenden Gerinnungsfaktoren (Antithrombin, Protein C, Protein S) zurückzuführen ist. Innerhalb des Projektes wurden die Protokolle für die molekulargenetische Untersuchung der genannten Gerinnungsfaktoren etabliert, von denen nachfolgend der Faktor XIII und der Faktor VII exemplarisch angeführt sind.

Der Faktor XIII vermittelt die kovalente Verknüpfung der Fibrinpolymere und ist damit essenziell für die Festigkeit des Thrombus. Der schwere FXIII-Mangel ist mit 1:3.000.000 äußerst selten. Die Patienten können eine schwere Blutungssymptomatik mit Gelenkblutungen und intrazerebralen Blutungen aufweisen.

Bei einer Gefäßverletzung stellt die Bindung von aktiviertem Faktor VII (Faktor VIIa) an Gewebethromboplastin („Tissue Factor“, TF) den entscheidenden Auslöser für die plasmatische Gerinnung dar. Der TF wirkt hierbei als Kofaktor, der die Reaktionsgeschwindigkeit der Faktor-VIIa-vermittelten Aktivierung der Proenzyme Faktor X und Faktor IX um Zehnerpotenzen steigert. Mit einer Inzidenz von 1:500.000 ist der Faktor-VII-Mangel vergleichsweise häufig unter den seltenen Hämorrhagien.

Die wichtigsten Ergebnisse

Bislang wurden Protokolle für ein schnelles und sicheres Mutationsscreening aller klassischen prokoagulatorischen und inhibitorischen Gerinnungsfaktoren etabliert und damit insbesondere Patientenkollektive mit Faktor-XIII-Mangel und Faktor-VII-Mangel untersucht.

In Zusammenarbeit mit Prof. Seitz aus dem Paul-Ehrlich-Institut konnten die molekularen Ursachen bei 26 Patienten mit Faktor-XIII-Mangel aus mehreren Ländern Europas identifiziert werden. Klinische Daten haben hierbei erstmals gezeigt, dass auch heterozygote Mutationsträger mit Faktor-XIII-Spiegeln von etwa 50 % Blutungsneigungen und Wundheilungsstörungen aufweisen können.

Darüber hinaus wurden in einem Kollektiv von 21 Familien mit Faktor-VII-Mangel die molekularen Ursachen ermittelt und dabei insgesamt 34 Mutationen identifiziert, von denen 7 Mutationen nicht vorbeschrieben waren. Es zeigte sich, dass die Mutationen bei 5 Familien in homozygoter, bei 8 Familien in compound heterozygoter und bei 7 Familien in heterozygoter Form vorlagen. Bei den Familien mit heterozygot vorliegender Mutation führten funktionell wirksame Polymorphismen im Faktor-VII-Gen zu einer weiteren Verminderung des Faktor-VII-Spiegels und damit zur klinischen Manifestation der Blutungsneigung.

Allgemeinverständlicher Überblick

Die erblich bedingten Krankheitsbilder im Bereich der Blutgerinnung reichen von verschiedensten Formen einer Blutungsneigung bis hin zum arteriellen oder venösen thrombembolischen Blutgefäßverschluss. Bei vielen dieser Erkrankungen liegen Defekte in einzelnen Genen von Gerinnungsfaktoren vor, die sich mit den heute verfügbaren Methoden diagnostizieren lassen.

Summary:

Molecular genetic diagnosis of hereditary hemorrhagic and thrombembolic disorders

Protocols for the genetic analysis of most monogenetic hemorrhagic and thromboembolic disorders have been established in our group. So far 26 patients with factor XIII deficiency from all over Europe have been characterized. Of special interest is one female patient with a heterozygous missense mutation who showed symptoms of bleeding and wound healing inspite of factor XIII levels in the range of 50 %. In another cohort of 21 patients with factor VII deficiency 34 mutations could be found revealing 5 homozygous, 8 compound heterozygous and 7 heterozygous mutations. In the families with heterozygous mutations the concomitant presence of polymorphisms led to the clinical manifestation.

Projektkennzahlen

Förderung:	Eigenmittel
Laufzeit:	seit 1/2002
Projektleitung:	Priv.-Doz. Dr. Johannes Oldenburg
Mitarbeiter:	Dr. Christof Geisen (Post Doc) Dr. Vytautas Ivaskевичius (Stipendiat)
Kooperationen:	Prof. Dr. R. Seitz (Paul-Ehrlich-Institut, Langen)

Standort: Frankfurt
Projektleitung:
Priv.-Doz. Dr. med.
Johannes Oldenburg

Kontakt:

Priv.-Doz. Dr. med. Johannes Oldenburg

Institut für
Transfusionsmedizin und
Immunhämatologie
Frankfurt

DRK-Blutspendedienst
Baden Württemberg –
Hessen gGmbH
Sandhofstraße 1
60528 Frankfurt am Main

Telefon
069 – 6782 - 177

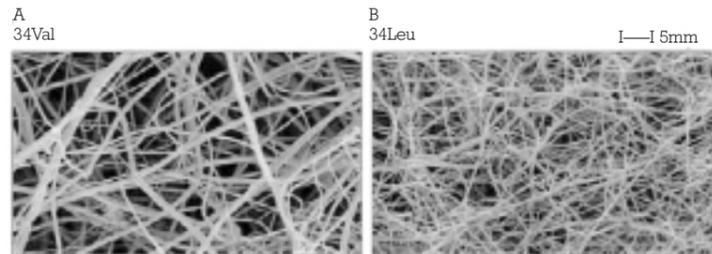
Fax
069 – 6782 - 204

E-Mail
joldenburg@bsdhessen.de

Polymorphismenkarte von Genen der Blutgerinnung

Ziel des Projektes:

Innerhalb dieses Projektes sollen Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs = single nucleotide polymorphism) mit einer Prävalenz > 1 % in den für die Blutgerinnung relevanten Genen systematisch identifiziert werden.



Elektronenmikroskopische Aufnahme der Festigkeit eines Fibringerinnsels in Abhängigkeit vom Val43Leu-Polymorphismus im Faktor-XIII-Gen (Ariens et al. 2000)

Die wichtigsten Ergebnisse

Bisher konnten die Polymorphismenkarten von 400 Individuen bei den Genen der zwei Proteinuntereinheiten des Faktor XIII und den drei Proteinketten des Fibrinogens fertiggestellt werden. Dabei wurden insgesamt 45 SNPs identifiziert, von denen die Hälfte nicht vorherbeschrieben war. Die Untersuchung der Haplotypstruktur ergab einen kleinen, aus drei SNPs bestehenden SNP-Block in der A-Untereinheit des FXIII Bereichs und einen größeren SNP-Block in dem Gen der alpha-Kette des Fibrinogens. Weitere Gene, von denen Polymorphismenkarten erstellt werden, sind die Gerinnungsfaktoren II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, Antithrombin, Protein C, Protein S, TAPI und Cytochrom P4502C9.

Allgemeinverständlicher Überblick

Die menschlichen Gene zeichnen sich durch eine Vielzahl unterschiedlicher DNA-Sequenzen aus. Trotzdem sind sie für jedes Individuum so spezifisch wie ein Fingerabdruck. Etwa alle 300 Basenpaare findet sich eine Sequenzvariante. Viele davon sind bedeutungslos. Andere hingegen scheinen zur Entstehung komplexer Krankheiten beizutragen oder davor zu schützen bzw. können einen positiven oder negativen Einfluss auf die Wirkung von Medikamenten haben.

In diesem Projekt sollen die Sequenzvariationen bei Genen der Blutgerinnung identifiziert und zur Erstellung eines individuellen Risikoprofils für Erkrankungen der Blutgerinnung verwendet werden.

Summary:

Polymorphism map of the genes involved in blood coagulation

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes of blood coagulation are quite common and impressively demonstrate the genetic variation of the hemostasis system in the normal population. Some of these sequence variations are known to influence the clinical manifestation of thrombotic disorders or the efficacy of drugs acting in the coagulation cascade. The present study investigates 400 alleles from most genes of the hemostasis system aiming an almost quantitative identification of SNPs with a frequency of > 1%. The SNP data will be aggregated to haplotypes which might be useful for the vision of assessing hemostatic risk profiles by biochip based diagnostic tools.

Projektkennzahlen

Förderung:	Industriemittel
Laufzeit:	seit 1/2000 - 12/2003
Projektleitung:	Priv.-Doz. Dr. Johannes Oldenburg
Mitarbeiter:	Dr. Christof Geisen (Post Doc) Dr. Vytautas Ivaskevicius (Stipendiat) Laurynas Daugela (Stipendiat) Frau Jelena Farac (Doktorandin) Shahin Khailollahi (Doktorand) Frau Sa Lan Nguyen (Doktorandin) Frau Sahar Zaghian (Doktorandin)
Kooperationen:	Prof. Dr. T. Wienker, Dr. M. Steffens (Abteilung für Genetische Epidemiologie, Universitätsklinikum Bonn) Dr. R. Schwaab (Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Bonn)

Standort: Frankfurt

Projektleitung:
Priv.-Doz. Dr. med.
Johannes Oldenburg

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Das menschliche Genom ist in der Normalpopulation hinsichtlich seiner DNA-Sequenz variabel und für jedes Individuum so spezifisch wie ein Fingerabdruck. Etwa alle 300 Nukleotide findet sich eine Sequenzvariation, in der Regel ein Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP = single nucleotide polymorphism). Die meisten dieser SNPs außerhalb von Genen sind bedeutungslos. Sequenzvariationen innerhalb der codierenden Bereiche von Genen können dagegen Einfluss auf die Quantität und/oder Qualität des gebildeten Proteins nehmen. Obgleich sie in der gesunden Population als so genannte "Normalvariante" auftreten, können sie zur Ausbildung komplexer Erkrankungen beitragen oder aber vor diesen schützen oder auch positiven oder negativen Einfluss auf die Wirkung von Medikamenten nehmen.

Ganz besonders gilt dies für die Gene der Blutgerinnung. Hier wurden in den vergangenen Jahren mehrere medizinisch relevante Polymorphismen beschrieben, die für das Risiko von thrombotischen Komplikationen (u. a. Faktor-V-Leiden- und Prothrombin-Mutation) oder die gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber therapeutischen Substanzen (Faktor-IX-Propeptidvarianten bei Marcumar) verantwortlich sind. Auf der Grundlage einer DNA-Bank von Blutspendern und der neuen dHPLC - Technik werden nun alle Polymorphismen mit einer Frequenz von über 1 % untersucht. Diese Daten sollen dann zu Genhaplotypen zusammengefasst und auf einem Biochip/Mikroarraysystem abgebildet werden. Eine individuelle genetische Typisierung des gesamten Hämostasesystems könnte damit als Grundlage für die Erstellung von individuellen Risikoprofilen für das Auftreten von z. B. venösen oder arteriellen Ereignissen sowie von Profilen zur Verträglichkeit/ Dosierung von hämostaserelevanten Therapien/Substanzen dienen.

Kontakt:

Priv.-Doz. Dr. med. Johannes Oldenburg

Institut für
Transfusionsmedizin und
Immunhämatologie
Frankfurt

DRK-Blutspendedienst
Baden Württemberg -
Hessen gGmbH
Sandhofstraße 1
60528 Frankfurt am Main

Telefon
069 - 6782 - 177

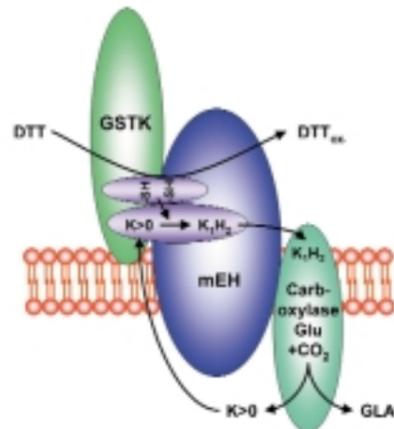
Fax
069 - 6782 - 204

E-Mail
joldenburg@bsdhessen.de

Identifizierung eines neuen Proteins aus dem Vitamin-K-Zyklus

Ziel des Projektes:

Durch die Identifikation des Cumarin-Proteintargets im VKOR-Komplex sollen das Wirkungs-/Nebenwirkungsprofil dieser Substanzgruppe optimiert und darüber hinaus neue Substanzen, die am VKOR-Komplex angreifen, entwickelt werden.



Vermutete Struktur des Vitamin-K-Epoxidase-Reduktase-Komplexes
GSTK = Glutathiontransferase, mEH = Mikrosomale Epoxidhydrolase

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Cumarine sind bis heute die einzig verfügbare Medikamentengruppe für die orale Antikoagulationstherapie. Sie entfalten ihre Wirkung durch eine Hemmung des Vitamin-K-Zyklus, der Vitamin K₂ als Kofaktor für die Carboxylierung einiger Gerinnungsfaktoren bereit stellt. Die Charakterisierung der Proteinkomponenten des Vitamin-K-Zyklus gestaltet sich sehr schwierig, da es sich um einen transmembranen Multiprotein-Komplex handelt, dessen Funktion bei Aufreinigungsversuchen verloren geht.

Bis heute wird deshalb intensiv an der Identifizierung des entsprechenden Cumarin-Protein-Targets im VKOR-Komplex geforscht. Allein in Deutschland werden jährlich etwa 100.000 Patienten neu mit Cumarinen eingestellt und behandelt. Meist handelt es sich um eine Langzeitantikoagulation, die mehrere Monate bis Jahre dauert. Die Rate von Blutungskomplikationen ist mit 7 % pro Behandlungsjahr (tödliche Blutungen 0,25 % pro Behandlungsjahr) sehr hoch und führt jedes Jahr zu mehreren 100 Todesfällen.

Ausgangspunkt der Forschungsarbeiten war die Entdeckung und klinische Charakterisierung zweier Familien mit der sehr seltenen erblichen Verminderung aller Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren, bei denen erhöhte Vitamin-K-Epoxid-Spiegel nachgewiesen und damit der Gendefekt laborchemisch einem Protein aus dem Vitamin-K-Zyklus zugeordnet werden konnte.

Mit Hilfe einer genetischen Kopplungsanalyse konnten wir auf Chromosom 16 einen Bereich als wahrscheinliche Lokalisation für das gesuchte Gen identifizieren. Dieser Bereich wurde anschließend mittels überlappender YAC (Yeast artificial chromosome)-Contigs physikalisch kartiert, was die Voraussetzung für eine erfolgreiche Suche nach dem Kandidatengen ist.

Die wichtigsten Ergebnisse

Mittels Homozygotie-Mapping konnte das Gen, welches für das Targetprotein der Substanzklasse der Cumarine codiert, auf den kurzen Arm von Chromosom 16 kartiert werden.

Allgemeinverständlicher Überblick

Im Rahmen der Behandlung und Vorsorge verschiedener Erkrankungen des Blutgerinnungssystems wie beispielsweise Thrombose, Herzinfarkt oder Schlaganfall ist die Hemmung der Blutgerinnung therapeutisch erforderlich. Die einzige oral einsetzbare Substanzgruppe sind hierbei die Cumarine, Handelsname z. B. Marcumar. Allerdings haben diese Substanzen ein sehr enges therapeutisches Fenster zwischen Überdosierung und Blutung auf der einen sowie Unterdosierung und Thrombose auf der anderen Seite. Das Risiko für Blutungskomplikationen ist mit 7 % pro Behandlungsjahr sehr hoch. Mit molekularbiologischen Methoden soll versucht werden, die genaue Wirkweise von Cumarinen zu erforschen und damit deren Wirkungs-/Nebenwirkungsprofil gezielt zu verbessern. Ein entscheidender Schritt in diese Richtung wäre die Identifizierung des bislang unbekanntes Eiweißes, an welchem die Cumarine ihre Wirkung entfalten.

Summary:

Identification of a new protein of the vitamin K cycle

Coumarins represent the only drug for oral anticoagulant therapy in the treatment and prevention of thrombotic disorders. However, the therapeutic window of coumarins is very small and bleeding complications occur at an annual frequency of 7 %. Coumarins are acting as vitamin K antagonists by blocking the vitamin K recycling pathway, which is needed for the posttranslational modification of the vitamin K dependent coagulation factors. We recently have identified a family with the rare phenotype of hereditary deficiency of all vitamin K dependent coagulation factors. Biochemical characterization of the patients revealed a defect in a protein of the vitamin K cycle, which probably represents the target protein for the coumarins. Genome wide linkage analysis suggested that the candidate gene is located within a small centromeric region of chromosome 16. At present potential candidate genes are sequenced for mutations in the index patients. Identification of the gene and the corresponding target protein for the coumarins would lead to a better understanding of the vitamin K cycle and an improved drug design for coumarins.

Projektkennzahlen

Förderung:	DFG Industriemittel
Laufzeit:	01/2000 – 12/2003
Projektleitung:	Priv.-Doz. Dr. Johannes Oldenburg
Mitarbeiter:	Andreas Fregin (Dipl.-Biol.) Simone Rost (Dipl.-Biol.)
Kooperationen:	Prof. Dr. C. Müller-Reible (Institut für Humangenetik, Universität Würzburg) PD Dr. T. Strom (GSF, München)

Kontakt:

Priv.-Doz. Dr. med. Johannes Oldenburg

Institut für
Transfusionsmedizin und
Immunhämatologie
Frankfurt

DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH
Sandhofstraße 1
60528 Frankfurt am Main

Telefon
069 – 6782 - 177

Fax
069 – 6782 - 204

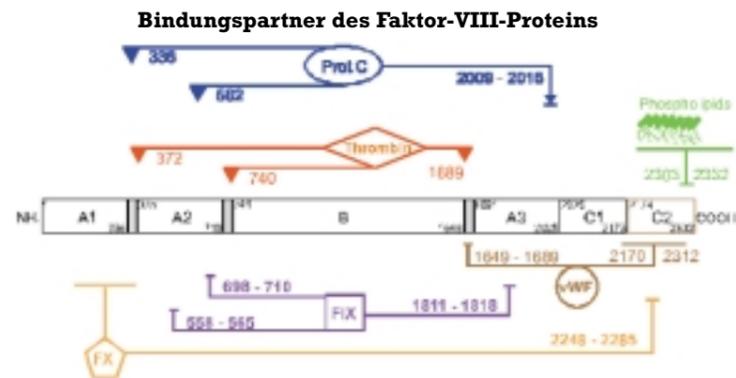
E-Mail
joldenburg@bsdhessen.de

Standort: Frankfurt
Projektleitung:
Priv.-Doz. Dr. med.
Johannes Oldenburg

Klonierung und Expression von Proteinen der Blutgerinnung als Modell für die Entwicklung eines Mikrowaagen-Array/Massenspektrometrie (MAMS) für die funktionelle Proteomanalyse

Ziel des Projektes:

Das Ziel dieses Projektes ist die Bereitstellung von Proteinen der Blutgerinnung und des Vitamin-K-Zyklus als experimentelle Modelle für die Entwicklung eines Mikrowaagen-Array/Massenspektrometrie (MAMS) für die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen.



Die wichtigsten Ergebnisse

Bisher wurden Vektorkonstrukte für die Proteinexpression der Gerinnungsfaktoren II, VII, X, Antithrombin sowie verschiedene Domänen des FVIII- und des FV-Proteins hergestellt.

Allgemeinverständlicher Überblick

Die Blutgerinnung ist ein hochkomplexes Netzwerk, in dem zahlreiche Proteine miteinander in Wechselwirkung treten, um einerseits die Fließfähigkeit des Blutes zu gewährleisten und andererseits im Falle einer Verletzung sofort kaskadenartig eine Blutstillung zu induzieren. Viele der Proteine werden aus Plasma oder gentechnisch hergestellt und zur Therapie bei z. B. Bluterpatienten eingesetzt. Des Weiteren greifen viele therapeutische Substanzen in die Blutgerinnung ein, z. B., um vor Thrombosen, Herzinfarkten oder Schlaganfällen zu schützen. Im Rahmen des hier vorgestellten Projektes soll mit der Blutgerinnung als Testmodell ein neues Werkzeug für die Erforschung der Wechselwirkungen von Eiweißmolekülen entwickelt werden.

Die damit gewonnenen Erkenntnisse dienen einerseits dem besseren Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge der Blutgerinnung, andererseits können auf dieser Grundlage neue Substanzen zum therapeutischen Einsatz entwickelt werden.

Summary:

Cloning and expression of proteins blood coagulation as a model for the development of a micro-array/mass spectrometry (MAMS) for functional proteom analysis

MAMS represents a new system for the quantitative and qualitative two step analysis of protein-protein interactions. In the first step aptamers (specific binding nucleic acids) will be placed on a micro sensor. In the second step the protein complexes that bound to the aptamer will be characterized by mass spectrometry. Proteins of blood coagulation represent an ideal model for the evaluation of MAMS, because they form a complex network of known as well as still unknown protein-protein-interactions, that can be analysed by MAMS. For this purpose vector constructs for the expression of various proteins will be established. Expressed protein will be purified and subjected to high throughput aptamer selection which then will become part of the micro sensor of the MAMS system.

Projektkennzahlen

Förderung:	BMBF/DLR
Laufzeit:	10/2001 bis 09/2004
Projektleitung:	Priv.-Doz. Dr. Johannes Oldenburg
Mitarbeiter:	Dr. Osman El-Maarri (Post Doc) Judith Schwalbach (MTA)
Kooperationen:	Dr. D. Hoffmann (Projektkoordinator, Center of Advanced European Studies and Research [CAESAR], Bonn) Dr. R. Kaiser (Institut für Virologie, Universitätsklinikum Köln) Prof. R. Zimmer (Institut für Informatik, LMU München) Dr. F. Schäfer (Qiagen GmbH, Hilden) Dr. M. Blind (NascaCell GmbH, München) Dr. R. Schwaab (Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Bonn)

Standort: Frankfurt

Projektleitung:
Priv.-Doz. Dr. med.
Johannes Oldenburg

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Die Entwicklung eines Mikrowaagen-Array/Massenspektrometrie (MAMS, Projektkoordinator CAESAR, Bonn) ist eines der Projekte im BMBF-Förderprogramm der Funktionellen Proteomforschung. MAMS stellt ein zweistufiges Analyseverfahren dar, das für einen kleinen, frei wählbaren Ausschnitt des Proteoms Identitäten und Quantitäten von Proteinen liefern soll. Im ersten Schritt binden Proteine an Aptamere (spezifisch bindende Nucleinsäuren), welche auf einer Mikrowaage (Massensensor) aufgebracht sind. Im zweiten Schritt werden die gebundenen Proteine, die ihrerseits in unbekanntem Komplex mit weiteren Proteinen vorliegen können, massenspektroskopisch identifiziert.

Die Blutgerinnung stellt für die Entwicklung von MAMS ein ideales Modell dar. Viele der Protein-Interaktionen sind bereits bekannt und somit als Kontrollen nutzbar. Der wohl größere Teil muss noch erforscht werden.

Zunächst werden für mehrere Proteine der Blutgerinnung Expressionskonstrukte hergestellt. Diese Proteine bzw. Teildomänen davon werden im Hochdurchsatz exprimiert und gereinigt (Qiagen). Die gereinigten Proteine/Domänen werden ebenfalls im Hochdurchsatz für die Selektion von Aptameren verwendet, die diese Proteine spezifisch binden (NascaCell). Die Aptamere ihrerseits werden auf einem Mikrowaagen-Array immobilisiert. So werden Proteine in biologischen Proben quantifiziert und identifiziert (Caesar). Eine bioinformatische Arbeitsgruppe der LMU München bewertet dann die Proteinstrukturen hinsichtlich ihres Potenzials für die Aptamerselektion und unterstützt die Identifizierung neuer Protein-Protein-Interaktionen.

Kontakt:

Priv.-Doz. Dr. med. Johannes Oldenburg

Institut für
Transfusionsmedizin und
Immunhämatologie
Frankfurt

DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH
Sandhofstraße 1
60528 Frankfurt am Main

Telefon
069 – 6782 - 177

Fax
069 – 6782 - 204

E-Mail
joldenburg@bsdhessen.de

Genotyp-Phänotyp-Korrelation beim Hereditären Angioödem

Ziel des Projektes:

Projektziel ist die molekulargenetische Diagnostik von Patienten mit Verdacht auf C1-Inhibitor-Mangel, klinisch manifest als Hereditäres Angioödem (= HAE), als wichtige Methode zur differenzialdiagnostischen Abgrenzung zu den viel häufigeren Angioödemem anderer Genese.

Klinisches Bild einer ödematös aufgetriebenen Schleimhaut der oberen Atemwege mit akuter Erstickungsgefahr



Standort: Frankfurt
Projektleitung:
Priv.-Doz. Dr. med.
Johannes Oldenburg

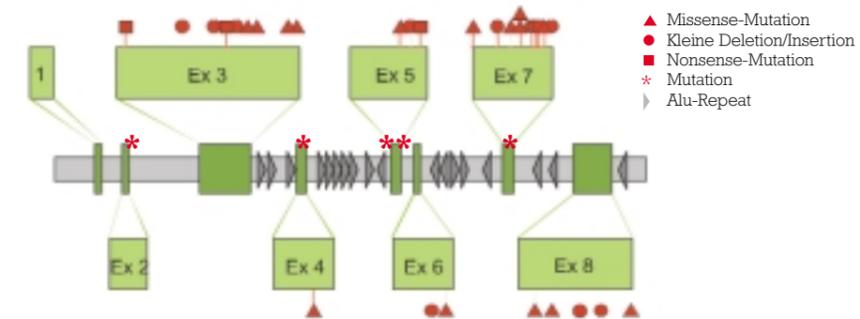
Hintergrund und Projektbeschreibung:

Für die erstmals 1882 beschriebenen, akut auftretenden Hautödeme wurde in der Folge ein autosomal dominanter Erbgang aufgezeigt und die Bezeichnung „Hereditäres Angioneurotisches Ödem“ eingeführt. Weitere Untersuchungen ergaben einen Mangel des Proteins C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH) als Ursache für die heute als Hereditäres Angioödem (HAE) bezeichnete Erkrankung. Das hauptsächlich in den Hepatozyten gebildete C1-INH ist ein wichtiger Inhibitor verschiedener Serinproteasen und reguliert durch eine 1:1 Komplexbildung mit diesen Proteasen die Aktivierungsphasen des Fibrinolyse-, Kinin- und Komplementsystems. Ein partieller oder kompletter Mangel an C1-INH führt durch die unkontrollierte Freisetzung vasoaktiver Substanzen zur Steigerung der Gefäßpermeabilität und damit zur Ausbildung lokaler Schwellungen der Haut, der Schleimhäute oder innerer Organe. Gefährlichste Komplikation und gleichzeitig häufigste Todesursache ist das Ersticken infolge eines im Bereich des Larynx lokalisierten Ödems, das bis zur vollständigen Obstruktion der Luftwege führen kann. Gerade deshalb muss das HAE unbedingt differenzialdiagnostisch von den viel häufigeren Angioödemem anderer Genese abgegrenzt werden, zumal die Therapie und Prophylaxe akuter Schübe des HAE ein völlig anderes Vorgehen erfordert. Während Histaminvermittelte Angioödeme wirkungsvoll mit Kortikosteroiden und Antihistaminika behandelt werden können, ist diese Medikation beim HAE wirkungslos und eine Substitution des C1-INH (z.B. Berinert® HS) indiziert.

Die wichtigsten Ergebnisse

Bisher wurde eine Mutation im C1-Inhibitor-Gen bei 50 von 66 Familien gefunden. Das Mutationsspektrum umfasste 16 Missense-Mutationen, 2 Stop-Mutationen, 11 kleine Deletionen, 5 Spleißstellen-Mutationen und 2 große Deletionen. Zwei Drittel der Mutationen waren in der Literatur nicht vorbeschrieben. In den 16 Familien ohne Mutationsbefund ist anzunehmen, dass entweder die Diagnose nicht ausreichend gesichert war oder die Verminderung des C1-Inhibitor-Mangels durch eine Mutation in einem anderen, bisher noch unbekanntem Gen, verursacht wurde.

Typ und Verteilung von Mutationen im C1-Inhibitor-Gen



Allgemeinverständlicher Überblick

Das sogenannte Hereditäre Angioödem (= HAE) mit lokalen Schwellungen der Haut, der Schleimhäute oder innerer Organe als Ausdruck eines bestimmten Proteinmangels tritt zum ersten Mal meist vor dem 20. Lebensjahr auf. Mit Hilfe einer molekulargenetischen Untersuchung des entsprechenden mutierten Gens (C1-INH) können Betroffene ausfindig gemacht werden, die bislang noch keine Krankheitssymptome gezeigt haben. Die Untersuchungsmethode ermöglicht darüber hinaus eine differenzialdiagnostische Abgrenzung zu den viel häufigeren Angioödemem anderen Ursprungs, welche eine andere Therapie erfordern.

Summary:

Genotype-phenotype correlation in patients with Hereditary Angioedema

Hereditary Angioedema (HAE) is a well-defined autosomal dominant disorder that results from an inherited deficiency of C1 (the activated first component of complement)-inhibitor function. HAE presents clinically with episodic local subcutaneous edema and submucosal edema involving the upper respiratory and gastrointestinal tracts. The treatment of choice is the substitution of C1 inhibitor protein (Berinert). Since the clinical manifestation of HAE is often occurring in adults and may result in fatal outcome it is important to identify patients at risk. Furthermore the correct diagnosis is essential for patients since the much more frequent allergic edema have a different pathogenesis and require a different type of treatment, that might be even life threatening when applied to HAE patients. Therefore we have set up a protocol for genetic testing for HAE aiming to identify the causative mutations in patients at HAE risk and helping to assign the correct differential diagnosis of oedema. So far we have identified 50 mutations in 66 families with clinical manifestation of HAE. The data will allow us to study the influence of the mutation type to the clinical course of HAE.

Projektkennzahlen

Förderung:	Eigenmittel
Laufzeit:	seit 01/2001
Projektleitung:	Priv.-Doz. Dr. Johannes Oldenburg
Mitarbeiter:	Tanja Förster (Dipl.-Biol.)
Kooperationen:	Prof. Dr. C. Müller-Reible, Dr. J. Schröder (Institut für Humangenetik, Universität Würzburg) PD Dr. W. Kreuz, Dr. I. Martinez-Saguer, Dr. E. Aygören (Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Universitätsklinikum Frankfurt)

Kontakt:

Priv.-Doz. Dr. med. Johannes Oldenburg

Institut für
Transfusionsmedizin und
Immunhämatologie
Frankfurt

DRK-Blutspendedienst
Baden Württemberg –
Hessen gGmbH
Sandhofstraße 1
60528 Frankfurt am Main

Telefon
069 – 6782 - 177

Fax
069 – 6782 - 204

E-Mail
joldenburg@bsdhessen.de

Molekulare Immunogenetik von Thrombozyten

Ziel des Projektes:

Gene, die durch die Bindung von Thrombozyten an neutrophile Granulozyten reguliert werden, sollen identifiziert werden. Der besondere Fokus liegt dabei auf der P-Selektin-vermittelten Genregulation.

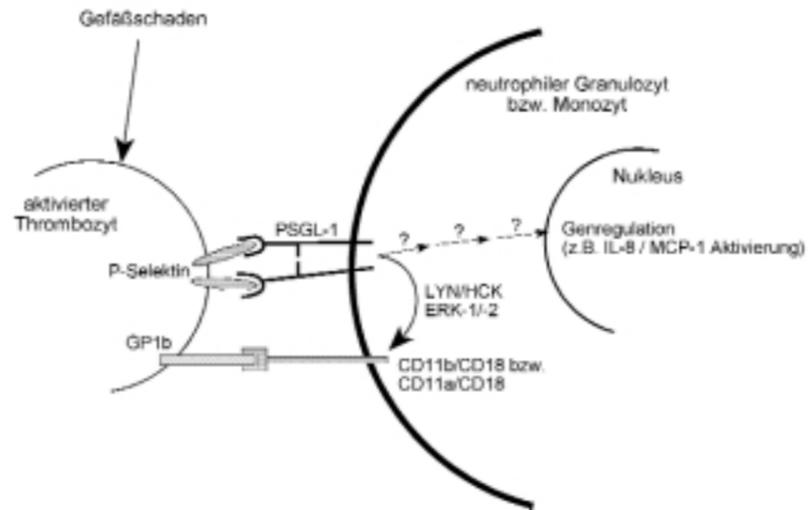


Abb. 1 Modell der Interaktion von Thrombozyten und Granulozyten bzw. Monozyten

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Die Thrombozyten übernehmen bei inflammatorischen Prozessen eine wichtige Rolle, indem sie nicht nur wichtige Wachstumsfaktoren für die Regeneration beschädigter Gefäße liefern, sondern darüber hinaus als „Fänger“ zur Rekrutierung der für die Abwehr wichtigen neutrophilen Granulozyten und Monozyten fungieren. Die Anheftung der Thrombozyten führt zu einem „outside-in-signalling“ in Granulozyten und Monozyten, das eine Änderung der Genexpression zur Folge hat. Eine Induktion der Cytokine IL-8 und MCP-1 konnte bereits beobachtet werden (Abb. 1). Weitere Auswirkungen der Signaltransduktion sind nicht bekannt.

In diesem Forschungsprojekt sollen Gene identifiziert werden, die infolge der Bindung aktivierter Thrombozyten an neutrophile Granulozyten reguliert werden. Es soll vornehmlich die P-Selektin-vermittelte Genregulation untersucht werden, da diese die initialen Vorgänge der Wechselwirkung zwischen Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten repräsentiert. Es wurde ein in vitro Testsystem ausgearbeitet, das die akute Inflammation simuliert. Nach der Isolierung der Thrombozyten und Neutrophilen aus frischem Citratblut erfolgt die Koinkubation definierter Zellzahlen unter Anwendung von Scherkräften zur Simulation von Blutfluß. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten (5 Minuten bis zu 24 Stunden) wird sowohl die RNA- als auch die Protein-Extraktion durchgeführt. Anschließende Untersuchungen beziehen sich auf die Analyse von Genexpression mittels RT-PCR, Microarrays und 2D-Proteingelen. Erste Ergebnisse bestätigen die bereits bekannte IL-8 Aktivierung und deuten auf eine Vielzahl bislang unbekannter Kandidatengene, wie z. B. Glutamatrezeptor, Cholin kinase, Phospholipase, etc.

Die wichtigsten Ergebnisse

Identifizierung von neuen Kandidatengenen, die durch die P-Selektin-vermittelte Bindung von Thrombozyten an neutrophile Granulozyten aktiviert werden.

Durch Simulation der akuten Inflammation in einem entwickelten in vitro Testsystem konnte in neutrophilen Granulozyten die Aktivierung verschiedener Kandidatengene durch die Bindung von Thrombozyten nachgewiesen werden. Neben der bereits bekannten Aktivierung von IL-8 wurde u. a. auch die Aktivierung der Gene eines Glutamatrezeptors, einer Cholin kinase und einer Phospholipase gezeigt.

Allgemeinverständlicher Überblick

Neben ihrer Funktion bei der Blutgerinnung spielen die so genannten Thrombozyten (Blutplättchen) auch bei Entzündungsvorgängen eine wichtige immunologische Rolle. Sie dienen unter anderem quasi als „Fänger“ der Leukozyten, indem sie diese über spezielle Oberflächenstrukturen an sich binden und so am Entzündungsherd fixieren. In den Leukozyten führt die Bindung der Thrombozyten über eine Signalkaskade gleichzeitig zur Aktivierung verschiedener Gene. Die detaillierte Aufklärung und Charakterisierung dieser Gene und ihrer Aktivierung trägt wesentlich zum Verständnis der Prozesse bei der Entstehung von Gefäßerkrankungen wie der Arteriosklerose bei und ist Gegenstand dieses Forschungsprojektes.

Summary:

Molecular characterization of the platelet-neutrophil interaction

Platelets provide a number of important growth factors and chemotactic proteins and are responsible for the immobilization of other cells such as neutrophilic granulocytes and monocytes at sites of inflammation or vascular damage. Adhesion to the platelets leads to changes in gene expression in the effected cells. Induction of inflammatory genes such as IL-8 and MCP-1 can be observed in both granulocytes and monocytes. Aim of the study is to identify genes expressed in neutrophilic granulocytes using an acute inflammation model and microarray analysis of ~10.000 genes. Preliminary results indicate the activation of a glutamate receptor, cholin kinase, phospholipase and other genes. Further studies are needed to confirm the findings and to prove the inflammatory function of the genes.

Projektkennzahlen

Förderung:	Universität Mannheim Eigenmittel
Laufzeit:	06/2002 – 05/2003
Projektleitung:	Dr. Peter Bugert
Mitarbeiter:	Marion Vosberg (Doktorandin) Andrea Lese (Doktorandin) Sonja Mattler (MTA) Gabriele Rink (MTA)
Kooperationen:	Dr. R. Lösel (Universitätsklinikum Mannheim) PD Dr. B. Winkelmann (Universität Heidelberg) Prof. W. Ouwehand (Universität Cambridge)

Weiterführende Informationen:

Homepage Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie, Mannheim:
www.ma.uni-heidelberg.de/inst/iti

Kontakt:

Dr. rer. nat. Peter Bugert

Institut für
Transfusionsmedizin und
Immunologie Mannheim

DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH
Friedrich-Ebert-Straße 107
68167 Mannheim

Telefon
0621 – 3706 - 8122

Fax
0621 – 3706 - 851

E-Mail
p.bugert@blutspende.de

Standort: Mannheim

Projektleitung:
Dr. rer. nat.
Peter Bugert

Sequenzpolymorphismen in P-Selektin und PSGL-1

Ziel des Projektes:

Die Sequenzpolymorphismen in P-Selektin und PSGL1 sollen aufgeklärt und charakterisiert und auf ihre klinische Relevanz untersucht werden.

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Inflammatorische Prozesse werden sowohl bei der Reparatur vaskulärer Schäden im Rahmen der Wundheilung als auch bei verschiedenen Pathomechanismen wie Atherosklerose, Myokardinfarkt, Schlaganfall u.a. beobachtet. Neben Endothelzellen und neutrophilen Granulozyten kommt vor allem den Thrombozyten hierbei eine wichtige Rolle zu. Sie liefern nicht nur wichtige Wachstumsfaktoren für die Regeneration beschädigter Gefäße, sondern dienen darüber hinaus als „Fänger“ zur Rekrutierung der für die Abwehr wichtigen neutrophilen Granulozyten und Monozyten.

Ein bekannter Mechanismus von Zelladhäsion ist die Transmigration von Leukozyten durch die Endothelschicht im Verlauf der Inflammation. Initiales Ereignis ist die Anheftung der Leukozyten über den Membran-verankerten Liganden PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) an P- oder E-Selektin auf den Endothelzellen. Da P-Selektin auch ein spezifisches Membranmolekül aktivierter Thrombozyten ist, liegt die Vermutung nahe, dass eine Bindung von Leukozyten auch an aktivierte Thrombozyten stattfindet. Solche Plättchen/Neutrophilen- bzw. Plättchen/Monozyten-Aggregate werden bei inflammatorischen und thrombotischen Zuständen beobachtet. Tatsächlich erfolgt die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und Monozyten, insbesondere bei beschädigten Gefäßen, aufgrund fehlender Endothelzellen nahezu ausschließlich an die im Thrombus vorliegenden aktivierten Plättchen. Der initiale, lose Kontakt wird auch hier über P-Selektin/PSGL-1 Bindung vermittelt. Eine stabile Adhäsion kommt anschließend über CD11a/ bzw. CD11b/CD18 und GPIb bzw. ICAM-2 zustande. Die Leukozytenadhäsion an inflammatorisches Endothel, an aktivierte Plättchen im Thrombus oder bei der Bildung von Plättchen-Aggregaten zeigt daher in Bezug auf eine P-Selektin/PSGL-1 Beteiligung deutliche Parallelen.

Bislang sind nur wenige Daten über Sequenzpolymorphismen in P-Selektin und PSGL-1 publiziert. Für den „single nucleotide polymorphism“ (SNP) Thr715Pro in P-Selektin wurde ein Zusammenhang mit Myokardinfarkt vermutet und in einer größeren Studie mit 696 Infarktpatienten (ECTIM Studie) bestätigt. In einer anderen Studie mit einem heterogeneren Kollektiv von KHK-Patienten konnte diese Assoziation jedoch nicht bestätigt werden. Diese Studie wies aber auf einen Zusammenhang zwischen Promotor-Polymorphismen und dem freien P-Selektin Gehalt im Serum hin.

Zur effektiven Analyse der P-Selektin-Exone wurde eine neue Sequenzierungsstrategie entwickelt, die eine gleichzeitige Sequenzierung von 2 Exonen in einer Reaktion ermöglicht. Die Untersuchung der Gensequenzen von normalen Individuen und KHK-Patienten hat bislang die bereits bekannten SNPs bestätigt. Darüber konnte ein neuer SNP im Exon 5 identifiziert werden. In P-Selektin sind bisher also insgesamt 4 SNPs beschrieben, die möglicherweise in einem funktionellen Zusammenhang stehen. Zur schnellen Typisierung der Polymorphismen wurden allelspezifische PCR-Systeme ausgearbeitet. Die Haplotyp- bzw. Genotypfrequenzen werden derzeit in ca. 280 KHK-Patienten und 400 Blutspenderproben bestimmt und verglichen. Hierdurch sollen Hinweise auf die Funktionalität der Polymorphismen festgestellt werden.

PSGL-1 enthält neben zwei SNPs (M62I und S273F) eine polymorphe VNTR-Region (VNTR = variable number of tandem repeats) mit 30 bp (= 10 Aminosäuren) Sequenzwiederholungseinheiten (Repeats). Das häufigste Allel beinhaltet 16 Repeats, gefolgt vom 15-Repeat-Allel und dem seltenen 14-Repeat-Allel. Unmittelbar vor der VNTR-Region befindet sich die P-Selektin Bindedomäne. Die Bindung von PSGL-1 an P-Selektin wird von der Anzahl der Repeats der VNTR-Region beeinflusst. Je weniger Repeats, desto kürzer ist der Abstand der P-Selektin Bindedomäne zur Zellmembran und desto schwächer ist die Bindung der Neutrophilen an Thrombozyten. Im Zusammenhang mit den bisher beschriebenen Allelen wurde auch eine Assoziation der Repeatzahl mit cerebraler Ischämie beschrieben. Bei der Untersuchung eines KHK-Kollektivs mit 281 Patienten konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe (397 Blutspender) ein vermehrtes Vorkommen des 15-Repeat-Allels ($p=0.01$) festgestellt werden. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde eine zweite Studie mit 2578 KHK-Patienten (LURIC-Kollektiv) und einer Kontrollgruppe mit 1084 gesunden Blutspendern durchgeführt. Die Ergebnisse der ersten Studie konnten hier jedoch nicht bestätigt werden.

Die wichtigsten Ergebnisse

Identifizierung neuer „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs) im P-Selektin-Gen und PSGL-1-Gen. In beiden Genen konnten neue Polymorphismen identifiziert werden, deren funktionelle Relevanz und potenzielle Assoziation mit koronaren Herzerkrankungen derzeit untersucht wird.

Allgemeinverständlicher Überblick

Verschiedene Erkrankungen können mit natürlich vorkommenden Varianten bestimmter Gene, sogenannten Polymorphismen, assoziiert sein. Dieses Forschungsprojekt untersucht solche Polymorphismen bei den Genen, deren Produkte für die Bindung von Leukozyten an die Gefäßinnenwand (Endothel) oder an Thrombozyten (Blutplättchen) verantwortlich sind. Diese Bindung findet u.a. bei entzündlichen Prozessen der Blutgefäße statt und gewährleistet, dass sich die Leukozyten als Bestandteile des zellulären Abwehrsystems am Ort der Entzündung sammeln und dort ihre Abwehraufgabe aufnehmen können (siehe auch Projekt „Aufklärung des Allelpolymorphismus im Rhesus-Blutgruppensystem“). Unterschiedliche Genvarianten haben dabei unterschiedliche Bindungsstärken zur Folge. Ist die Bindung schwächer, ist auch die Anheftung von Leukozyten und damit die Abwehr am Ort der Entzündung verringert. Ist die Bindung von Thrombozyten verstärkt, könnte dies die Zirkulationseigenschaften des Blutes beeinträchtigen. Mögliche Folgen sind Herzinfarkt, Schlaganfall oder akuter Hörsturz. Außerdem wird vermutet, dass Patienten mit solchen Genvarianten ein höheres Risiko tragen, an chronischen Erkrankungen des Gefäßsystems wie der Atherosklerose zu erkranken. Diese Zusammenhänge zu untersuchen, ist ein weiteres Ziel dieses Projektes.

Summary:

Sequence polymorphisms of P-selectin and PSGL-1

Cell-cell interaction between platelets, leukocytes and endothelium is an early step in inflammatory processes and is mediated by membran-associated proteins as P-selectin, PSGL-1 and others. Those inflammatory genes are candidates for predisposition to pro-thrombotic syndroms as coronary heart disease (CHD). Single nucleotide polymorphisms (SNPs) or 'variable number of tandem repeats' (VNTR) in these genes may alter the function of the encoded proteins. Aim of the project is to identify sequence polymorphisms in P-selectin, PSGL-1 and other genes by exon re-sequencing. After PCR-techniques have been established for rapid genotyping of the polymorphisms, case/control studies are performed to investigate differences in allele and genotype frequencies between study groups (CHD patients and blood donor controls). We could confirm known polymorphisms in P-selectin and PSGL-1 and identified novel SNPs in both genes. No differences concerning frequencies of the alleles in CHD patients and controls could be observed so far.

Projektkennzahlen

Förderung:	Universität Heidelberg Eigenmittel
Laufzeit:	01/2001 – 12/2002
Projektleitung:	Dr. Peter Bugert
Mitarbeiter:	Marion Vosberg (Doktorandin) Sonja Mattler (MTA) Gabriele Rink (MTA)
Kooperationen:	Dr. M. Entelmann (Medizinische Universität Lübeck) PD Dr. B. Winkelmann (Universität Heidelberg) Prof. W. Ouwehand (Universität Cambridge)

Weiterführende Informationen:

Homepage Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie, Mannheim:
www.ma.uni-heidelberg.de/inst/iti

Kontakt:

Dr. rer. nat. Peter Bugert

**Institut für
Transfusionsmedizin und
Immunologie Mannheim**

**DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH**
Friedrich-Ebert-Straße 107
68167 Mannheim

Telefon
0621 – 3706 - 8122

Fax
0621 – 3706 - 851

E-Mail
p.bugert@blutspende.de

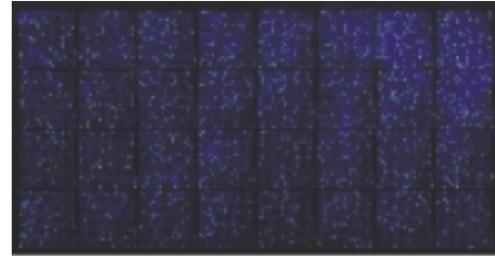
Standort: Mannheim

**Projektleitung:
Dr. rer. nat.
Peter Bugert**

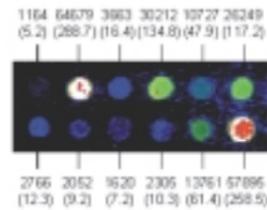
Gentranskripte und aktive Proteinbiosynthese in Thrombozyten

Ziel des Projektes:

Forschungsziel des Projektes ist die Untersuchung der Funktionalität von Gentranskripten in Thrombozyten durch Nachweis einer aktiven de novo Proteinsynthese.



Microarray Analyse von 9.850 Genen in Thrombozyten



Wertebereiche

negativ: 1 – 3.000
Grauzone: 3.000 – 5.000
positiv: >5.000

Abb. 1 **Microarray**
Analyse von 9.850 Genen in Thrombozyten

Hintergrund und Projektbeschreibung:

In Thrombozyten konnten bereits verschiedenste Gentranskripte z.B. durch RT-PCR nachgewiesen werden. Über die Komplexität und Funktionalität dieser Transkripte ist jedoch nur wenig bekannt. Moderne Untersuchungsmethoden wie z. B. die cDNA-Microarrayanalyse stellen ideale Werkzeuge zur Beantwortung der Frage nach der Komplexität der Gentranskripte in Thrombozyten dar. Mittels verschiedener kommerzieller Array-systeme wurden bislang über 10.000 Gene untersucht, von denen etwa 1.500 als positiv zu bewerten waren (Abb. 1). Derzeit werden Bestätigungsexperimente (weitere Array-Hybridisierungen und RT-PCR) durchgeführt.

Der Nachweis der Funktionalität von Gentranskripten in Thrombozyten ist deutlich erschwert, da dies letztlich nur durch den Nachweis aktiver de novo Proteinsynthese erfolgen kann. Die Schwierigkeiten bestehen hier u. a. in der vollständigen Eliminierung anderer zellulärer Bestandteile (Leukozyten) aus den Thrombozytenpräparaten. Experimente, bei denen radioaktive Aminosäuren verwendet werden („pulse chase“), dienen zum Nachweis aktiver Proteinsynthese. Bislang konnte jedoch in Thrombozyten keine Aktivität gefunden werden, was deren Befähigung zur Synthese von Proteinen eher ausschließt. In einem anderen experimentellen Ansatz lieferten kommerzielle Microarraysysteme mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern bereits wertvolle Daten und ermöglichten bisher den quantitativen Nachweis von 380 Proteinen gleichzeitig in einem Versuchsansatz.

Die wichtigsten Ergebnisse

Bisher konnten durch Microarraymethoden die Transkripte von etwa 1500 Genen in Thrombozyten identifiziert werden.

Der Nachweis und die Identifizierung von Gentranskripten und Proteinen trägt wesentlich zur Aufklärung der Komplexität und Funktionalität eines möglichen Translationssystems in Thrombozyten bei und stellt einen wichtigen Schritt zum Verständnis der vielfältigen Thrombozytenfunktionen dar.

Allgemeinverständlicher Überblick

Thrombozyten (Blutplättchen) erfüllen wichtige und komplexe Funktionen nicht nur bei der Blutgerinnung, sondern auch in Entzündungsprozessen, während der Wundheilung oder bei chronischen Erkrankungen des Blutgefäßsystems. So liefern sie wichtige Wachstumsfaktoren für die Regeneration beschädigten Gewebes oder produzieren Botenstoffe, die von Zellen der Immunabwehr erkannt werden und diese beispielsweise zum Ort einer Entzündung lenken können. Zum besseren Verständnis der komplexen Aufgaben der Thrombozyten wird in diesem Forschungsprojekt untersucht, welche Gentranskripte (aktive „Arbeitskopien“ von Genen) in den Plättchen vorhanden sind und ob diese Gentranskripte in funktionelle Eiweiße übersetzt werden. Da Thrombozyten nicht über einen eigenen Zellkern und damit nicht über DNA verfügen, müssen ihnen alle Informationen, die zur Erfüllung ihrer komplexen Funktionen notwendig sind, in Form von Gentranskripten und Proteinen bei ihrer Entstehung im Knochenmark mitgegeben werden.

Summary:

Gene transcripts and active protein biosynthesis in platelets

Platelets are anucleated cell fragments derived from megakaryocytes in the bone marrow. Despite absence of a nuclear genome the presence of mRNA is well known and platelet mitochondria and ribosomes indicate active protein biosynthesis in platelets. But, it remains unclear whether protein synthesis truly resides in platelets or in contaminating leukocytes. Aim of the project is the complete characterization of the platelet transcriptome and to investigate the biological function of the gene transcripts in terms of de novo protein synthesis. After complete depletion of leukocytes from platelet concentrates we analysed ~10.000 genes using the microarray hybridization technique and found mRNA for ~1.500 genes. However, pulse chase experiments using radioactively labeled amino acids were not able to prove de novo protein synthesis in platelets. Thus, it remains unclear whether mRNA is important for platelet function. Data about the platelet transcriptome will increase knowledge on gene functions in late megakaryopoiesis.

Projektkennzahlen

Förderung:	Universität Heidelberg Eigenmittel
Laufzeit:	01/2001 – 12/2002
Projektleitung:	Dr. Peter Bugert
Mitarbeiter:	Dipl.-Ing. (FH) Ayse Günaydin Sonja Mattler (MTA) Gabriele Rink (MTA)
Kooperationen:	Dr. R. Lösel (Universitätsklinikum Mannheim) Prof. W. Ouwehand (Universität Cambridge)

Weiterführende Informationen:

Homepage Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie, Mannheim:
www.ma.uni-heidelberg.de/inst/iti

Kontakt:

Dr. rer. nat. Peter Bugert

**Institut für
Transfusionsmedizin und
Immunologie Mannheim**

**DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH**
Friedrich-Ebert-Straße 107
68167 Mannheim

Telefon
0621 – 3706 - 8122

Fax
0621 – 3706 - 851

E-Mail
p.bugert@blutspende.de

Einfluss von Thrombozyten und thrombozytären Wachstumsfaktoren auf Wundheilung und Geweberegeneration

Ziel des Projektes:

Innerhalb dieses Projektes sollen die Rolle von Thrombozyten als Initiatoren der Wundheilung aufgeklärt und Methoden zur Evaluation dieser Funktionen in vitro sowie zur Qualitätskontrolle klinisch anwendbarer Thrombozytenpräparationen etabliert werden. Das Ziel des Projektes besteht in der Verbesserung und Erweiterung der klinischen Anwendung thrombozytärer Produkte in der Wundheilung und der Geweberegeneration.



Standort: Mannheim

Projektleitung:
Dr. med.
A. Dugrillon

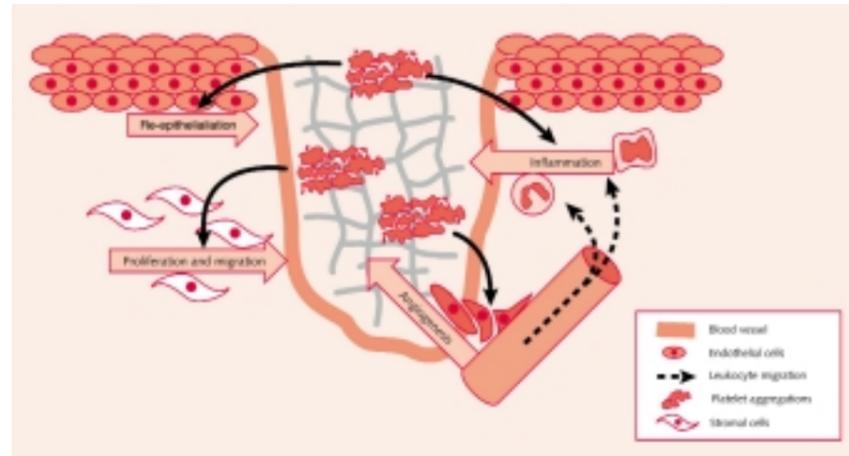


Abb. 1: Initiale Wirkungen thrombozytärer Faktoren auf umliegende Zellen und Gewebe in der Wundheilung

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Wunden gehen in der Regel mit Blutung und Bildung eines Blutgerinnsels einher, das zu einem primären Wundverschluss führt. Damit wird die Wunde geschützt, und das entstandene Fibrinnetz bildet eine provisorische Matrix, in die Zellen von umliegenden Geweben einwandern und neues Gewebe aufbauen. Durch die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen sind Thrombozyten an der Einleitung dieser Wundheilungsvorgänge beteiligt (Abb. 1). Aufgrund verschiedener Mechanismen wird auch eine nachhaltige Wirkung auf die Geweberegeneration vermutet. Aus diesen Gründen werden autologe Thrombozytenpräparate klinisch zur Beschleunigung der Geweberegeneration eingesetzt.

Zur Zeit werden Thrombozyten zur Wundheilung und Geweberegeneration in der Oralchirurgie zum Knochenaufbau von Implantatstellen, bei der Maculadegeneration in der Ophthalmologie und bei der Behandlung chronischer Wunden der Haut angewandt, viele weitere Einsatzgebiete sind möglich. Die regenerative Wirkung lokal applizierter Thrombozyten hängt offensichtlich von der Menge thrombozytärer Wachstumsfaktoren ab. Für die klinische Anwendung wurde daher ein optimiertes Verfahren zur Herstellung eines autologen Thrombozytenpräparates entwickelt, das den gesetzlichen Anforderungen (Arzneimittelgesetz, Transfusionsgesetz) und den GMP-Richtlinien entspricht.

Ogleich einzelne thrombozytäre Faktoren hinreichend untersucht sind, liegen kaum experimentelle Daten über das biologische Wirkungsspektrum hinsichtlich der Geweberegeneration intakter Thrombozyten vor. In humanen Osteoblasten bewirken sie eine deutliche Stimulation der Proliferation, der Migration und der Bildung knochenspezifischer Matrix. Eigene Untersuchungen bestätigen diese Ergebnisse und zeigen zudem, dass Thrombozyten weitere Funktionen in Gewebezellen wie Apoptose, zelluläre Abwehrmechanismen und die Zell-Immunogenität beeinflussen

Die wichtigsten Ergebnisse

Inzwischen konnte das Herstellungsverfahren für autologe Thrombozytenpräparate optimiert werden und entspricht damit sowohl den GMP-Richtlinien als auch den gesetzlichen Anforderungen wie Arzneimittel- und Transfusionsgesetz. Darüber hinaus konnte bestätigt werden, dass das biologische Wirkungsspektrum intakter Thrombozyten in humanen Osteoblasten von der Stimulation der Proliferation über die Migration bis hin zur Bildung knochenspezifischer Matrix reicht. Außerdem wurde gezeigt, dass noch weitere Gewebezellfunktionen wie Apoptose, zelluläre Abwehrmechanismen und die Zell-Immunogenität von Thrombozyten beeinflusst werden.

Allgemeinverständlicher Überblick

Thrombozyten (Blutplättchen) erfüllen wichtige und komplexe Funktionen während der Wundheilung. So enthalten sie wichtige Wachstumsfaktoren, die zur Regeneration des beschädigten Gewebes dienen. Die genauere Untersuchung dieser Funktionen ist Gegenstand dieses Forschungsprojektes. Ziel ist es, die verantwortlichen Faktoren zu identifizieren, zu charakterisieren und diese Erkenntnisse mittelfristig zur Verbesserung der örtlichen Wundbehandlung, aber auch für einen Gewebeaufbau nutzbar zu machen

Summary:

The role of platelets and platelet-derived growth factors in wound healing and tissue repair

This work focuses on the role of platelets in wound healing and tissue regeneration. Techniques for evaluation of these functions will be established as well as tests for quality control of clinically applicable platelet preparations. The aim of the project is to improve the application of platelet products for wound healing and tissue regeneration in various clinical settings.

Projektkennzahlen

Förderung:	Universität Heidelberg Eigenmittel
Laufzeit:	2 Jahre
Projektleitung:	Dr. Alex Dugrillon
Mitarbeiter:	Stephanie Lauber (Doktorandin) Günther Gerlich (MTA)

Weiterführende Informationen:

The molecular and cellular biology of wound repair. A.F. Clark (Editor), Plenum Press, New York 1996

www.ma.uni-heidelberg.de/inst/iti/plt-forum02.pdf

www.blood.remedica.com

www.emedicine.com/plastic/topic457.htm

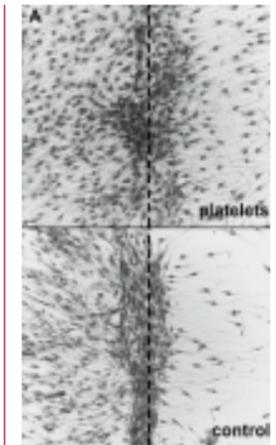


Abb. 2: In experimentellen Ansätzen werden Wirkungen von Blutplättchen, hier gezeigt an Osteoblasten, hinsichtlich ihrer biologischen Funktionen im Rahmen der Geweberegeneration untersucht. Auf den rechten Seiten der Abbildungen wurde der Zellrasse an der unterbrochenen Linie entlang entfernt. Nach einer Woche Stimulation mit isolierten Thrombozyten zeigt sich im oberen Bild ein stärkeres Einwachsen in dieses zuvor zellfreie Areal im Vergleich zu den unstimulierten Zellen in der unteren Abbildung. Das verstärkte Einwachsen der Zellen ist durch eine Wachstumsstimulation (Proliferation) und eine beschleunigte Wanderung der Zellen (Migration) verursacht.

Kontakt:

Dr. med. Alex Dugrillon

Institut für
Transfusionsmedizin und
Immunologie Mannheim

DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen gGmbH
Friedrich-Ebert-Straße 107
68167 Mannheim

Telefon
0621 – 3706 - 8215

Fax
0621 – 3706 - 876

E-Mail
a.dugrillon@blutspende.de

Thrombozyten-Diagnostik bei neonataler Immuntrombozytopenie

Ziel des Projektes:

Innerhalb dieses Projektes sollen Methoden zur pränatalen Genotypisierung fetaler HLA- und HPA-Antigene zur Verbesserung der Risikoabschätzung und Prävention der neonatalen Allo-Immuntrombozytopenie (NAIT) entwickelt sowie maternale Antikörper nachgewiesen und charakterisiert werden.



Standort: Mannheim

Projektleitung: Prof. Dr. med. Harald Klüter

Hintergrund und Projektbeschreibung:

Die neonatale Allo-Immuntrombozytopenie (NAIT) ist gekennzeichnet durch eine starke Verringerung der Thrombozytenzahl und Blutungsübel des Neugeborenen. Sie tritt etwa bei einer von 1000 Geburten auf und führt in etwa jedem 4. bis 5. Fall zu schwer wiegenden fetalen Blutungen. Ursächlich sind mütterliche (maternale) Antikörper gegen kindliche (fetale) Thrombozytenmerkmale, die zu einem beschleunigten Abbau der Blutplättchen führen. Die pränatale Genotypisierung von fetalen HLA- und HPA-Antigenen kann einen wesentlichen Beitrag zur Risikoabschätzung und Prävention der NAIT leisten.

Im Rahmen des Forschungsprojektes werden hierzu zwei Ansätze verfolgt: Die direkte fetale HLA-Genotypisierung aus Fruchtwasserproben ist mit PCR-Verfahren ohne Kultivierung der Amniozyten möglich und wird hinsichtlich ihrer Zuverlässigkeit und Störanfälligkeit untersucht. Es wird darüber hinaus geprüft, wie eine Kontamination des Fruchtwassers durch mütterliches Blut das Ergebnis nach PCR-SSP bzw. PCR-SSO-Typisierung beeinflusst.

Ferner ist bekannt, dass sowohl intakte kindliche Zellen als auch freie kindliche DNA im Blutkreislauf der Mutter zirkulieren und nachgewiesen werden können. Ob die freie DNA zu diagnostischen Zwecken genutzt werden kann, soll im Zusammenhang mit der Genotypisierung von thrombozytären Genpolymorphismen geprüft werden. Diese Polymorphismen spielen bei der Immunisierung der Mutter gegen Antigene der kindlichen Thrombozyten eine wesentliche Rolle und tragen somit zur Entstehung der NAIT bei. Die Möglichkeit der nichtinvasiven, pränatalen Typisierung der kindlichen Plättchenantigene wäre ein deutlicher Fortschritt in der Frühdiagnose der NAIT.

Innerhalb des Projektes konnten allelspezifische PCR-Systeme unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Primer zur Genotypisierung der HPA-1- und -5-Polymorphismen entwickelt und kindliche HPA-Merkmale im mütterlichen Serum erfolgreich bestimmt werden. Es wurde zudem festgestellt, dass der DNA-Gehalt im mütterlichen Serum individuell verschieden ist und auch der Anteil kindlicher DNA ebenfalls stark variiert. Dies könnte bedeuten, dass trotz optimierter Genotypisierungsmethoden die nichtinvasive, pränatale Diagnostik im Einzelfall nicht zum Ergebnis führt. Die Zuverlässigkeit der entwickelten PCR-Methoden soll im Rahmen einer Folgestudie untersucht werden.

Die wichtigsten Ergebnisse

Bislang konnten hoch-sensitive PCR-Systeme zur Genotypisierung von Polymorphismen der fetalen thrombozytären HPA-1- und HPA-5-Antigene für eine verbesserte Pränataldiagnostik der Allo-Immuntrombozytopenie aus Fruchtwasser sowie freier fetaler DNA aus dem mütterlichen Blutkreislauf entwickelt werden.

Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der Gehalt kindlicher DNA im mütterlichen Blut hochvariabel ist und daher die nicht invasive Genotypisierung trotz optimierter Methoden im Einzelfall nicht immer zu einem Ergebnis führen muss.

Allgemeinverständlicher Überblick

Entwickelt die Mutter während der Schwangerschaft aufgrund unverträglicher immunologischer Merkmale Antikörper gegen die Blutplättchen (Thrombozyten) des Kindes, führt dies zu einer drastischen Reduzierung der kindlichen Thrombozytenzahl, die unter Umständen zu schweren Blutungen und Schädigungen des Kindes führen kann. Diese Unverträglichkeiten können durch genetische Varianten, so genannte Polymorphismen, der Oberflächeneigenschaften der kindlichen Thrombozyten entstehen. Werden diese Varianten vom mütterlichen Immunsystem erkannt, kommt es zur Bildung mütterlicher Antikörper, die die kindlichen Blutplättchen zerstören.

Das resultierende Erkrankungsbild wird als „Neonatale Allo-Immuntrombozytopenie“, kurz NAIT, bezeichnet. Die Entwicklung zuverlässiger Methoden zur Identifizierung solcher Varianten im Rahmen der Pränataldiagnostik stellt einen entscheidenden Fortschritt in der Frühdiagnostik der NAIT dar und ist Gegenstand dieses Forschungsprojektes.

Summary:

Platelet diagnostics in alloimmune thrombocytopenia

Neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT) is caused by alloimmunization of the homozygote mother against the heterozygote fetus' platelet antigens, most often HPA-1a or -5b. The currently preferred method of prenatal identification of a fetus at risk is cord blood testing. This method is invasive and carries inherent risks, especially in thrombocytopenic fetuses. Other prenatal diagnostics such as amniocentesis and chorionic villus sampling also pose risks to the unborn. Postnatal identification of affected fetuses is often too late to prevent the most dangerous complication, intracranial hemorrhage. Therefore we attempt to establish a non-invasive prenatal testing method of genotyping HPA-1, -2, -3 and -5 using fetal DNA found in maternal plasma or serum. This technique offers new opportunities for a quick and save characterization of the HPA-systems of the fetus without the need for umbilical chord venipuncture. Future work will be done to validate and standardize the technique as a routine test for prenatal HPA genotyping.

Projektkennzahlen

Förderung:	5. Rahmenprogramm der EU-Forschungsförderung (QLK3-CT-2001-01169)
Laufzeit:	2001 bis 2004
Projektleitung:	Prof. Dr. Harald Klüter
Mitarbeiter:	Dr. Alex Dugrillon Dr. Peter Bugert Andrea Lese (Doktorandin) Renate Dvorak (MTA) Rebecca Bischke (MTA)
Kooperationen:	Dieses Projekt wird in enger Kooperation mit der Universitäts-Frauenklinik des Klinikums Mannheim bearbeitet.

Weiterführende Informationen:

- Klüter H, Fehlau K, Panzer S, Kirchner H, Bein G: Rapid typing for platelet antigen (HPA)-systems -1, -2, -3 and -5 by PCR-SSP. Vox Sang 71:121-125 (1996)
- Bein G, Hackstein H, Klüter H: DNA typing of human platelet antigen systems -1, -2, -3 and -5 in B-lymphoblastoid cell lines of the International Histocompatibility Workshop. Tissue Antigens 49: 443-447 (1997)
- Klüter H, Gembruch U; Diagnostik und Therapie der Neonatalen und Fetalen Alloimmunthrombozytopenie PÄD Praktische Pädiatrie 3: 195-200 (1997)
- Klüter H, Germer U, Gortner L, Kirchner H, Gembruch U: Coincidence of neonatal alloimmune thrombocytopenia and maternal anti-D immunization. Brit J Haematol 102: 1383-1384 (1998)
- Hagenström H, Schlenke P, Hennig H, Kirchner H, Klüter H: Quantification of platelet-associated IgG for differential diagnosis of patients with thrombocytopenia. Thromb Haemostasis 83: 779-783 (2000)
- Lese A, Meckies J, Zieger W, Klüter H, Bugert P: Prenatal HPA-genotyping from maternal plasma or serum. Infus Ther Transfus Med 29 (suppl):45 (2002)

www.ma.uni-heidelberg.de/inst/iti/

Kontakt:

Prof. Dr. med. Harald Klüter

Institut für
Transfusionsmedizin und
Immunologie Mannheim

DRK-Blutspendedienst
Baden-Württemberg –
Hessen ggGmbH
Friedrich-Ebert-Straße 107
68167 Mannheim

Telefon
0621 – 3706 - 817

Fax
0621 – 3706 - 818

E-Mail
h.klueter@blutspende.de

1. Hämotherapie - Sicherheit von Blutprodukten

Baden-Baden Arbeitsgruppen Richter / Dengler / Scharberg	
2002 Dengler T, Agildere A., Richter E.: Quality control of inline filtered red blood cell concentrates after introduction of general leucocyte depletion. <i>Infus Ther Transfus Med</i> 2002; 29(S1):54-55	for platelet function – a multilaboratory study. <i>Transfusion</i> 2002; 42 (Suppl.): 53-545
Van den Broeke, T. L., Dumont L. J., Hunter S., Nixon J., MurphyS., Roger J., Herschel L., Buchon J. A., Gullikson H., Dengler T., Harnsey V., Prowse C.: Platelet storage solution effects on the accuracy of laboratory tests	Green C., Coghlan G., Bizot M., Kasulke D., Bombail-Girard M., Wallace M.: JAHK: A Low Frequency Antigen Associated With the rG Complex of the Rh Blood Group System. <i>Transfusion Medicine</i> 2002; 12:55-61
	2001 Scharberg E.A., Richter E., Greger D., Ernst A., Senne J., Kohl M.: Two case reports of anti-Chido in multiply transfused patients. <i>Infus Ther Transfus Med</i> 2001; 28:40-41

Frankfurt Arbeitsgruppen Roth / Seifried	
2002 Van Der Poel C. L., Seifried E., Schaasberg W. P.: Paying for blood donations: still a risk? <i>Vox Sang</i> 2002; 83:285-293	Sarrazin C., Bruckner M., Herrmann E., Ruster B., Bruch K., Roth W. K., Zeuzem S.: Quasispecies hetero-geneity of the carboxy-terminal part of the E2 gene including the PePHD and sensitivity of hepatitis C virus 1b isolates to antiviral therapy. <i>Virology</i> 2001; 289:150-163
Roth W. K., Seifried E.: The German experience with NAT. <i>Transfus Med</i> 2002; 12:255-258	Nubling M., Nubling C. M., Seifried E., Weichert W., Lower J.: Human T-cell lympho-cytotrophic virus prevalence in German blood donors and „at-risk“ groups. <i>Vox Sang</i> 2001; 81:204-206
Roth W. K., Weber M., Petersen D., Drosten C., Buhr S., Sireis W., Weichert W., Hedges D., Seifried E.: NAT for HBV and anti-HBc testing increase blood safety. <i>Transfusion</i> 2002; 42:869-875	Kronenberger B., Ruster B., Elez R., Weber S., Piper A., Lee J. H., Roth W. K., Zeuzem S.: Interferon alfa downregulates CD81 in patients with chronic hepatitis C. <i>Hepatology</i> 2001; 33:1518-1526
Roth WK., Weber M., Buhr S., Drosten C., Weichert W., Sireis W., Hedges D., Seifried E.: Yield of HCV and HIV-1 NAT after screening of 3.6 million blood donations in central Europe. <i>Transfusion</i> 2002; 42:862-868	Roth W. K., Seifried E.: Yield and future issues of nucleic acid testing. <i>Transfus Clin Biol</i> 2001; 8:282-284
Seifried E., Findhammer S., Roth WK.: Status of NAT screening for HCV, HIV and HBV– experiences of the German Red Cross Blood Donation Services. <i>Dev Biol (Basel)</i> 2002; 108:23-27	Roth W. K., Seifried E.: Reducing the residual risk of transfusion-transmitted viruses: mini-pool or single-donation NAT? <i>Transfusion</i> 2001; 41:845-847
2001 Drosten C., Seifried E., Roth WK.: TaqMan 5'-nuclease human immunodeficiency virus type 1 PCR assay with phage-packaged competitive internal control for high-through-put blood donor screening. <i>J Clin Microbiol</i> 2001; 39:4302-4308 (IF 3,965)	Zeuzem S., Herrmann E., Lee J. H., Fricke J., Neumann A. U., Modi M., Colucci G., Roth W. K.: Viral kinetics in patients with chronic hepatitis C treated with standard or peginterferon alpha2a. <i>Gastroenterology</i> 2001; 120:1438-1447
	Ruster B., Zeuzem S., Krump-Konvalinkova V., Berg T., Jonas S., Severin K., Roth W. K.: Comparative sequence analysis of the core- and NS5-region of hepatitis C virus from tumor and adjacent non-tumor tissue. <i>J Med Virol</i> 2001; 63:128-134

Mannheim Arbeitsgruppen Klüter / Janetzko	
2002 Klüter H.: The Struggle for safer Blood: Pathogen Inactivation of Cellular Blood Components: <i>Blood Therapies in Medicine</i> 2002; 2:42-47	light for pathogen inactivation. <i>Infus Ther Transfus Med</i> 2002; 29:193-198
Hartwig D., Härtel C., Hennig H., Müller-Steinhardt M., Schlenke P., Klüter H.: Evidence for de novo-synthesis of cytokines and chemokines in platelet concentrates. <i>Vox Sang</i> 2002; 82:182-190	2001 Janetzko K., Weber K., Klüter H., Wagner T., Schlenke P.: Efficiency of the Cell Separator AMICUS for platelet depletion in the treatment of essential thrombocythemia. <i>Journal of Clinical Apheresis</i> 2001; 16:33-34
Janetzko K., Klinger M., Mayaudon V., Lin L., Eichler H., Klüter H.: Storage Characteristics of split double-dose platelet concentrates derived from apheresis and treated with amotosalen hydrochloride and UVA	Janetzko K., Klüter H., Kirchner H., Klotz U. F.: The effect of moderate hypovolaemia on microcirculation in healthy elderly donors, <i>Anaesthesia</i> 2001; 56: 103-107
	Eichler H., Klüter H. Therapie mit zellulären Blutprodukten. <i>Internist</i> 2001; 42: 760-768

Ulm Arbeitsgruppe Körner	
2002 Mayr-Wohlfart U., Da Silva Cardoso M., Koerner K., Kubanek B.: Implementation of donor screening for	infectious agents transmitted by blood by nucleic acid technology. <i>Vox Sang</i> 2002; 82:87-111

2. Transplantationsimmunologie

Frankfurt Arbeitsgruppe Seidl	
2002 Donner H., Seidl C., Rau H., Herwig J., Seifried E., Usadel K. H., Badenhoop K.: Unbalanced amounts of	HLA-DQA1 allele mRNA: DQA1*03 shows high and DQA1*0501 low amounts of mRNA in heterozygous individuals. <i>Eur J Immunogenet</i> 2002; 29:321-330
	Bieda K., Pani M. A., van der Auwera B., Seidl C., Tönjes R. R., Gorus F, Usadel K. H., Badenhoop K. A.

novel retroviral long terminal repeat adjacent to the HLA DQB1 gene (DQ-LTR13) modifies Type I (insulin-dependent) diabetes susceptibility on high risk DQ haplotypes. *Diabetologia* 2002; 45:443-447

Pani M. A., Seidl C., Bieda K., Krause M., Seifried E., Usadel K. H., Badenhoop K.: Preliminary evidence that an endogenous retroviral long terminal repeat (LTR13) at the HLA-DQB1 gene locus confers susceptibility to Addison's disease. *Clin Endocrinol* 2002; 56:773-777

2001
Seidl C., Körbitzer J., Badenhoop K., Seifried E., Hoelzer D., Zanelli E., Kaltwasser J.P: Protection

Ulm Arbeitsgruppen Schwarz / Goldmann	
2001 Ottinger H. D., Müller C. R., Goldmann S. F., Arnold R., Beelen D. W., Blasczyk R., Bunjes D., Casper J., Ebell W., Ehninger G., Eiermann T., Einsele H., Fauser A., Ferencik S., Finke J., Hertenstein B., Heyll A., Klingebiel T., Knipper, Kolb H.- J. A., Kolbe K., Kremens B., Lenartz E., Lindemann M., Müller C. A., Mytelineos J., Niederwieser D., Runde V., Sayer H., Schäfer U. W., Schmitz N., Schröder S., Schulze-Rath R., Schwertfeger R., Siegert W., Thiele B.,Zander A.	R., Grosse-Wilde H.: Second German consensus on immunogenetic donor search for allotransplantation of hematopoietic stem cells. <i>Ann. Hematol</i> 2001; 80:706-714
	Eichler H., Wölpl A., Schwarz K., Richter E., Goldmann SF: Samples identification errors observed within a study for molecular cord blood HLA typing. <i>Infusions Ther Transfusionsmed</i> 2001; 28; 16-18
	Eichler H., Wölpl A., Goldmann SF: Sample identification errors in cord blood banking. <i>Tissue Antigens</i> 2001; 57: 91-92

3. Immunhämatologie

Mannheim Arbeitsgruppen Bugert / Kerowgan	
2002 Kissel K., Scheffler S., Kerowgan M., Bux J.: Molecular basis of NB1 (HNA-2a, CD177) deficiency <i>Blood</i> 2002; 99:4231-4233	2001 Bugert P, Rütten L., Görg S, Klüter H.: Characterization of a novel O1 variant allele at the ABO blood group locus. <i>Tissue Antigens</i> 2001; 58:422-424
	Spindler J. H., Klüter H., Kerowgan M.: A novel microplate agglutination method for blood grouping and reverse typing without the need for centrifugation. <i>Transfusion</i> 2001; 41:627-632

Ulm Arbeitsgruppe Flegel	
2002 Wagner FF, Eicher N.I., Jørgensen J.R., Lonicer C.B., Flegel W. A.: DNB: a partial D with anti-D frequent in Central Europe. <i>Blood</i> 100:2253-2256 (2002)	Flegel W. A., Wagner F.F: Characterization of antibodies against the Rhesus D antigen using red blood cells expressing Rhesus protein variants. In: D. Mason (Ed.) <i>Leucocyte Typing VII</i> . Seiten 598 – 600. Oxford University Press, Oxford, 2002
Wagner FF, Ladewig B., Angert K.S., Heymann G.A., Eicher N.I., Flegel W. A.: The DAU allele cluster of the RHD gene. <i>Blood</i> 100: 306 – 311, 2002	

Flegel WA., Curin-Serbec V., Delamaire M., Donvito B., Ikeda H., Jørgensen J., Kumpel B., Le Pennec P-Y, Pisaka M., Tani Y., Uchikawa M., Wendel S., Wagner F.F: Rhesus index and antigen density: An analysis of the reproducibility of flow cytometric deter-mination (Section 1B: Rh flow cytometry – Coordina-tor's report). *Transf. Clin. Biol.* 9: 33 – 42, 2002

Wagner FF, Flegel WA.: RHCE represents the ancestral RH position, while RHD is the duplicated gene. *Blood* 99: 2272 – 2273, 2002

Flegel W. A., Wagner F.F: Molecular biology of partial D and weak D: implications for blood bank practice (reprinted with modifications). *Clin. Lab.* 48: 53 – 59, 2002

Lippert H.-D., Flegel WA.: Kommentar zum Transfusionsgesetz (TFG) und den Hämotherapie-Richtlinien. XXXIX, 521 Seiten gebunden. Springer, Berlin, 2002. ISBN 2-540-41816-4

Flegel W.A., Wagner F.F: Molekularbiologie von partial D und weak D: Bedeutung für die Praxis in der Blutzentrale (Übersetzung). *MTA Dialog* 8: 662 – 665, 2002

Flegel W. A., Wagner F.F: Characterization of antibodies against Rh complex, RhcE and Rh50 antigens. In: D. Mason (Ed.) *Leucocyte Typing VII*. Seiten 596–598. Oxford University Press, Oxford, 2002

against severe disease is conferred by DERAA-bearing HLA-DRB1 alleles among rheumatoid arthritis patients carrying the HLA-DQ3-DR4 and HLA-DQ5-DR1 haplotypes. *Hum Immunol* 2001; 62:523-529

Willenbrock K., Roers A., Seidl C., Wacker H.-H., Küppers R., Hansmann M.-L.: Analysis of T-cell sub-populations in T-cell non-Hodgkin's lymphoma of ALLD type by single target gene amplification of T-cell receptor beta gene rearrangements. *Am J Clin Pathol* 2001; 158:1851-1857

Ulm Arbeitsgruppen Schwarz / Richter	
2002 Eichler H., Wölpl A., Schwarz K., Richter E., Goldmann SF: Samples identification errors observed within a study for molecular cord blood HLA typing. <i>Infusions Ther Transfusionsmed</i> 2001; 28; 16-18	
	Eichler H., Wölpl A., Goldmann SF: Sample identification errors in cord blood banking. <i>Tissue Antigens</i> 2001; 57: 91-92

Ulm Arbeitsgruppen Schwarz / Richter	
2002 Eichler H., Wölpl A., Schwarz K., Richter E., Goldmann SF: Samples identification errors observed within a study for molecular cord blood HLA typing. <i>Infusions Ther Transfusionsmed</i> 2001; 28; 16-18	
	Eichler H., Wölpl A., Goldmann SF: Sample identification errors in cord blood banking. <i>Tissue Antigens</i> 2001; 57: 91-92

Ulm Arbeitsgruppen Schwarz / Richter	
2002 Eichler H., Wölpl A., Schwarz K., Richter E., Goldmann SF: Samples identification errors observed within a study for molecular cord blood HLA typing. <i>Infusions Ther Transfusionsmed</i> 2001; 28; 16-18	
	Eichler H., Wölpl A., Goldmann SF: Sample identification errors in cord blood banking. <i>Tissue Antigens</i> 2001; 57: 91-92

Ulm Arbeitsgruppen Schwarz / Richter	
2002 Eichler H., Wölpl A., Schwarz K., Richter E., Goldmann SF: Samples identification errors observed within a study for molecular cord blood HLA typing. <i>Infusions Ther Transfusionsmed</i> 2001; 28; 16-18	
	Eichler H., Wölpl A., Goldmann SF: Sample identification errors in cord blood banking. <i>Tissue Antigens</i> 2001; 57: 91-92

Flegel W. A., Wagner F.F: Characterization of antibodies against the Rhesus D antigen using red blood cells expressing Rhesus protein variants. In: D. Mason (Ed.) *Leucocyte Typing VII*. Seiten 598 – 600. Oxford University Press, Oxford, 2002

Joshi S.R., Wagner FF, Vasantha K., Panjwani S., Flegel WA.: An AQP1 null allele in an Indian woman with Co(a-b-) phenotype and high-titer anti-Co3 associated with mild HDN. *Transfusion* 41: 1273 – 1278, 2001

Wagner FF, Ernst M., Sonneborn H.-H., Flegel WA.: A DV-like phenotype is obliterated by A226P in the partial D DBS. *Transfusion* 41: 1052 – 1058, 2001

Wagner FF, Frohmajer A., Flegel WA.: RHD positive alleles in D negative whites. *BMC Genetics* 2: 10, 2001

Wagner T., Vadon M., Staudacher E., Schmarda A., Gassner C., Helmberg W., Lanzer G., Flegel WA., Wagner FF: A new h allele detected in Europe has a missense mutation in a(1,2)-fucosyltransferase motif II. *Transfusion* 41, 31 - 38, 2001

Müller T.N., Wagner FF, Trockenbacher A., Eicher N.I., Flegel WA., Schönitzer D., Schunter F., Gassner C.: PCR screening for common weak D types shows different distributions in three Central European populations. *Transfusion* 41, 45 - 52, 2001

Nowak-Harnau S., Wagner FF, Flegel WA.: Completely converting a national blood supply to the use of safer plasma. *Transfusion* 41: 1172 - 1173, 2001

Flegel WA.: Molecular biology of partial D and weak D: implications for blood bank practice. In: 54th Annual Meeting and Transfusion Expo. American Association of Blood Banks, Arlington PA, 2001 (CD-ROM)

4. Stammzelltransplantation und experimentelle Zelltherapie

Frankfurt Arbeitsgruppen Henschler / Tonn / Seifried	
2002 Harder F, Henschler R., Junghahn I., Lamers M.C., Müller A.M.: Human hematopoiesis in murine embryos after injecting human cord blood-derived HSCs into murine blastocysts. <i>Blood</i> 2002; 99:719-721	Uherek C., Tonn T., Uherek B., Becker S., Schnierle B., Klingemann H. G., Wels W.: Retargeting of natural killer-cell cytolytic activity to ErbB2-expressing cancer cells results in efficient and selective tumor cell destruction. <i>Blood</i> 2002; 100:1265-1273
Bug G., Rossmannth T., Henschler R., Kunz-Schughart L. A., Schroder B., Kampfmann M., Kreuzt M., Hoelzer D., Ottmann O. G.: Rho family small GTPases control migration of hematopoietic progenitor cells into multicellular spheroids of bone marrow stroma cells. <i>J Leukoc Biol</i> 2002; 72:837-845	2001 Henschler R., Appel K.E., Heyworth C.M., Glatt H.R.: Proliferation and differentiation of murine haemopoietic progenitor cells in stroma-free culture in the presence of metabolites of chlorinated pesticides. <i>Toxicol In Vitro</i> 2001; 15:31-37
Koehl U., Zimmermann S., Esser R., Sorensen J., Gruttner H.P., Duchscherer M., Seifried E., Klingebiel T., Schwabe D.: Autologous transplantation of CD133 selected hema-topoietic progenitor cells in a pediatric patient with relapsed leukemia. <i>Bone Marrow Transplant</i> 2002; 29:927-930	Engelhardt M., Douville J., Behringer D., Jahne A., Smith A., Henschler R., Lange W.: Hematopoietic recovery of ex vivo perfusion culture expanded bone marrow and unexpanded peripheral blood progenitors after myeloablative chemotherapy. <i>Bone Marrow Transplant</i> 2001; 27, 249-259
	Tonn T., Becker S., Esser R., Schwabe D., Seifried E.: Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line NK-92. <i>J Hematoth Stem Cell Res</i> 2001; 10:535-544

Mannheim Arbeitsgruppen Eichler / Nguyen	
2002 Eichler H., Beck C., Bernhard F., Bugert P., Klüter H.: Use of recombinant human DNase for processing of a thawed umbilical cord blood transplant in a patient with relapsed acute lymphoblastic leukemia. <i>Ann Hematol</i> 2002; 81:170-173	2001 Eichler H., Meckies J., Schmut N., Kern S., Klüter H., Zieger W.: Präparative und arzneimittelrechtliche Aspekte bei der Sammlung von Stammzellpräparaten aus Plazentarestblut. <i>Z Geburtsh Neonatol</i> 2001; 205:1-6
Eichler H., Beck C., Schröder B., Nguyen X. D., Klüter H.: Nonobese diabetic-severe combined immunodeficient mice transplantation of volume-reduced and thawed umbilical cord blood transplants following closed-system immunomagnetic cell selection. <i>Transfusion</i> 2002; 42:1285-92	Eichler H., Zieger W., Klüter H.: Ex vivo expansion of umbilical cord blood cells generated from CD34+ progenitors by using a megakaryocyte-active cytokine combination. <i>Infusionsther Transfusionsmed</i> 2001; 28:318-325
Eichler H., Lese A., Meckies J., Zieger W., Klüter H., Bugert P.: Prenatal HLA genotyping of uncultured amniotic fluid samples contaminated with maternal blood. <i>Am J Obstet Gynecol</i> 2002; 186:1366-1371	Eichler H., Wölpl A., Schwarz K., Richter E., Goldmann S. F.: Samples identification errors observed within a study for molecular cord blood HLA typing. <i>Infusionsther Transfusionsmed</i> 2001; 28:16-18
Nguyen X. D., Eichler H., Sucker A., Hofmann U., Schadendorf D., Klüter H.: Collection of autologous monocytes for dendritic cell vaccination therapy in metastatic melanoma patients. <i>Transfusion</i> 2002; 42:425-428	Bugert P., Zieger W., Klüter H., Eichler H.: Prenatal HLA typing by PCR-SSP of uncultured amniocytes prior to the collection of related allogeneic cord blood. <i>Tissue Antigens</i> 2001; 58:103-106
	Eichler H., Wölpl A., Goldmann S. F.: Sample identification errors in cord blood banking. <i>Tissue Antigens</i> 2001; 57:91-92
	Eichler H., Zieger W.: Nabelschnurblut als Stammzellquelle – Medizinische Anwendung und arzneimittelrechtliche Hintergründe. <i>Pharmazeutische Zeitung</i> 2001; 32:10-14

Ulm Arbeitsgruppe Wiesneth	
2002 Schulz A.S., Classen C.F, Mihatsch W.A., Sigl-Kraetzig M., Wiesneth M., Debatin K.M., Friedrich W., Muller S.M.: HLA-haploidentical blood progenitor cell transplantation in osteopetrosis. <i>Blood</i> 2002; 99:3458-3460	Functional state of Steroid- versus G-CSF-mobilized granulocytes: Considerations about the storage of granulocyte concentrates for neutropenic patients. <i>Infus Ther Transfus Med</i> 2002; 29:57-64
Moog R., Wiesneth M.: Empfehlungen zur Blutstammzellapherese der Deutschen Cesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie. <i>Infus Ther Transfus Med</i> 2002; 29: 38-39	2001 Bunjes D., Buchmann I., Duncker C., Seitz U., Kotzerke J., Wiesneth M., Dohr D., Stefanic M., Buck A., v Harsdorf S., Glatting G., Grimminger W., Karakas T., Munzert, G. Doehner, H. Bergmann L., Reske S.N.: Rhenium 188-labeled anti-CD66 (a, b, c, e) monoclonal antibody to intensify conditioning regimen prior to stem cell transplantation for patients with high-risk acute myeloid leukaemia or myelodysplastic syndrome: results of a phase I - II study. <i>Blood</i> 2001; 98:565-572
Schmitt A., Reinhardt P., Schmitt M., Nowak-Harnau S., Maccari B., Schulz A., Kubanek B., Wiesneth M.:	

5. Genterapie angeborener Erkrankungen des Blutes

Frankfurt Arbeitsgruppen Tonn / Seifried	
2002 Tonn T., Herder C., Becker S., Seifried E., Crez M.: Generation and characterization of human hematopoietic cell lines expressing factor VIII. <i>J Hematother Stem Cell Res</i> 2002; 11:695-704	Tonn T., Becker S., Herder C., Crez M., Seifried E.: Developing hematopoietic stem cells as targets for gene therapy of hemophilia A. in 32nd Hemophilia Symposium Hamburg 2001, eds. I. Scharer et W. Schramm, Springer Verlag pp 61-72; 2002

Ulm Arbeitsgruppe Schwarz	
2002 Yunmei M., Pannicke, U., Schwarz K. und Lieber M.R.: Hairpin opening and overhang processing by an Artemis /DNA-dependent protein kinase complex: in nonhomologous DNA end joining and V(D)J recombination. <i>Cell</i> 2002; 108:781-794	recombination defects in lymphocytes due to RAG mutations: a severe immunodeficiency with a spectrum of clinical presentations. <i>Blood</i> 2001; 97:81-88
Karanjawala Z.E., Adachi N., Irvine R., Oh E.K., Shibata D., Schwarz K., Hsieh C.-H. und Lieber M.: The embryonic lethality in DNA Ligase IV deficient mice is rescued by deletion of Ku: Implications for unifying the heterogeneous phenotypes of NHEJ mutants. <i>Mutat Res-DNA Repair</i> 2002; 1:1017-1026	Müller S., Ege M., Pottharst A., Schulz A.S., Schwarz K. und Friedrich W.: Transplacentally acquired maternal T lymphocytes in severe combined immunodeficiency: A study of 121 patients. <i>Blood</i> 2001; 98:1847-1851
2001 Haddad E., Zugaza J.L., Louache F, Debili N., Crouin C., Schwarz K., Fischer A., Vainchenker W. und Bertoglio J.: The interaction between Cdc42 and WASP is required for SDF-1 induced T-lymphocyte chemotaxis. <i>Blood</i> 2001; 97:33-38 Villa, Anna, Cristina Sobacchi, Luigi D Notarangelo, et al., Wilhelm Friedrich and Klaus Schwarz: V(D)J	Vihinen M., Arredondo-Vega F X., Cassanova J.-L., Etzioni A., Giliani, S., Hammarström L., Hershfield M.S., Heyworth P.G., Hsu A.P, Lähdesmäki A., Lappalainen I., Notarangelo L.D., Puck J.M., Reith W., Roos D., Schumacher R.F, Schwarz K., Vezzoni P, Villa A., Väliaho J. und Smith C.I.E.: Primary immunodeficiency mutation databases. In <i>Advances in Genetics</i> . Ed.: C.H. Hall, J.C. Dunlap, T. Friedmann und F. Giannelli, Academic Press,San Diego, 43, 103-188, 2001.
	Berger F, Soligo D., Schwarz K., Bossolasco P, Schrezenmeier H., Kubanek B., Lambertenghi-Deliliers G., Licht T.: Efficient retrovirus-mediated transduction of primitive human peripheral blood progenitor cells in stoma-free suspension culture. <i>Gene therapy</i> 2001; 8: 687-696

6. Hämostaseologie

Frankfurt Arbeitsgruppen Oldenburg / Seifried	
2002 Fregin A., Rost S., Wolz W., Krebsova A., Mueller C. R., Oldenburg J.: Homozygosity mapping of a second gene locus for hereditary combined deficiency of vitamin K-dependent clotting factors (FMFD) to the centromeric region of chromosome 16. <i>Blood</i> 2002; 100:3329-3332	2001 Leuer M., Oldenburg J.*, Lavergne J. M., Ludwig M., Fregin A., Eigel A., Ljung R., Goodeve A., Peake I., Olek K.: Somatic mosaicism in hemophilia A: A fairly common event. <i>Am J Hum Genet</i> 2001; 69:75-87 (*contributed equally)
Klopp N., Oldenburg J., Uen C., Schneppenheim R., Graw J.: 11 haemophilia A patients without mutations in the FVIII encoding gene. <i>Thromb Haemost</i> 2002; 88:357-360	Neuhaus T., Hertfelder H.J., Hess L., Oldenburg J., Walger P., Vetter H.: An uncommon cause of severe soft tissue bleeding during phenprocoumon treatment. <i>Dtsch Med Wochenschr</i> 2001; 126: 654-756
Kreuz W., Leissinger C., Oldenburg J., Lusher J., Kelleher J., Gorina E., Kellermann E., Larson P.: Inhibitor development and FVIII gene mutation analysis in a pediatric cohort treated with sucrose formulated, full-length recombinant Factor VIII. <i>Hemophilia</i> 2002; 8:836	Oldenburg J.: Mutation profiling in Haemophilia A. <i>Thromb Haemost</i> 2001; 85: 577-579
Kreuz W., Ettingshausen C. E., Zyschka A., Oldenburg J., Saguer I. M., Ehrenforth S., Klingebiel T.: Inhibitor development in previously untreated patients with hemophilia A: a prospective long-term follow-up comparing plasma-derived and recombinant products. <i>Semin Thromb Hemost</i> 2002; 28:285-90	Ivaskevicius V, Jurgutis R., Rost S., Müller A., Schmitt C., Wulf K., Herrmann F.H., Müller C. R., Schwaab R., Oldenburg J.: Lithuanian Haemophilia A and B register comprising phenotypic and genotypic data. <i>Br J Haematol</i> 2001; 112: 1062-1070
Brackmann H. H., Effenberger W., Schwaab R., Hess L., Hanfland P., Oldenburg J.: Quality management and quality assurance in haemophilia care: a model at the Bonn haemophilia centre. <i>Haemophilia</i> 2002; 8:211-216	Schneppenheim R., Budde U., Obser T., Brassard J., Krey S., Mainusch K., Ruggeri Z. M., Schwaab R., Oldenburg J.: Expression and characterization of von Willebrand dimerization defects in different types of von Willebrand disease. <i>Blood</i> 2001; 97:2059-2066
El-Maarii O., Herbinaux U., Walter J., Oldenburg J.: A rapid, quantitative, non-radioactive bisulfite-SNuPE-IP RP HPLC assay for methylation analysis at specific CpG sites. <i>Nucl Acid Res</i> 2002; 30:e25	Oldenburg J., Kriz K., Wüillemin W. A., Maly F.E., Felten von A., Siegemund A., Keeling D. M., Baker P., Chu K., Konkle B., Lämmle B., Albert T.: Genetic predisposition to bleeding during oral anticoagulant therapy: Evidence for common founder mutations (FIXVal-10 and FIXThr-10) and an independent CpG hotspot mutation (FIXThr-10). <i>Thromb Haemost</i> 2001; 85:454-457
Müller M., Bomke B., Seifried E.: Fresh frozen plasma in patients with disseminated intravascular coagulation or in patients with liver diseases. <i>Thromb Res</i> 2002; 107 Suppl 1:S9	Bestmann L., Züger M., Oldenburg J., Bühler D., Maly F.E.: LightCycler PCR for coagulation factor IX propeptide Alanine –10 @ Valine and Alanine –10 @ Threonine mutations causing coumarin hypersensitivity: Identification of two female Alanine –10 @ Valine heterozygotes in an affected family. <i>Thromb Haemost</i> 2001; 85:567-568
Lindhoff-Last E., Humpich M., Schmitt J., Rodiger S., Seifried E., Bauersachs R.: MIXCON-LA a precise, sensitive and specific aPTT-based assay for detection of lupus anticoagulant. <i>Clin Appl Thromb Hemost</i> 2002; 8:163-167	Oldenburg J., Ivaskevicius V, Rost S., Fregin A., White K., Holinski-Feder E., Müller C. R., Weber B. H. F.: Evaluation of DHPLC in the Analysis of Haemophilia A. <i>J Biochem Biophys Methods</i> 2001; 47: 39-51

6. Hämostaseologie

2001

Oldenburg J., El-Maarri O., Schwaab R.: Inhibitor development in correlation to factor VIII genotypes. Haemophilia 2002; 8:23-29

Oldenburg J., Schwaab R.: Molecular biology of coagulation factors. Semin Thromb Hemost 2001; 27:313-324

Schwaab R., Oldenburg J.: Gene therapy of hemophilia. Semin Thromb Hemost 2001; 27:417-424

Oldenburg J., Tuddenham E.G. D.: Genetic basis of inhibitor development in severe haemophilia A and B. In: Inhibitors in Patients with Haemophilia. Editors Rodriguez-Merchan EC and Lee CA. Blackwell Science Oxford 2002; 21-28

Mannheim

Arbeitsgruppen Klüter / Bugert / Dugrillon

2002

Dugrillon A., Eichler H., Kern S., Klüter H.: Preparation of concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for bone augmentation in oral surgery. DZZ (Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift) 2002; 57: 186-187 (nicht gelistet)

Dugrillon A., Eichler H., Kern S., Klüter H.: Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. International Journal of Oral & Maxillofacial Surgery 2002; 31:615-619

2001

Jonas J. B., Klüter H.: Autologous platelet concentrate injection into overfiltrating or leaking filtering blebs. J Glaucoma 2001, 10:251

Bugert P., Decker S., Klüter H.: Exon-Amplification-Restriction-Ligation (EARL): an efficient strategy for direct sequencing of exons. Biotechniques 2001; 30:490-496

Hanke S., Bugert P., Chudek J., Kovacs G.: Cloning a calcium channel alpha2delta-3 subunit gene from a putative tumor suppressor gene region at chromosome 3p21.1 in conventional renal cell carcinoma. Gene 2001; 264:69-75

Wissenschaftliche Vorträge, publizierte Abstracts und Fortbildungen

In 2001 und 2002 wurden von den Instituten Baden-Baden, Frankfurt, Mannheim und Ulm des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen insgesamt 311 wissenschaftliche Vorträge, Abstracts und Vorträge im Rahmen von sonstigen Fortbildungsveranstaltungen gehalten bzw. veröffentlicht. Aufgrund der großen Zahl der Beiträge sind diese nicht einzeln aufgeführt, sondern in einer Tabelle zusammengefaßt. Das detaillierte Verzeichnis kann über den ärztlichen Geschäftsführer angefordert bzw. über die Internetseiten des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen (z. B. <http://www.bsdhessen.de>) eingesehen werden.

Institut	2001	2002	Gesamt
Baden-Baden	23	20	43
Frankfurt	65	47	112
Mannheim	27	37	64
Ulm	52	40	92
Gesamt	167	144	311

Wissenschaftspreise

In 2001 erhielt Herr Prof. Dr. med. Erhard Seifried, Institut Frankfurt, den Preis Claes F. Högmans Lecturer of Transfusion Medicine in Stockholm.

In 2002 erhielt Herr Dr. med. Johannes Oldenburg, Institut Frankfurt, den Alexander-Schmidt-Preis der Gesellschaft für Thrombose und Hämostaseforschung.

Posterpreise

In 2001 erhielten A. Eil, P. Reinhardt, B. Maccari, D. Bunjes, M. Wiesneth, Institut Ulm, den Posterpreis der DGTI für den Beitrag „CD34 positive selection of allogeneic PBPC using immunomagnetic preparation“.

In 2002 erhielten Lese A., Meckies J., Zieger W., Klüter H., Bugert P., Institut Mannheim, den Posterpreis der DGTI für den Beitrag „Prenatal HPA-genotyping from maternal plasma or serum“.

Lehrveranstaltungen 2001 und 2002

Frankfurt

Aktuelle Entwicklung in der Molekularen Transplantationsimmunologie und -diagnostik

Aktuelle Entwicklung in der Molekularen Virologie und Zellbiologie

Das HLA-System: Molekulare Struktur und klinische Bedeutung

Doktorandenseminar: Aktuelle Entwicklung in der Molekularen Transplantationsimmunologie und -diagnostik

Doktorandenseminar: Aktuelle Entwicklung in der Molekularen Virologie und Zellbiologie

Grundlagen der Klinischen Laboratoriumsdiagnostik für Humanmediziner

Grundlagen der Stammzellbiologie

Grundlagen der Transfusionsmedizin und Immunhämatologie

Immunhämatologisches Praktikum

Molekularbiologische und genetische Methoden in der Medizin

Pathophysiologische Therapie von Krankheitsbildern der Blutgerinnung

Praktikum der Klinischen Chemie und Hämatologie für Humanmediziner

Praktikum „Molekularbiologische und gentechnische Methoden in der Medizin“

Virussicherheit von Blutprodukten

Mannheim

Advances in transfusion medicine and immunology

Blutgruppen im Vorlesungszyklus „Mikrobiologie/Immunhämatologie“

Blutgruppenserologisches Seminar für die PJ-Studenten

Klinische Immunologie mit Patientenvorstellung

Mikrobiologie und Immunologie, theoretische Einführung

Mikrobiologisches Praktikum (in Zusammenarbeit mit KollegInnen aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Mannheim)

Molekularbiologische Methoden in der Transfusionsmedizin

Transfusionsmedizinisches und immunologisches Kolloquium

Transfusionsmedizin und Hämostaseologie

Ulm

„Transfusionsleitlinien: Indikation für Erythrozyten, Thrombozyten und Plasma“

„Blutprodukte als Medikamente“ im Kursus Klinische Pharmakologie/Pharmakotherapie

Methoden zur HLA-Typisierung und Chimärismusanalyse

Methoden zur Qualitätskontrolle: FACS, CFU-Assay

Praktikum des Graduiertenkollegs 460: Diagnostische und therapeutische Konzepte der molekularen Medizin: V(D)J-Rekombination und Immundefekte

„Rechtliche Grundlagen: Transfusionsverantwortlicher, Qualitätsmanagement“

Seminar: Primary Immunodeficiencies: Molecular Diagnostics

Vorlesung, Praktikum und POL-Seminar „Transfusionsmedizin“ im Kursus Mikrobiologie für Medizinstudenten

Vorlesung und Praktikum im Kursus Medizinische Mikrobiologie, Immunologie, Virologie und Transfusionsmedizin für Humanmediziner sowie für Zahnmediziner

Vorlesung und Praktikum „Transfusionsmedizin“ im Kursus Mikrobiologie für Studenten der Zahnmedizin

Workshop Blutstammzelltransplantation: Blutstammzellpräparation und -transplantation „Zelluläre Therapien einschließlich Stammzelltransplantation“

Veranstaltungen 2001 und 2002

In 2001 und 2002 wurden die nachfolgend aufgeführten Veranstaltungen durchgeführt. Auf vielen dieser Veranstaltungen wurden Vorträge von eingeladenen externen Gastrednern gehalten. Darüber hinaus gab es zahlreiche weitere Seminare mit Vorträgen von Mitarbeitern aus den Instituten des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen, die hier aus Platzgründen nicht aufgeführt werden.

Baden-Baden

2001

07.05.2001
Notfallmedizinische Fortbildung für voruntersuchende Ärztinnen / Ärzte des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen

20.6.2001
Sitzung des Arbeitskreises Hämotherapie am Institut Baden-Baden, Baden-Baden

06.-07.07.2001
Fortbildung für Ärzte zur Qualifikation als Transfusionsverantwortliche und -beauftragte in Verbindung mit der Bezirksärztekammer Nordbaden, Baden-Baden

20.09.2001
D. Bartel, Grundlagenwissen zur DNA-Technologie

10.11.2001
Baden-Badener Tag der Reisemedizin, Baden-Baden

28.11.2001
Fortbildungsveranstaltung für Ärzte und MTA am Institut Baden-Baden, Baden-Baden

29.11.2001
Sitzung des Arbeitskreises Hämotherapie am Institut Baden-Baden, Baden-Baden

01.12.2001
Fortbildung des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen für Ärztinnen / Ärzte bei Blutspendeaktionen 2001 in Leonberg

2002

20.04.2002
Notfallmedizinische Fortbildung für voruntersuchende Ärztinnen / Ärzte des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen

13.06.2002
H. Ullrich, Therapeutischer Plasmaaustausch, Photopherese bei Kindern

27.6.2002
Sitzung des Arbeitskreises Hämotherapie am Institut Baden-Baden, Baden-Baden

05.-06.07.2002
Fortbildung für Ärzte zur Qualifikation als Transfusionsverantwortliche und -beauftragte in Verbindung mit der Bezirksärztekammer Nordbaden, Baden-Baden

19.10.2002
Baden-Badener Tag der Reisemedizin, Baden-Baden

11.11.2002
Sitzung des Arbeitskreises Hämotherapie am Institut Baden-Baden, Baden-Baden

27.11.2002
Fortbildung für Ärzte und MTA am Herzzentrum Lahr, Lahr

30.11.2002
Fortbildung des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen für Ärztinnen / Ärzte bei Blutspendeaktionen 2002 in Leonberg

Frankfurt

2001

17.01.2001
Dr. M. Hallensleben (Transfusionsmedizin, MHH Hannover), Molekulargenetische Diagnostik des ABO-Blutgruppensystems

24.01.2001
Dr. A. Maurer (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt), Aktuelle Erkenntnisse zur Pathogenese der akuten myeloischen Leukämie und daraus resultierende neue Therapieoptionen

14.02.2001
Dr. Gesine Bug (Medizinische Klinik III, Universitätsklinikum Frankfurt), Expansion von Nabelschnurblut zur Transplantation von erwachsenen Patienten

21.02.2001
Petra Bleibtreu-Partie (Ortho Clinical Diagnostics, Neckargemünd), Vollautomatische und GLP-gerechte Blutgruppenbestimmung mittels Auto Vue®

24.-25.02.2001
AGTF-Kongress (Arbeitsgemeinschaft Transfusionsmedizinisches Fachpersonal e.V. Deutschland), Queens Hotel, Niederrad

19.-23.03.01
49. Fortbildungskursus für Ärzte und medizinisch-technische Assistentinnen BSD Hessen, Frankfurt

04.04.2001
Dr. Matthias Behrmann (Biotest AG, Dreieich), Induktion von FVIII-Antikörpern in Hämophilie-A-Mäusen: Ein Tiermodell für Inhibitorpatienten mit „High Responder Phänotyp“

25.04.2001
Dr. Thürmer (Abteilung für Biotechnologie, Universität Würzburg), Hydrogel basierte, nicht autologe Zell- und Gewebetherapie

13.06.2001
Dr. med. S. Klein (Medizinische Klinik III, Universitätsklinikum Frankfurt), Klinik der Graft versus Host (GvH) Reaktion

27.06.2001
Prof. Dr. Rainer Seitz (Paul-Ehrlich-Institut, Langen), Prionenerkrankungen und Konsequenzen für das Transfusionswesen

29.08.2001
Tagung des Arbeitskreises Hämotherapie, Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, Frankfurt

06.-08.09.2001
9. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immungenetik (DGI) in Frankfurt

10.10.2001
PD Dr. Holger Schneider (Kinderklinik, Universität Nürnberg), Gentherapie in Utero. Größenwahn oder große Chance

24.10.2001
Prof. Dr. Christine Mannhalter (Universitätsklinik Wien), Gemischter Chimarismus bei Patienten nach nicht-myeloablativer Knochenmarktransplantation. Gegenüberstellung verschiedener Nachweismethoden

07.11.2001
Fortbildungsveranstaltung für Ärzte und MTA zu transfusionsmedizinischen Themen aus Klinik und Labor BSD Hessen, Frankfurt

14.11.2001
Dr. Thomas Noll (Forschungszentrum Jülich), Expansion von antigen-spezifischen T-Zellen für die Immuntherapie

16.-17.11.2001
Fortbildungsveranstaltung für Ärzte zur Qualifikation zum Transfusionsverantwortlichen und Transfusionsbeauftragten, Städtische Kliniken Frankfurt am Main – Höchst

21.11.2001
Prof. Dr. Stefanie Dimmler (Medizinische Klinik IV, Frankfurt), Regulation und Funktion von Endothel-Progenitorzellen

28.11.2001
Dr. Stefan Kochanek (Zentrum für Molekulare Medizin, Universität Köln), Möglichkeiten der Anwendung Adenoviraler Vektoren zur Gentherapie der Hämophilie A

12.12.2001
Dr. Robert Elez (Zentrum der Innere Medizin, Universitätsklinikum Frankfurt), Tumorthherapie mittels Antisense Oligonukleotiden gegen Prolo-like

Kinase I (PLK-1) und B cell leukemia-2 (BCL-2)

19.12.2001
Dr. Steinborn-Köhl (Zentrum der Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Frankfurt),
Der Fötus als „allogenes Transplantat“. Problematik immunologischer Reaktionen in der Schwangerschaft

11/2001-01/2002
10 wissenschaftliche Vorträge mit externen und internen Referenten im Museum für Angewandte Kunst in Frankfurt, Ausstellung Blut

2002

16.01.2002
Dr. Frank Gerdson (Medizinische Klinik I, Universitätsklinikum Frankfurt), Methoden der Thrombozytenfunktionsdiagnostik

16.01.2002
Dr. Robert Oostendorp (Medizinische Klinik, TU München), Etablierung und Charakterisierung embryonaler Stromazelllinien der Maus

06.02.2002
Dr. Dalip Pelinkovic (Orthopädie, Universitätsklinikum Frankfurt), Tissue Engineering und Gentherapie bei Arthrose

13.02.2002
Dr. Heike Merget-Millitzer (MainGen Frankfurt), Arzneimittelherstellung in der Gentherapie – Entwicklung von GMP-konformen Herstellungsverfahren am Beispiel der chronischen Granulomatose

15.-16.02.2002
Wissenschaftlicher Workshop des BSD-Institut Frankfurt, Berghotel Rübezahl, Todtnauberg

27.02.2002
Dr. Lena E. Carlsson (Abteilung Transfusionsmedizin, Klinikum Greifswald), Riesenplättchensyndrome – Rolle von nicht-muskulärem Myosin; Molekulargenetik und neue diagnostische Methoden

28.02.2002
Verleihung des 3. Preises für Transfusionsmedizin 2002 der Blutspendedienste des Deutschen Roten Kreuzes Düsseldorf an Professor van Aken, Amsterdam

06.03.2002
H. Kahla-Witzsch (Stabsstelle QS-Management, Universitätsklinikum, Frankfurt), Qualitätsmanagement am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität

13.03.2002
Dr. Anette Romanski (Medizinische Klinik III, Universitätsklinikum Frankfurt), Untersuchungen zu Resistenzmechanismen leukämischer Blasten gegenüber natürlichen Killerzellen

21.03.2002
Informationsveranstaltung des DRK-Blutspendedienstes in Hessen gemeinsam mit dem DRK-Krankenhaus Biedenkopf, Haus des Gastes, Gladenbach

8.-12.04.2002
Fortbildungskursus für Ärzte und medizinisch-technische Assistentinnen Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen, Institut Frankfurt

26.04.2002
Einweihung des Laborgebäudes, Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen gCmbH, Institut Frankfurt am Main

08.05.2002
Dr. T. Neumann-Haefelin (Neurologie, Universitätsklinikum Frankfurt), Grundlagen der Geweberegeneration nach fokaler zerebraler Ischämie: Implikationen für die Stammzelltherapie?

15.05.2002
Dr. Markus Uhrberg (Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapie, Universität Düsseldorf), Regulation von NK-Zellrezeptoren

18.09.2002
Dr. Gernot T. John (PreSens Precision Sensing GmbH, Regensburg), Anwendungsgebiete optischer Sensoren in der Biotechnologie

27.09.2002
Wissenschaftliches Symposium der DRK-Blutspendedienste: Bakterielle Kontamination von Blutprodukten – Maßnahmen und Risikoreduktion, Dresden, Sächsische Landesärztekammer

03.-04.10.2002
Wissenschaftlicher Workshop: „Aktuelle Aspekte in der Transfusionsmedizin“, Budapest

23.10.2002
Dr. Dirk Busch (Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Universitätsklinik München), In vivo Untersuchungen antigen-spezifischer T-Zellen mittels MHC-Tetramere

30.10.2002
PD Dr. Kai Gutensohn (Bioscientia), Übertragung von Prionen durch Blutprodukte

06.11.2002
Dr. Eduard Petershofen (Blutspendedienst NSTOB, Institut Oldenburg), Interne DNA-Kontrollen bei der pränatalen Blutgruppenbestimmung: Evaluierung verschiedener DNA-Marker

13.11.2002
Fortbildungskursus für Ärzte und medizinisch-technische Assistentinnen, Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen, Institut Frankfurt

20.11.2002
Dr. Alexandros Spyridonidis (Medizinische Klinik, Universität Freiburg), Epithelial differentiation of donor cells in the host after allogeneic stem cell transplantation

04.12.2002
Dr. Rainer Pepperkok (EMBL, Heidelberg), Intrazelluläres Trafficking in lebenden Zellen

11.12.2002
Prof. Dr. Wegener (DRK-Blutspendedienst Rostock) Erfolgreiche Immuntherapie mit paternalen Lymphozyten bei habituellen Aborten

18.12.2002
Dr. Christian Piechaczek (Miltenyi Biotech), Adulte Stammzellen für Zelltherapie

01/2001-12/2002
12 Informationsveranstaltungen mit externen und internen Referenten; organisiert vom DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg – Hessen, Institut Frankfurt, gemeinsam mit Krankenhäusern der Region

Mannheim

2001

13.03. und 20.11.2001
Arbeitskreis „Hämotherapie“, „Das Transfusionsgesetz, der Transfusionsverantwortliche/Transfusionsbeauftragte im Klinikalltag“ - Einführung des Arbeitskreises bei allen durch den DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg zu versorgenden Krankenhäusern

17.10.2001
PD Dr. D. M. Katschinski (Medizinische Universität Lübeck), Immunologie und Fieber

31.10.2001
Dr. J. Alferink (Klinikum Rechts der Isar, TU München), Immuntoleranz

14.11.2001
Dr. H. Hennig (Medizinische Klinik, Universität Lübeck), Hepatitis-B- und -C-Diagnostik

28.11.2001
Dr. G. Bug (Universitätsklinikum Frankfurt), Knochenmark-Stammzell-Transplantation

12.12.2001
PD Dr. F. Petersen (Forschungszentrum Borstel), Immunologische Funktion der Thrombozyten

2002

- 19.03. und 20.11.2002
Arbeitskreis „Hämotherapie“, „Das Transfusionsgesetz, der Transfusionsverantwortliche /Transfusions-beauftragte im Klinikalltag“ - Einführung des Arbeitskreises bei allen durch den DRK-Blutspendedienst Baden-Württemberg zu versorgenden Krankenhäusern
- 09.01.2002
U. Lassen (Referentin der Werbeabteilung DRK-Blutspendedienste Niedersachsen, Sachsen-Anhalt, Oldenburg und Bremen), Motivation zur Blutspende
- 23.01.2002
Dr. G. Geginat (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Klinikum Mannheim), Ex vivo Charakterisierung und Identifikation von T-Zellepitopen
- 06.02.2002
Dr. Dr. G. Weibrich (Klinik für Mund-Kiefer- und Gesichtschirurgie, Klinikum Mannheim), Thrombozyten Oralchirurgie
- 03/2002
Fortbildungsveranstaltung für Transfusionsbeauftragte und Transfusionsverantwortliche in Mannheim
- 06.03.2002
Dr. T. Ermuth (Hautklinik, Klinikum Mannheim), Autologe Keratinozytentransplantation bei chronischen Wunden
- 20.03.2002
PD Dr. H. Kropshofer (Institute for Immunology, Basel), Neue MHC Klasse II-assoziierte Selbst-Antigene auf Dendritischen Zellen nach Tumorzell-Nekrose
- 24.04.2002
PD Dr. R. Waßmuth (Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika, Düsseldorf), Dendritische Zellen in vitro: Differenzierung, Charakterisierung und Autoimmunität
- 08.05.2002
Dr. Wolfgang Seifarth (Medizinische Klinik, Mannheim), Humane endogene Retroviren – Trojanische Pferde im menschlichen Erbgut?
- 24.05.2002
Festsymposium anlässlich der Verabschiedung von Herrn Professor Dr. Shraga Goldmann in den Ruhestand
- 24.-25.05.2002
5. Internationales Thrombozytenforum in Mannheim
- 05.06.2002
PD Dr. S. Frühauf (Medizinische Klinik, Heidelberg), Gentherapeutische Strategien zur Behandlung von Sarkomen

- 19.06.2002
Dr. H. Lubenow (Abteilung Transfusionsmedizin, Greifswald), Neue Aspekte in Diagnose und Therapie der Heparininduzierten Thrombozytopenie
- 03.07.2002
Prof. Dr. J. Jonas (Augenklinik, Mannheim), Intravitreale Injektion von Triamcinolon Acetonid als Therapie intraokulärer neovaskulärer, proliferativer und ödematöser Erkrankungen
- 02.10.2002
Dr. T. Ermuth (Hautklinik, Freiburg), Autologe Keratinozytentransplantation bei chronischen Wunden
- 09.10.2002
Prof. Dr. med. J. Harenberg (Universitätsklinikum Mannheim), Diagnostik und Therapie der Heparin-assoziierten Thrombozytopenie
- 23.10.2002
PD Dr. B. Winkelmann (Universität Heidelberg), Kardiovaskuläre Erkrankungen und Pharmakogenomik
- 13.11.2002
PD Dr. A. J. Reiningger (Klinikum der LMU München), Thrombozyten, Hämostase und Thrombose
- 04.12.2002
PD Dr. med. K. Gutensohn (Bioscientia), Prionen: Transmission durch Blut und Blutprodukte

Ulm**2001**

- 07.02.2001
PD Dr. Christian Willy (Bundeswehrkrankenhaus Ulm), Mögliche Beeinflussung der Interpretation von Polytrauma-Scores durch die Folgen (oder Effekte) einer Transfusions-therapie
- 28.-29.03.2001
Blutgruppenserologischer Fortbildungskurs für Ärzte und MTA
- 03.05.2001
Dr. C. Weinstock (Tübingen), Praktische Aspekte des Transfusionsgesetzes
- 05.05.2001
Notfallmedizinische Fortbildung 2001 für voruntersuchende Ärztinnen/Ärzte des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen
- Juli 2001
Abteilung Transplantationsimmunologie: HLA-Serologie-Kurs für Biologiestudenten
- 04.10.2001
Dr. Wagner (Klinikum Groß-hadern, München), Durchflußzytometrie

- 22.-23.11.2001
IV. Workshop „Blutstammzelltransplantation“ des Berufsverbands Deutscher Transfusionsmediziner

2002

- 28.-29.01.2002
DNA-Kurs für MTA-Schule (Abteilung Transplantationsimmunologie), Einführung und praktische Durchführung eines DRB1-Low-Tests
- 20.04.2002
Notfallmedizinische Fortbildung 2002 für voruntersuchende Ärztinnen/Ärzte des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen
- 25.04.2002
Burkhart (BRK München), Austestung von seltenen Antigenen / Erfahrungen
- 15.05.2002
Dr. K. Kerschowski (Bundeswehrkrankenhaus Ulm), Notfallmedizinische Maßnahmen I: Notfallkoffer, Praktische Übungen
- 28.06.2002
Wissenschaftliches Symposium anlässlich der Verabschiedung von Herrn Professor Dr. Bernhard Kubanek in den Ruhestand
- 03.07.2002
J. Allgayer (QM-Berater für Medizinische Geräte), Einweisung, Bedienung medizinischer Geräte: EKG-Gerät, Blutdruckmessgerät, Absauggerät, Defibrillator
- 04.07.2002
HLA-Serologie-Kurs für Biologiestudenten (Abteilung Transplantationsimmunologie)
- 26.09.2002
Vortrag von Herrn Dr. C. Weinstock (Tübingen), Blutersatzstoffe
- 08.10.2002
Dr. K. Kerschowski (Bundeswehrkrankenhaus Ulm), Notfallmedizinische Maßnahmen II: Notfallkoffer, Sauerstoffgerät, Monitor, Reanimation
- 21.10.2002
Dr. Marion E. Reid (New York Blood Center, USA), Applications of Molecular Analysis in Transfusion Medicine
- 22.10.2002
Dr. Marion E. Reid (New York Blood Center, USA), Use of Hemagglutination in the Diagnosis of Diseases
- 12.11.2002
Dr. C. Hergert (Firma Gambro BCT), Lückenlose elektronische Dokumentation von Hämaphereseverfahren
- 03.12.2002
H. Bechtel (Firma Fresenius HemoCare), Neue Wickeltechnik für die Zentrifugation von Fresenius-Beutelsystemen

Mitgliedschaften/Funktionen

Baden-Baden

American Association of Blood Banks
Arbeitsgemeinschaft der Knochenmarkspender-Dateien Deutscher Blutspendedienste e. V. (ARGE-KMSB)
Associate scientific member Biomedical Excellence for safer Transfusion der ISBT
Centrum für Reisemedizin
Deutsche Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI)
Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation e.V.
Forum Reisen und Medizin e.V.
Gutachter der wissenschaftlichen Fachzeitschrift Cryobiology
International Society for Blood Transfusion (ISBT)
Serum, Cell and Rare Fluids (SCARF)
Society for Cryobiology
Society for Low Temperature Biology (SLTB)
Weiterbildungsausschuss der Bezirksärztekammer Nordbaden

Frankfurt

Akademie für ärztliche Fortbildung und Weiterbildung der Landesärztekammer Hessen
American Association of Blood Banks
American Heart Association (AHA)
American Society of Hematology (ASH)
American Society of Histocompatibility (ASHI)
Arbeitsgemeinschaft der Sachverständigen für Abstammungsgutachten in der Bundesrepublik Deutschland e. V.
Arbeitsgemeinschaft Medizinischer Laboratorien (AML), Vertreter der DGI
Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF), Vertreter der DGI
Arbeitskreis Blut
Arbeitskreis Hämotherapie Rhein-Main, Vorsitz
Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM)
Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Genterapie e. V. (DAG-GT)
Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation e.V. (DAG-KBT)
Deutsche Gesellschaft für Angiologie e. V. (DGA)
Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin e. V. (DGIM)
Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGfI), Vorstand
Deutsche Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie e. V. (DGTI), Vorstand
Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie e. V. (DGHO)
Deutsche Hämophilie Gesellschaft (DHG)
Deutscher Hochschulverband
Deutsches Institut für Vormundschaftswesen e. V.
Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e. V. (GTH), Vorstand
Gesellschaft für Humangenetik e. V. (GfH)
Editorial Boards: Blood Coagulation and Fibrinolysis, Haemophilia Monitor

EUROGRAFT-Gruppe der European Working Group on Clinical Cell Analysis (EWGCCA)
European Blood Alliance (EBA)
European Federation for Immunogenetics (EFI)
European Haematology Association (EHA)
European Haemophilia Advisory Board
European School of Transfusion Medicine (ESTM)
Frankfurter Medizinische Gesellschaft
Forschungsgemeinschaft der Blutspendedienste des Deutschen Roten Kreuzes, Vorsitz
Gutachter für die Akkreditierung von Laboratorien nach den Standards der European Federation of Immunogenetics (EFI)
Gutachter für die wissenschaftlichen Fachzeitschriften: American Journal of Human Genetics, Annals of Hematology, Blood, Blood Coagulation and Fibrinolysis, Clinical Chemistry, Haematologica, Human Genetics, Journal of Thrombosis and Haemostasis, Pharmacogenomics, Thrombosis and Haemostasis,
Interdisziplinäre Gruppe für Labordiagnostik (IGLD)
Interessengemeinschaft der Sachverständigen für Abstammungsgutachten e.V.

International Coagulation Expert Council
International Society of Experimental Hematology (ISEH)
International Society for Cellular Therapy (ISCT)
International Society for Forensic Genetics (ISFG)
International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH)
Interessengemeinschaft Haemophiler e.V., Ärztlicher Berater
New York Academy of Sciences (NYAS)
Polytechnische Gesellschaft e.V., Frankfurt am Main
Preiskuratorium für den „Wissenschaftspreis für Transfusionsmedizin“ der Blutspendedienste des Deutschen Roten Kreuzes, Vorsitz
Prüfungsausschuss im Weiterbildungswesen für das Gebiet „Transfusionsmedizin“ der Landesärztekammer Hessen
Scientific Subcommittee on Factor VIII & IX der International Society on Thrombosis and Haemostasis
Ständige Konferenz der Geschäftsführer der Blutspendedienste des Deutschen Roten Kreuzes
Ständige Konferenz der Ärztlichen Leiter transfusionsmedizinischer Institutionen an Universitäten der Bundesrepublik Deutschland
Stiftungsrat der Stiftung „Humanitäre Hilfe für durch Blutprodukte HIV-Infizierte Personen (HIV-Hilfegesetz)“
Süddeutsche Hämoblastosegruppe e.V. (SHG)
Transfusionskommission des Universitätsklinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main, Vorsitz
Wissenschaftlicher Beirat der Forschungsgemeinschaft des Deutschen Roten Kreuzes

Mannheim

American Association of Blood Banks
American Association for Clinical Chemistry
Arbeitsgemeinschaft der Knochenmarkspender-Dateien Deutscher Blutspendedienste e. V. (ARGE-KMSB)

Mitgliedschaften/Funktionen

Arbeitsgemeinschaft der Sachverständigen für Abstammungsgutachten in Deutschland e. V.
Blood Therapies in Medicine
Biomedical Excellence for Safer Transfusion der ISBT (BEST)
Deutsche Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie e. V. (DGTI)
Deutsche Gesellschaft für Immunogenetik e. V. (DGI)
Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGfI)
Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie e. V. (DGKC)
Deutsche Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie e. V. (DGTI), Vorstand
Editorial board: Transfusion Medicine and Hemotherapy, Blood Therapies in Medicine
European Bone Marrow Transplantation Group
Gesellschaft für Genetik (GfG)
International Society of Blood Transfusion (ISBT)
Sektion „Transplantation“ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, Obmann
Prüfungsausschuss „Transfusionsmedizin“ und „Bluttransfusionswesen“ der Ärztekammern Nordbaden und Süd-Württemberg
Ressort-Herausgeber für Ressort „Blutprodukte“ der Zeitschrift Transfusion Medicine and Hemotherapy
Society of Leukocyte Biology
Studienstiftung des Deutschen Volkes an der Universität Heidelberg, Vertrauensdozent
Stiftung Knochenmarkspende Deutschland (SKD), Vorstand
Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen-Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF)
Arbeitsgemeinschaft der Knochenmarkspender-Dateien Deutscher Blutspendedienste e. V. (ARGE-KMSB), Vorsitz

Ulm

Advisory Board, International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR)
American Association of Blood Banks (AABB)
American Association for the Advancement of Science (AAAS)
American Society for Microbiology (ASM)
Arbeitsgemeinschaft Pädiatrische Immunologie (API)
Deutsche Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation e. V. (DAG-KBT)
Arbeitskreis nichtmaligne Hämatologie in der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie e. V. (DGHO), Vorsitz
Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGfI)
Deutsche Gesellschaft für Immunogenetik e. V. (DGI)
Deutsche Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie e. V. (DGTI)
Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie e. V. (DGHO)
Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin e. V. (DGIM)
Deutsches Register für Stammzelltransplantation (DRST), Vorsitz
Deutsche Transplantationsgesellschaft e. V. (DTG)
Dozent des Graduiertenkollegs 460 „Diagnostic and Therapeutic Concepts in Molecular Medicine“
European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT)

European Federation for Immunogenetics (EFI)
European Society for Immunodeficiencies (ESID)
European Hematology Association (EHA)
Arbeitskreis „Richtlinien zur Transplantation peripherer Blutstammzellen“ und „Richtlinien zur Transplantation von Stammzellen aus Nabelschnurblut“ des Wissenschaftlichen Beirates der Bundesärztekammer, Federführung
Gutachter für die wissenschaftlichen Fachzeitschriften Annals of Hematology, Blood, Cell, Clinical Genetics, European Journal of Immunology, Infusionstherapie und Transfusionsmedizin, Molecular Medicine, Transfusion, Transfusion Medicine, American Journal of Obstetrics and Gynecology, Health Psychology, National Blood Authority-United Kingdom, Clinical Laboratory
Gesellschaft Deutscher Naturwissenschaftler und Ärzte (GDNA)
International Endotoxin Society (IES)
International Society for Cellular Therapy (ISCT)
International Society of Blood Transfusion (ISBT): Rare Donor Working Party
Konzertierte Aktion Stammzelltransplantation International Society for Cellular Therapy (ISCT)
Nationaler AIDS-Beirat des Bundesgesundheitsministeriums
Robert-Koch-Stiftung e. V. (RKS)
Scarf Exchange (International Immunohaematological Exchange Group)
„Seltene Blutgruppen“ der DGTI, Gründer und Koordinator
Sektion Immunhämatologie/Gentechnik der DGTI, stellvertretender Sektionsobmann
Sektion „Monoklonale Antikörper / Gentechnik“ der DGTI
Sektion „Transplantation“ der DGTI
Sektion „Molekulare Transfusionsmedizin“ der DGTI
Sektion „Präparative und therapeutische Apherese“ der DGTI
Ressortherausgeber „Transplantation“ der Zeitschrift Infusion Therapy and Transfusion Medicine
Transfusionskommission des Universitätsklinikums Ulm, Vorsitz
Union of Swiss Societies for Experimental Biology (USCEB)
Working Party on Severe Aplastic Anemia der EBMT, Vorsitz

Organe der Gesellschaft

- Gesellschafter:**
- DRK-Landesverband Baden-Württemberg e. V.
 - DRK-Landesverband Hessen e. V.
 - DRK-Landesverband Badisches Rotes Kreuz e. V.
 - Stadt Frankfurt am Main
 - Klinikum Kassel
 - DRK-Landesverband Sachsen e. V.
 - DRK-Landesverband Land Brandenburg e.V.
- Aufsichtsrat:**
- Vorsitzender:**
- S.K.H. Ludwig Prinz von Baden
bis 17.07.2002, Präsident des DRK-Landesverbandes Baden-Württemberg
 - Staatssekretär a. D. Dr. Lorenz Menz
ab 17.09.2002, Präsident des DRK-Landesverbandes Baden-Württemberg e. V.
- Stellv. Vorsitzende:**
- Bundesministerin a. D. Hannelore Rönsch
MdB, Präsidentin des DRK-Landesverbandes Hessen e. V.
- Stellv. Vorsitzender:**
- Landrat Jochen Glaeser
Präsident des DRK-Landesverbandes Badisches Rotes Kreuz e. V.
- Mitglieder:**
- Holger Adolph
Landesjustitiar des DRK-Landesverbandes Hessen e. V.
 - Dr. jur. Eberhard Benz
Landesschatzmeister des DRK-Landesverbandes Baden-Württemberg e. V.
 - Dr. jur. Günter Boll
Landesjustitiar des DRK-Landesverbandes Badisches Rotes Kreuz e. V.
 - Gerald Böcher
Landesschatzmeister des DRK-Landesverbandes Hessen e. V.
 - Nikolaus Burggraf
Stadtrat, Dezernat IX d. Magistrats d. Stadt FFM, Gesundheit, Brandschutz,
Wirtschaft und Recht
 - Gerhard Enders
Landesschatzmeister des DRK-Landesverbandes Badisches Rotes Kreuz e. V.
 - Hans Heinz
MdL, Landesgeschäftsführer des DRK-Landesverbandes Baden-Württemberg e. V.
 - Dr. Josef Höß
Präsident des DRK-Landesverbandes Sachsen e. V.
 - Prof. Dr. med. Wolfgang Kramer
Stellv. Landesarzt des DRK-Landesverbandes Baden-Württemberg e. V.
 - Helmut Meinhold
bis 31.12.2002, Ltd. Ministerialrat, Ministerium für Wissenschaft, Forschung und
Kunst Baden-Württemberg
 - Hans Hermann Reschke
Bankdirektor i. R.
 - Wolfgang Schwarz
Geschäftsführer der Klinikum Kassel gGmbH
 - Dieter Wolf
Landesbereitschaftsführer des DRK-Landesverbandes Baden-Württemberg e. V.
 - Thomas Brozat
Präsident des DRK-Landesverbandes Land Brandenburg e.V.
- Geschäftsführer:**
- Prof. Dr. med. E. Seifried, Ärztlicher Geschäftsführer
 - Günther Soedel, Kaufmännischer Geschäftsführer
 - Dipl.-Volkswirt Manfred Stähle, Kaufmännischer Geschäftsführer

Finanzierung der Forschung des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen

Die Forschung des DRK-Blutspendedienstes Baden-Württemberg – Hessen wird finanziert durch Eigenmittel des Unternehmens, durch die Universitäten Heidelberg und Ulm sowie durch verschiedene Drittmittelgeber, die nachfolgend aufgeführt sind:

Asahi Medical Corp	European Community
Baxter Deutschland GmbH	Fresenius HemoCare Immune Therapy GmbH
BEST Arbeitsgruppe der International Society for Blood Transfusion (ISBT)	Friadent GmbH
Bio-Rad Laboratories GmbH	Gambro BCT
Biotest AG, Dreieich	Ministry of Health, Beijing, China
Bundesminister für Bildung und Forschung (BMBF)	MacoPharma International GmbH
CellMed AG	Merck KGaA
Deutscher Akademischer Austausch Dienst (DAAD)	Miltenyi Biotech GmbH
Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG)	Nachlass der Familie Held/Hecker der J. W. Goethe-Universität Frankfurt
Deutsche Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI)	Novartis Stiftung
Deutsche José Carreras Leukämie-Stiftung e.V.	Octapharma GmbH
Dr. Mildred Scheel Stiftung	Pasteur Institut, Paris
Clotten-Stiftung	Stiftung Hämotherapie - Forschung
DPC Biermann GmbH	Tecan AG, Hombrechtikon, Schweiz
Eltest GmbH	

AB0-Blutgruppensystem
Seite: 48, 52, 53, 54, 55, 62, 63

AB0-Genotypisierung
Seite: 54

Abstoßungsreaktionen
Seite: 41, 81, 101, 108

Allo-Anti-D-Antikörper
Seite: 60

Allo-Immunthrombozytopenie, neonatale
Seite: 148

Angioödem, hereditäres
Seite: 122, 138, 139

Anti-D-Immunsierungen
Seite: 57, 60, 61

Anti-FVIII-Alloantikörper
Seite: 126

Antigenrezeptor, chimärer
Seite: 82, 83, 105

Anti Wr (a)
Seite: 31, 32

Apatamere
Seite: 136, 137

Apoptose
Seite: 97, 146, 147

ARTEMIS-Gen
Seite: 112, 113

Arthritis, rheumatoide
Seite: 38, 39, 40, 44, 45

Atherosklerose
Seite: 143

Autoimmunerkrankungen
Seite: 34, 36, 38, 39, 40, 41, 44

Blutgruppenbestimmung
Seite: 34, 36, 52

Blutgruppengenotypisierung
Seite: 54, 56-65

Blutpenderscreening
Seite: 28

Blutstammzellen, hämatopoetische
Seite: 42, 43, 47, 106, 108

Blutstammzelltransplantation, haploidente
Seite: 94

Buffy-coat-Transplantate
Seite: 89

B-Zell-Rezeptoren
Seite: 105, 112

C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH)
Seite: 138

C1-Inhibitor-Mangel
Seite: 138, 139

CD11a
Seite: 98, 142

CD11b
Seite: 142

CD14⁺-Zellen
Seite: 92

CD34⁺-Zellen
Seite: 90

CD34-Quantifizierung
Seite: 72, 86

CD4⁺-Zellen
Seite: 73, 94, 95

CD56⁺-Zellen
Seite: 95

CD83⁺-Zellen
Seite: 92

Chaperone
Seite: 110, 111

Chimärismus, gemischter
Seite: 42, 43, 94

Cholinkinase
Seite: 140, 141

Chorioallantois-Modell
Seite: 73, 96, 97

CHO-Zellen
Seite: 110, 116

Colony assay
Seite: 72, 86, 87

Colton-Allele
Seite: 48, 64, 65

Composol
Seite: 30

COS-Zellen
Seite: 110

CTLA-4
Seite: 38, 40

Cumarine
Seite: 134, 135

Cytokin IL-8
Seite: 140

Cytokin MCP-1
Seite: 140

DAU-Allele
Seite: 57, 56

Dendritische Zellen (DC)
Seite: 68, 71, 73, 92, 93, 96, 98, 100, 101

Dermatomyositis, juvenile
Seite: 40

Diabetes mellitus, juveniler
Seite: 34, 36, 38, 39, 44

D-Typisierung
Seite: 56, 58

Durchflusszytometrie
Seite: 66, 67, 70, 106

EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein)
Seite: 112, 114, 115, 116, 117, 118

Endoplasmatisches Retikulum
Seite: 110, 111

Endothelzellen
Seite: 108, 109, 121, 142

Epidemiologie, HIV, HBV, HCV
Seite: 22, 28

ErbB2
Seite: 83, 82

ERGIC-53 Cargorezeptor
Seite: 110

ERMÄP-Gen (erythrocyte membrane associated protein)
Seite: 62, 63

Expressionssystem, rekombinantes
Seite: 110

ex-vivo-Expansion
Seite: 69, 70, 90

Fibrinogen
Seite: 130, 133

Fluorescence Activated Cell Sorting
Seite: 114

FVIII-Protein, rekombinantes
Seite: 106, 108, 109, 110, 111

FVIII-Sekretion
Seite: 108, 109, 110, 111

Genkorrektur
Seite: 114, 115, 116, 117

Genotypisierung
Seite: 49, 54, 55, 62, 64, 65

Genregulation
Seite: 140

Gentherapie
Seite: 3, 8, 9, 14, 39, 104, 105, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 129, 133, 137

Gerinnungsfaktor VII
Seite: 130, 131, 133

Gerinnungsfaktor VIII
Seite: 108, 103,

Gerinnungsfaktor XIII
Seite: 120, 122, 130, 131, 132, 133

Gestationsdiabetes
Seite: 40

Geweberegeneration
Seite: 78, 12, 146

Glutamatrezeptor
Seite: 140, 141

GPIb
Seite: 142

Graft-versus-Leukemia-Effekt
Seite: 42

Graft-versus-Host-Reaktion
Seite: 42, 94

Granulozyten, neutrophile
Seite: 121, 140, 141, 142

Granzyme B
Seite: 80, 81

Hämophilie A
Seite: 3, 8, 31, 104, 108, 109, 111, 120, 122, 124, 126, 127, 128, 165, 166

Hämophilie B
Seite: 124

Hämorrhagie
Seite: 130

Hämostase-System
Seite: 76

Hämotherapie
Seite: 16, 17 ff.

HAV-Antikörpertiter
Seite: 31

HCV-Core-Protein
Seite: 20, 71

Hemmkörperbildung, Faktor VIII
Seite: 124, 125, 126, 127

Hepatitis A
Seite: 16, 31, 33

Hepatitis B
Seite: 16, 17, 18, 22, 23, 28, 31, 33

Hepatitis C
Seite: 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 29

Hepatitis-C-Virus-Core-Protein
Seite: 20, 21

Hepatozyten
Seite: 25, 108, 138

Hep-Net
Seite: 22, 23

HERV (Humane endogene Retroviren)
Seite: 36, 44, 45

HIV (Humanes Immundefizienz Virus)
Seite: 16, 18, 19, 28, 29

HLA A
Seite: 34, 46

HLA-Alleldifferenzen
Seite: 35, 46

HLA-Antigene, fetale
Seite: 122, 149, 150

HLA B
Seite: 34, 46

HLA-DP
Seite: 44

HLA-DQ
Seite: 34, 39, 40, 44, 45, 46, 47

HLA-DR
Seite: 30, 40, 44, 46

HLA-Genotypisierung, fetale
Seite: 148

HLA-Inkompatibilität
Seite: 40

HLA-Klasse I Antigene
Seite: 34, 35, 80

HLA-Klasse II Antigene
Seite: 34, 39, 40, 44, 45, 46, 47

HLA-Merkmale
Seite: 34, 36, 38, 39, 40, 42, 46

HLA-Rezeptorsystem
Seite: 35, 36, 39

Homing, Stammzellen
Seite: 69, 70, 74, 75, 75, 77, 88, 103

Homing-Rezeptoren
Seite: 75

Homologe Rekombination
Seite: 114

HPA-Antigene, fetale
Seite: 148

ICAM-2
Seite: 142

Immundefizienzen, hereditäre
Seite: 112

Immunmagnetverfahren
Seite: 81, 95

Immuntherapie, adoptive
Seite: 13, 42, 68, 71, 72, 73, 80, 81, 82, 92, 93, 94, 95, 96

Inaktivierung, photochemische
Seite: 16, 26, 27

Inflammation
Seite: 121, 140, 141

Inline-Filtration

Seite: 30

Kardiomyopathie, dilatative

Seite: 73, 102

Kardiomyozyten

Seite: 73, 102

Karzinom, hepatozelluläres

Seite: 20, 21, 22

KIR (killer cell immunoglobulin-like receptors)

Seite: 35, 36, 37, 38

Kolonkarzinom

Seite: 82

Kompetenznetz Hepatitis

Seite: 22, 23

Leberendothelzellen, sinusoidale

Seite: 106

Leukämie

Seite: 42, 43, 47, 68, 69, 73, 75, 77, 80, 82, 85, 101

Leukämie, myeloische

Seite: 73, 94, 98, 100, 101, 157

Leukozytapherese

Seite: 100, 101

Leukozytendepletionsfilter

Seite: 30

LTR-Elemente (Long Terminal Repeat)

Seite: 44, 45

Lungentumor, kleinzelliger

Seite: 81

Lymphokine

Seite: 94

Lymphozytenreaktionstest

Seite: 40

Maculadegeneration

Seite: 146

Mammakarzinom

Seite: 82

Marcumar

Seite: 132, 135

Metastasen

Seite: 81, 152

MHC-Restriktion

Seite: 38

Microarrayanalyse

Seite: 144

Microarray-Technologien

Seite: 92, 118, 119, 136, 140, 141

Mikrochimärismus, feto-maternaler

Seite: 40, 41

Mikrotiterplatten-Agglutinations-Methode

Seite: 52

Monozyten, CD14⁺-Zellen

Seite: 92

Myokardinfarkt

Seite: 142

Nabelschnurblut

Seite: 9, 69, 72, 76, 84, 85, 86, 87, 88, 90, 92, 106, 109

NAIT (Neonatale Allo-Immunthrombozytopenie)

Seite: 121, 148, 148

NAT (Nucleic Acid Testing)

Seite: 8, 16, 18, 22, 23, 28, 29

Nierenzellkarzinom

Seite: 68

NK-92-Zellen

Seite: 68

NK-Zellen

Seite: 8, 38, 39, 73, 80, 83, 82, 94, 95

NK-Zellrezeptor

Seite: 80,159

Osteoblasten

Seite: 146, 147

Partial D-Allele

Seite: 56, 66, 67

Partial D-Antigen

Seite: 60

PAS III m

Seite: 30

Pathogen-Inaktivierung

Seite: 26, 27

Perforin

Seite: 80,81

Phospholipase

Seite: 140, 141

Photochemische Inaktivierung

Seite: 26, 27

Proteinsekretion

Seite: 110, 111

Plasmozytom

Seite: 94

Platteneithelkarzinom

Seite: 97, 96

Plazentarestblut

Seite: 84, 88, 90, 105

Polymorphismus, HPA-1

Seite: 148,149

Polymorphismus, HPA-5

Seite: 148

Pool-Extraktion

Seite: 24, 25

Pooltestung

Seite: 28, 112, 148, 149

Pränataldiagnostik

Seite: 98

Prostatakarzinome

Seite: 98

P-Selektin

Seite: 121, 140, 141, 142, 143

PSGL1

Seite: 142

Psoralen

Seite: 26

Psoriasis

Seite: 34, 36, 39, 40

Qualitätskontrolle, Stammzellpräparation

Seite: 86

Radin (Rd)- Phänotyp

Seite: 62

RAG1-Gen (Recombination activating genes 1)

Seite: 105, 112, 113

RAG2-Gen (Recombination activating genes 2)

Seite: 105, 112, 113

Rekonstitution, hämatopoetische

Seite: 69, 84, 85

Removal™

Seite: 97, 96, 97

Repopulation, hämatopoetische

Seite: 75

Retargeting

Seite: 83, 83

Retroviren

Seite: 44, 45

Rezeptorpolymorphismus, thrombozytärer

Seite: 50

RHCE-Gen

Seite: 58, 59

RHD-Allele

Seite: 56, 57, 59

RHD-Deletion

Seite: 58

RHD-Gen

Seite: 56, 58, 59

RhD-Protein

Seite: 66

Rhesus-Antigen D

Seite: 56, 61

Rhesus-Immunisierungs-Register

Seite: 60

Rhesus-Typisierungsstrategie

Seite: 13, 60

Scianna-Blutgruppe

Seite: 62, 63

SCID (Severe Combined Immunodeficiency)

Seite: 105, 112, 113

Sequenzpolymorphismus, ERMAP-Gen

Seite: 54

Sicherheit von Blutprodukten

Seite: 16, 17ff

single nucleotide polymorphism (SNP)

Seite: 132, 133, 142, 143

Sklerodermie

Seite: 40

SMP1-Gen

Seite: 58

Stammzellen

Seite: 4, 9, 20, 21, 35, 38, 38, 39, 68, 69, 70, 72, 73, 75, 74, 79, 78, 84, 85, 90, 92, 95, 101, 102, 103, 105, 106, 114, 115

Stammzellen, hämatopoetische

Seite: 72, 73, 102, 103, 106, 115

Stammzellmigration

Seite: 74

Stammzellpräparation, kryokonservierte

Seite: 90

Stammzelltransplantation

Seite: 4, 9, 10, 14, 35, 42, 46, 68, 73, 76, 77, 94, 95

Stammzelltransplantation, allogene

Seite: 46, 69, 105

STR (Short-tandem-Repeat-Polymorphismen)

Seite: 42, 94

Thrombembolie

Seite: 128, 129

Thrombozyten

Seite: 16, 26, 32, 50, 76, 101, 121, 123, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149

Thrombozytenkonzentrate

Seite: 16, 26, 27, 30, 146

Thyreoiditis (Hashimoto)

Seite: 40

T-Lymphozyten

Seite: 94

Toleranzinduktion

Seite: 92

TPHA-Screening

Seite: 32

Transdifferenzierung

Seite: 73, 102, 103

Transduktion, in vivo

Seite: 106

Transkription, retrovirale

Seite: 20, 44

Transplantation, fremd-allogene

Seite: 84

Transplantation, familiär-allogene

Seite: 84

Transplantation, HLA-idente

Seite: 94, 95

Transplantation, HLA-nichtidente

Seite: 94, 95

Tumor-Vakzinierung

Seite: 92

Tumorzellapoptose

Seite: 97, 96

T-Zellen

Seite: 34, 36, 39, 38, 69, 93, 94, 95, 101, 105, 113

T-Zell-Proliferationstest

Seite: 92

T-Zell-Rezeptor

Seite: 38, 105, 112

V(D)J-Rekombination

Seite: 105, 112

Vakzinierungstherapie

Seite: 98, 100

Vektoren, adenovirale, lentivirale, retrovirale

Seite: 108, 109

Virusinaktivierung

Seite: 30

Vitamin-K-Zyklus

Seite: 134, 136

VNTR-Region (variable number of tandem repeats)

Seite: 142

Vorläuferzellen, endotheliale

Seite: 108, 109

Vorläuferzellen, hämatopoetische

Seite: 74, 75, 76

Vorläuferzellen, mesenchymale

Seite: 78

Vorläuferzellen, osteogene

Seite: 78

Vorläuferzellen, chondrogene

Seite: 78

Wachstumsfaktoren, thrombozytäre

Seite: 50, 121, 123, 146

Weak D-Allele

Seite: 6, 56

Wundheilung

Seite: 121, 142, 146

X-Chromosom

Seite: 108, 114, 170

Zelltherapie

Seite: 4, 70, 73, 74, 80, 81, 82, 84, 85, 88

Zytotoxizität

Seite: 108

Agglutination

serologische (das Serum betreffende) Verdümpfung antigentragender Teilchen (z.B. Erythrozyten, Bakterien etc.) durch entsprechende Antikörper (Agglutinine, Isoantikörper, Immunglobuline)

Agglutinationstest

zu Agglutination führende Antigen-Antikörper-Reaktion

Alloantigen

individuell variable Bestandteile auf Zelloberflächen von z.B. Erythrozyten, Lymphozyten bei Blut-, Zell- und Organspendern

Alloantikörper

gegen o.g. Antigene gerichteter Antikörper

allogene Transplantation

Transplantation, bei der dem Patienten Knochenmark oder Stammzellen eines Spenders, der ein Familienangehöriger oder ein unverwandter Spender sein kann, transplantiert wird

Antigen

immunologische Bezeichnung für jede (xeno-, allo- oder isogene sowie autologe) Substanz mit chemisch charakterisierten Gruppierungen (Determinanten), die vom Organismus als fremd erkannt wird und die Befähigung besitzt, eine Immunantwort auszulösen

Antihumanglobulin

Antikörper gegen menschliche Serumbestandteile (Immunglobuline); wird durch Immunisierung von z.B. Kaninchen gewonnen.

Arteriosklerose

Arterienverkalkung; häufigste Systemerkrankung der Arterien, und zwar als chronisch fortschreitende Degeneration (Atheromatose) mit produktiven Veränderungen der Gefäßwand (Atherosklerose)

autologe Transplantation

Transplantation, bei der dem Patienten selbst Knochenmark oder Stammzellen für eine spätere Transplantation entnommen werden (Eigentransplantation)

benigne

gutartig

Blutserum

der flüssige, nach erfolgter Blutgerinnung verbleibende Teil des Blutes, im Gegensatz zum Blutplasma ohne Fibrinogen

CD 34-Antigen

ein Glykoprotein, das auf der Oberfläche von frühen hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen exprimiert wird; die Expression des CD 34-Antigens wird zum Nachweis, zur Isolation und Aufreinigung von Stammzellen genutzt; reife Zellen wie Erythrozyten oder Thrombozyten sowie fast alle soliden Tumoren sind CD34 negativ; mit Wachstumsfaktoren wie G-CSF oder einer Induktionstherapie können Ärzte CD34⁺- Zellen aus dem Knochenmark in die Blutbahn „locken“ (mobilisieren); über diesen Marker ist es möglich, Progenitorzellen mittels Leukapherese aus dem Blut des Patienten herauszufiltern

Chimäre

genetisches Individuum, das aus genetisch verschiedenen Geweben zusammengesetzt ist, z.B. als Folge einer Transplantation oder Mutation

Chimärismus

Zustand, in dem sich Chimären befinden

Durchflusszytometrie

kontinuierliche Messung zellulärer Parameter (Volumen, Fluoreszenz, Absorption) von Einzelzellen einer Zellsuspension, die durch eine Messeinrichtung strömt

Embolus

Blutgefäßpfropf; jedes Gebilde bzw. Material, das – durch die Blutbahn verschleppt – zum Verschluss eines Blutgefäßes (Arterie oder Vene) führt, z.B. Thrombusteile, Zellhaufen, Parasiten, Pilze, Bakterien, Fremdkörper, Fett, Luft etc.

Embolie

plötzlicher Verschluss eines Blutgefäßes (meist Arterie) durch einen Embolus

endothelial

zum Endothelium gehörend

Endothelium

das einschichtige Plattenepithel, das die Herzräume und die Blut- und Lymphgefäße auskleidet (als Epithel der serösen Häute der Körperhöhlen = Mesothel)

Enzym

Ferment; für den Stoffwechsel aller Organismen unentbehrliche Eiweißkörper, die als Biokatalysatoren die biochemischen Vorgänge durch Senkung der notwendigen Aktivierungsenergie ermöglichen, sie beschleunigen und in eine gewünschte Richtung ablaufen lassen, ohne selbst verändert zu werden

Erythrozyten

rote Blutkörperchen, die für den Sauerstofftransport im Blut zuständig sind

exprimieren

aus einer Zelle freisetzen

Faktor-VIII-Protein (FVIII)

antihämophiles Globulin A; ein relativ thermo- und lagerungsstabiler, in den Endothelzellen gebildeter Blutgerinnungsfaktor (ein 2-Globulin) im Blutplasma, der – durch Thrombin aktiviert – an der Bildung des endogenen Prothrombinumwandlungsfaktors teilnimmt; bei Mangel besteht Hämophilie A

feto-maternale Transfusion

ein Blutübertritt vom Fötus in den Kreislauf der Mutter; kann zu einer lebensgefährlichen Anämie des Kindes führen, aber auch zur Sensibilisierung der Mutter im Sinne einer Rhesusinkompatibilität

Fluoreszenz

physikalischer Begriff für die relativ rasch abklingende Lichtemission durch Atome oder Moleküle, die durch Absorption energiereicher Strahlen angeregt wurden

Hämatopoese

Blutbildung

hämatopoetische Stammzellen

Vorläuferzellen der Blutbildung im Knochenmark

hämolytisch

die Hämolyse betreffend oder bewirkend oder mit der Hämolyse einhergehend, durch sie bedingt

Hämolyse

die Auflösung (Zerstörung) der roten Blutkörperchen, und zwar innerhalb des Organismus (intra- bzw. extravasal) oder aber im Reagenzglas

Hashimoto-Thyreoiditis

Schilddrüsenentzündung, die nach ihrem Entdecker Hakaru Hashimoto benannt wurde

HLA (Human leukocyte antigen)

komplexes System von Gewebeantigenen (membranassoziierte Glykoproteine) des Menschen, die auf den Zellen fast aller Gewebe mit quantitativen Unterschieden vorkommen und sich besonders gut auf Leukozyten nachweisen lassen; die HLA-Antigene spielen eine wichtige physiologische Rolle bei immunologischen Abwehrmechanismen (Erkennung von „Selbst“ und „Nicht-Selbst“); HLA-Alloantigene können eine immunologische Abstoßungsreaktion beim Transplantatempfänger verursachen; vor jeder Transplantation erfolgt daher eine sog. „Gewebetypisierung“ von Spender und Empfänger zur Gewährleistung einer möglichst weitgehenden HLA-Kompatibilität

humoral

Antikörper vermittelte Immunantwort

Immunglobuline

Glykoproteine mit gemeinsamer Grundstruktur, die nach Kontakt des Organismus mit einem Antigen von B-Lymphozyten oder Plasmazellen gebildet werden und als Antikörper in Serum, Gewebeflüssigkeiten und Körpersekreten für die humorale Immunität wichtig sind (Ausnahme Paraproteine)

Immunität

die durch Immunisierung herbeigeführte und durch Auftreten spezifischer Antikörper (humorale Immunität) und Zellen (zellvermittelte Immunität) gekennzeichnete veränderte Reaktionsbereitschaft des Immunsystems gegenüber Antigenen (z.B. Viren, Bakterien, Fremdeiweiß)

Immunologie

Lehre von der Immunität und ihren Erscheinungsformen

Immunhämatologie

Lehre von der Immunität der Blutgruppensysteme

Immunogenität

die Fähigkeit eines Antigens, Immunität herbeizuführen

Immunreaktion

Abwehrreaktion des Körpers gegen „Eindringlinge“ wie Bakterien, Viren, Pilze, Fremdstoffe, aber auch fremde Zellen, Zellbestandteile und Gewebe

Infektion

Eindringen von Mikroorganismen (z.B. Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten) in einen Makroorganismus (z.B. Mensch), wo sie haften bleiben und sich vermehren

Insulin

in den Beta-Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas gebildetes blutzuckersenkendes und Glykogen aufbauendes Hormon, das die normalen Blutzuckerkonzentrationen von ca. 70-115 mg/dl bewirkt

Insulinproduzierende B-Zellen

Beta-Zellen, eine Zellgruppe im Inselorgan des Pankreas; mit Körnchen („Beta-Granula“) im Zellelieb, die sich mit Chromhämatoxylin spezifisch blau färben und Zink enthalten; sie bilden das Hormon Insulin

Isoantigen

Alloantigen, d.h. ein arteigenes (von der gleichen Spezies, z. B. Mensch stammendes), aber körperfremdes (d.h. von einem anderen Individuum) Antigen, das zur Bildung von Isoantikörpern führen kann

KIR

Oberflächen-Rezeptoren von Natürlichen Killerzellen („Killer cell immunoglobulin-like receptors“) und T-Zellen

Leukämie

Sammelbegriff für maligne Entartung und Reifungsstörungen weißer Blutzellen (Leukozyten) mit Auftreten unreifer, von der Norm morphologisch und biochemisch unterscheidbarer Zelltypen, v.a. in Blut und Organen der Blutbildung, wobei die Krankheitserscheinungen allmählich durch Verdrängung normaler Blutzellen und Infiltration atypischer Zellen in Organe entstehen: Anämie, Blutungen (v. a. infolge Thrombozyten-Mangels), Infektionen (durch Abwehrschwäche), Reizerscheinungen, Vergrößerung und Funktionsminderung befallener Organe

Leukozyten

weiße Blutkörperchen, deren Hauptaufgabe in der Abwehr von Krankheitserregern besteht

Lymphozyten

Untergruppe der weißen Blutkörperchen, die bei der Abwehr von Krankheiten und Fremdstoffen mitwirken

maligne

bösartig

Mamma-Karzinom

unter Brustkrebs, auch Mammakarzinom genannt, versteht man einen bösartigen Tumor der Brust. Die gesunde weibliche Brustdrüse (Mamma) besteht aus Drüsengewebe, Fett und Bindegewebe. Das Drüsengewebe ist aus Drüsenläppchen (Lobuli) aufgebaut. Sie produzieren die Muttermilch und münden in kleine Kanäle (Ductus). Die Kanäle verbinden sich zu großen Ausgängen und führen zur Brustwarze.

mesenchymal

zum Mesenchym gehörend; d.h. ein nicht-epitheliales Gewebe des Keimes mit Ursprung größtenteils aus dem Mesoderm

multizentrische Studie

klinische Studie, die an verschiedenen Kliniken parallel durchgeführt wird

myeloisch

die normalerweise im Knochenmark erfolgende Bildung von Granulozyten betreffend

Nabelschnurblut

siehe Plazentarestblut

Natürliche Killerzellen (NK)

Lymphozyten mit zytotoxischer Aktivität, produzieren Zytokine und Chemokine; natürliche Killerzellen stellen die erste „Welle“ der körpereigenen humanabwehr von virusinfizierten Zellen und Krebszellen dar

Nukleinsäuren

DNA und RNA, also das Erbgut aller Zellen und Viren, besteht aus Nukleinsäuren

Pathomechanismus

der Wirkungszusammenhang einer Krankheit auf zellulärer Ebene

Pathophysiologie

Lehre von den krankhaft gestörten Lebensvorgängen und deren Entstehung

Phänotyp

physische Ausprägung eines genetischen Merkmals

photochemisch

eine chemische Reaktion, die ihre Aktivierungsenergie aus Bestrahlung mit Licht, in der Regel UV-Licht, bezieht; dies ermöglicht im Labor ihre gezielte Aktivierung

Plattenepithelkarzinom

Tumor der Epidermis oder bestimmter Schleimhäute

Plazentarestblut

Nabelschnurblut; Plazentarestblut ist reich an Stammzellen, könnte zukünftig zu einer wichtigen Quelle von Stammzellen für die Therapie werden

Polymorphismus

natürlich vorkommende Varianten bestimmter Gene

Protozoen

einzellige Eukaryonten (= höhere Lebewesen); viele Parasiten, wie der Malariaerregger Plasmodium, sind Protozoen

rekombinant

genetisch verändert

Retroviren

Viren, deren Genom nicht von einem DNA-, sondern von einem RNA-Strang codiert wird, der in der Wirtszelle von einem viruseigenen Enzym, der Reversen Transkriptase, in DNA übertragen wird

Rezidiv

Rückfall, Wiederauftreten einer Krankheit nach ihrer völligen Abheilung

RHD-Allele

verschiedene Ausprägungen des Genorts, an dem der Rhesus-Faktor der Blutgruppe D codiert ist

Rhesusfaktor

erbliche Blutgruppeneigenschaft der Erythrozyten

serologisch

das Blutplasma betreffend

Stammzellen

im Zellspeicher „Knochenmark“ befindliche Blutstammzellen; etwa die Hälfte der aus Zellteilungen hervorgehenden Zellen bleiben weiterhin undifferenziert (pluripotente Stammzellen), die restlichen Zellen sind bereits in Vorstufen differenziert (determinierte Stammzellen)

subkutan

unter der Haut

Substitution

Ersatz

Thrombembolie

Embolie durch einen in den Kreislauf verschleppten Thrombus; die Folgen hängen von der Embolusgröße, der Weite und Funktion des verstopften Blutgefäßes und dem Zustand des Gesamtkreislaufes ab

Thrombus

im Kreislauf entstehender Blutpfropf in Arterien oder Venen

Transdifferenzierung

Stammzellen erlangen durch Transdifferenzierung Eigenschaften, die sich nicht auf ihre gewebespezifische Funktion beschränken

Transformation

Einführen von fremder Erbinformation in Zellen

transfundierte

durch Transfusion übertragen

Transfusionsmedizin

die Transfusionsmedizin umfasst das Gewinnen, Herstellen, Lagern, Abgeben oder in Verkehr bringen von Blut, Blutbestandteilen oder Blutprodukten. Sie befasst sich mit der Durchführung von blutgruppen-serologischen und anderen transfusionsrelevanten Untersuchungen. Die Anwendung von Blutprodukten (Hämotherapie) sowie die entsprechende Nachsorge als integrale Aufgabe der Transfusionsmedizin unterstreicht ihren Stellenwert als klinische Disziplin. Zu der Transfusionsmedizin im weiteren Sinne gehören auch die Transplantationsimmunologie und die Hämostaseologie.

Zellsuspension

unter bestimmten Bedingungen (menschliche Zellen wachsen normalerweise nur im Zellverband oder auf bestimmten Oberflächen) gelingender Vorgang, bei dem Zellen in Schüttelkultur gezogen werden, was verschiedene biochemische Verfahren erleichtert

Quelle: Lexikon Medizin, Urban & Schwarzenberg

Impressum

Impressum

Herausgeber:
**DRK-Blutspendedienst Baden-
Württemberg – Hessen gGmbH**

Friedrich-Ebert Straße 107
68167 Mannheim

Redaktion:

Institut für Transfusionsmedizin und
Immunhämatologie Frankfurt

DRK-Blutspendedienst Baden-
Württemberg – Hessen gGmbH
Sandhofstraße 1
60528 Frankfurt am Main

PD Dr. Johannes Oldenburg
Prof. Dr. Erhard Seifried
(Wissenschaftliche Verantwortung und
fachredaktionelle Leitung)

Leipziger & Partner Public Relations GmbH
Schmidtstraße 12
60326 Frankfurt am Main

Dr. Berend von Thülen
(Redaktionelle Leitung)

Dr. Marion Bastian

Dr. Corinna Volz-Zang

Sylvia Ludewig

Grafik & Layout

VK&K Werbeagentur GmbH & Co KG
Schmidtstraße 12
60326 Frankfurt am Main

Ute Wolff

Druck

Druckerei Kuthal
Johann-Dahlem-Straße 54
63814 Mainaschaff

Titelbild

Die Blutzellen des Menschen -
Erythrozyten (rot), Leukozyten
(gelb) und Thrombozyten (grün) -
(Am Computer nachkolorierte
rasterelektronenmikroskopische
Aufnahme)

Aufnahme:
Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie
Tübingen, Jürgen Berger