

Abteilung für Transfusionsmedizin

■ Direktor: Prof. Dr. med. Rainer Blasczyk

Forschungsprofil

Am Institut für Transfusionsmedizin bestehen die Forschungsschwerpunkte molekulare Immungenetik, molekulare Immunhämatologie, Zelltherapie und Zytapheresetechniken. Die Schwerpunkte molekulare Immungenetik und Zelltherapie befassen sich mit der in der allogenen Stammzelltransplantation und Zell-basierten regenerativen Medizin zentralen Fragestellung, wie die unerwünschten Graft versus Host und Host versus Graft Reaktionen (GvHR und HvGR) abgeschwächt werden können und wie die in der allogenen Immuntherapie erwünschte Graft versus Leukemia Reaktion (GvLR) selektiv genutzt werden kann. In mehreren Projekten werden daher auf genomischer und proteomischer Ebene sowohl MHC als auch MHC-vermittelte non-MHC Effekte untersucht sowie Strategien zur Toleranzinduktion für Zell-basierte regenerativen Therapien entwickelt. Zudem werden gentechnische Stammzellmodifikationen untersucht, um über eine in vivo Selektion dieser Zellen das Engraftment zu fördern. Der Schwerpunkt Molekulare Immunhämatologie befasst sich mit erythrozytär exprimierten Proteinen in diagnostisch und therapeutisch relevanten Fragestellungen. Ziele der Projekte in diesem Schwerpunkt konzentrieren sich auf genomische Charakterisierungen und Profiling erythrozytär exprimierter Gene, die Charakterisierung und Beeinflussung der erythrozytären Protein-Expression sowie die gentechnische Herstellung rekombinanter Designer-Proteine für diagnostische und therapeutische Zwecke. Zytaphereseverfahren kommen bei der Bereitstellung definierter Zielzellen (Granulozyten, Stammzellen, Thrombozyten) zum Einsatz. Im Rahmen klinischer Studien wird untersucht, inwieweit der Zellertrag dieser Verfahren für Granulozyten, Stammzellen und Thrombozyten bei gleichzeitiger Verminderung der Belastungen für die gesunden Blutspender gesteigert werden kann. Die Untersuchungen in diesem Schwerpunkt werden in industriellen Kooperationsprojekten durchgeführt.

Forschungsprojekte

Reduktion der Immunogenität zellulärer Therapeutika durch HLA silencing

Der Zell- und Organersatz stellt eine potentiell kurative Therapieform zahlreicher konventionell nicht heilbarer Erkrankungen dar. In der regenerativen Medizin können zelluläre Therapeutika entweder aus autologem oder als Fertigarzneimittel aus allogenen Zellmaterial generiert werden. Dabei ist die Standardisierbarkeit als eine unabdingbare Voraussetzung für die breite Anwendung einer stammzellbasierten Therapie ein bedeutsamer Vorteil der Therapeutika allogenen Ursprungs. Allerdings stellt die Histokompatibilität die Hauptbarriere

für die Anwendung dieser zellulären Therapeutika dar. Die Entwicklung von Ersatzgewebe mit geringer oder fehlender Immunogenität ist daher besonders wünschenswert. Wie bei der konventionellen Organtransplantation stellen die Humanen Leukozyten Antigene (HLA) mit ihrem ausgeprägten Polymorphismus die immunologische Hauptbarriere einer auf allogenen Zellen basierenden regenerativen Medizin dar. Die Herabregulierung der HLA Expression in zellulären Therapeutika würde über die Induktion einer immunologischen Toleranz das Risiko einer Abstoßungsreaktion vermindern und damit den regenerativen Prozess unterstützen.

Die Technologie der RNA Interferenz bietet die Möglichkeit, die Expression von Genen spezifisch zu supprimieren. Die Konstruktion von Plasmiden, die durch die Expression von short hair-pin RNAs (shRNAs) eine RNA Interferenz triggern können, eröffnen dabei die Perspektive einer stabilen RNA Interferenz basierten Gentherapie mit viralen Vektoren. Die selektive Inaktivierung von HLA-Genen oder Gengruppen würde daher einen universelleren Einsatz allogener Zelltherapeutika ermöglichen.

Das Ziel dieses Projektes ist die Entwicklung einer Strategie für die selektive und dauerhafte Suppression von HLA oder HLA-Untergruppen in embryonalen und adulten Stammzellen sowie in gewebsspezifischen Vorläuferzellpopulationen, um eine Inaktivierung der allogenen Immunantwort zu erreichen. Dazu werden klassen-, gen- und allelspezifische RNA Interferenz-Strategien für die Suppression von HLA Klasse I und II Proteinen verwendet. Im Rahmen der bisherigen Untersuchungen zur Suppression von HLA konnte gezeigt werden, dass eine klassen-, gen-, und allelspezifische Inhibierung der HLA Expression möglich ist. Dabei dienen β 2-Mikroglobulin oder die schwere Kette von HLA als Zielstrukturen der RNA Interferenz. Durch ein umfangreiches Screening im In vitro-Transkriptions/Translations-System wurden sensitive Sequenzen in den RNAs beider Proteine identifiziert und deren Effizienz in humanen Zelllinien validiert. Für eine dauerhafte Reduktion der HLA Expression wurden shRNAs kodierende lentivirale Vektoren konstruiert. Die Transfektion der hämatopoetischen Zelllinien B-LCL und K562 mit β 2-Mikroglobulin-spezifischen synthetischen siRNAs ergab eine 50 %ige Suppression von HLA-A, -B und -C. Die Anwendung gen- und allelspezifischer siRNAs führte zu einer Reduktion der HLA-Expression von bis zu 70 % in humanen Zelllinien. Mit Hilfe lentiviraler Konstrukte konnte eine selektive und dauerhafte Unterdrückung der HLA-A-Expression von bis zu 60 % in hämatopoetischen Zelllinien erreicht werden, ohne dass relevante Nebeneffekte beobachtet wurden. Es konnte gezeigt werden, dass mit der RNA-Interferenz Technologie eine Suppression von 90 - 100 % auf mRNA- und Proteinebene, d.h. bis unter die Nachweisgrenze, erzielt werden kann. Es konnte zudem jetzt gezeigt werden, dass bereits eine Reduktion der HLA-Klasse I Expression um 70 % die Antikörper vermittelte Zytotoxizität aufheben kann.

Langfristiges Ziel ist es, ein GMP-gerechtes gentherapeutisches Konzept zur selektiven Abschaltung non-permissiver HLA Merkmale für den allogenen Zellersatz und regenerative Konzepte zu etablieren. Es sollen lentivirale Vektorsysteme für eine effektive Transduktion und durch variable Pseudotypisierung Zell-selektive Transduktion von HLA-spezifischen shRNAs in humane Zellen konstruiert werden. Zur protektiven Rekonstituierung der HLA

Expression sollen regulatorische Promotoren geprüft werden. Um einer NK-Zell vermittelten Zellyse entgegenzuwirken, werden NK-Zell protektive gentechnische Modifikationen geprüft. Dies beinhaltet die Prüfung der Effizienz von co-transduzierten HLA-G Varianten sowie HLA-Designerproteinen, die durch fusionierte, autologe Peptidfragmente funktionell so inaktiviert worden sind, dass eine allogene Peptid-präsentation blockiert wird. Dadurch kann eine Tolerisierung sowohl für autoreaktive NK-Zellen als auch alloreaktive T-Zellen erreicht werden. Im Anschluß an in vitro Studien soll die Strategie des HLA silencing auch im allogenen Mausmodell evaluiert werden.

■ Mitarbeiter: Figueiredo C, Seltsam A, Horn P, Blasczyk R; Förderung: Portugiesische Forschungsgemeinschaft

Weitere Forschungsprojekte

1. Molekulare Immungenetik und Zelltherapie

Allelspezifische Peptidmotive und T Zellepitope bei molekulargenetisch definierten HLA Klasse I Variationen

■ Projektleiterin: B. Eiz-Vesper; Förderung: Stiftung

Expansion Minor Histokompatibilitäts-Antigen-spezifischer T Zellen für die adoptive Immuntherapie

■ Projektleiterin: B. Eiz-Vesper; Förderung: BMBF/Industrie

Untersuchungen zu Peptiden aus polymorphen endogenen Proteinen als Minor Histokompatibilitäts-Antigen-Kandidaten in der allogenen Stammzelltransplantation

■ Projektleiterin: B. Eiz-Vesper; Förderung: BMBF/Industrie

Systematische Charakterisierung der Allogenenität von HLA Klasse I Mismatches im artifi-ziell allogenen System

■ Projektleiter: R. Blasczyk; Förderung: Stiftung

Posttranskriptionelle Suppression von HLA Genen

■ Projektleiterin: C. S. Ferreira de Figueiredo; Förderung: Portugiesische Forschungsgemeinschaft

Entwicklung eines Verfahrens zur diagnostischen Sequenzierung der für Transplantationen relevanten HLA Genorte

■ Projektleiter: R. Blasczyk; Förderung: BMWA

In vitro and in vivo safety and efficacy assessment of foamyviral vectors for transduction of hematopoietic stem cells in a nonhuman primate model

■ Projektleiter: P. Horn; Förderung: DFG

2. Molekulare Immunhämatologie

Konstruktion rekombinanter Blutgruppenantigene zur Antikörperdiagnostik bei polytransfunden Patienten

■ Projektleiter: A. Seltsam; Förderung: beantragt

Untersuchungen zu Sequenzvariationen am JMH Gen und deren Auswirkung auf das Expressionsprofil des JMH-Antigens

■ Projektleiter: A. Seltsam; Förderung: Stiftung

3. Arzneimittelherstellung

Etablierung der Thrombozytendreifachspende auf verschiedenen Zellseparatoren (Gambro, Fresenius)

■ Projektleiter: H.-G. Heuft; Förderung: Industrie

Mobilisation gesunder Spender mit rhuG-CSF zur Herstellung von Granulozytenkonzentraten

■ Projektleiter: H.-G. Heuft; Förderung: Industrie

Steigerung der Sammeleffizienz im Rahmen der Thrombozytapherese durch Berücksichtigung thrombozytenspezifischer Marker

■ Projektleiter: H.-G. Heuft; Förderung: Industrie

Originalpublikationen

Banks J, Poole J, Ahrens N, **Seltsam A**, Salama A, Hue-Roye K, Storry JR, Palacajornsuk P, Ma BW, Lublin DM, Reid ME. SERF: a new antigen in the Cromer blood group system. *Transfus Med.* 2004;14: 313-8.

Bade-Doeding C, Eiz-Vesper B, Figueiredo C, Seltsam A, Elsner HA, Blasczyk R. Peptide-binding Motif of HLA-

A*6603. *Immunogenetics* 2004 Dec 8 [Epub ahead of print]

Bade-Doeding C, Elsner HA, Eiz-Vesper B, Seltsam A, Holtkamp U, Blasczyk R. A single amino acid polymorphism in pocket A of A*6602 alters the auxiliary anchors compared to A*6601 ligands. *Immunogenetics* 2004; 56: 83-8.

Becker T, Jüttner B, **Elsner HA**, Meyer zu Vilsendorf A, Bornscheuer A, Nashan B, Brandl M, Klempnauer J, Piepenbrock S, Scheinichen D. Platelet P-selectin and GPIIb/IIIa expression after liver transplantation and resection. *Transpl Int.* 2004; 17: 442-8.

Elsner HA, Blasczyk R. The phylogenies of introns 4-7 demonstrate an inconsistent pattern between human leukocyte antigen-C group topologies. *Tissue Antigens* 2004; 63: 109-121.

Elsner HA, Blasczyk R. Diagnostische und immuntherapeutische Perspektiven für die allogene Blutstammzelltransplantation. *Med Welt* 2004; 55: 54-8.

Elsner HA, DeLuca D, Strub J, Blasczyk R. HistoCheck: Rating of HLA class I and II mismatches by an internet-based software tool. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 165-169.

Heuft HG, Goudeva L, Blasczyk R. A comparative study of adverse reactions occurring after administration of glycosylated granulocyte colony stimulating factor and/or dexamethasone for mobilization of neutrophils in healthy donors. *Ann Hematol* 2004; 83: 279-85.

Heuft HG, Goudeva L, Schwella N, Blasczyk R. Collection of two consecutive neutrophil concentrates for transfusion from donors mobilized with glycosylated G-CSF plus dexamethasone. *Transfusion* 2004; 44: 750-7.

Horn PA, Keyser KA, Peterson LJ, Neff T, Thomasson BM, Thompson J, Kiem HP. Efficient lentiviral gene transfer to canine

repopulating cells using an overnight transduction protocol. *Blood.* 2004;103:3710-6.

Jüttner B, Kuse ER, **Elsner HA**, Heine J, Jaeger K, Piepenbrock S, Scheinichen D. Differential platelet receptor expression following hydroxyethyl starch infusion in thrombocytopaenic orthotopic liver transplantation recipients. *Eur J Anaesthesiol* 2004; 21: 309-313.

Khattab B, Eiz-Vesper B, Ganser A, Herstenstein B, Blasczyk R. Presentation assessment of minor histocompatibility antigens by predictive proteasomal cleavage analysis. *Ann Hematol* 2004; 83: 107-13.

Kiem HP, Sellers S, Thomasson B, Morris JC, Tisdale JF, **Horn PA**, Hematti P, Adler R, Kuramoto K, Calmels B, Bonifacino A, Hu J, von Kalle C, Schmidt M, Sorrentino B, Nienhuis A, Blau CA, Andrews RG, Donahue RE, Dunbar CE. Long-term clinical and molecular follow-up of large animals receiving retrovirally transduced stem and progenitor cells: no progression to clonal hematopoiesis or leukemia. *Mol Ther.* 2004;9:389-95.

Kracht T, Schrappe M, Strehl S, Reiter A, **Elsner HA**, Trka J, Cario G, Viehmann S, Harbott J, Borkhardt A, Metzler M, Langer T, Repp R, Marschalek R, Welte K, Haas OA, Stanulla M. NQO1 C609T polymorphism in distinct entities of pediatric hematologic neoplasms. *Haematologica.* 2004;89:1492-7.

Neff T, Peterson LJ, Morris JC, Thompson J, Zhang X, **Horn PA**, Thomasson BM, Kiem HP. Efficient gene transfer to hematopoietic repopulating cells using concentrated RD114-pseudotype vectors produced by human packaging cells. *Mol Ther.* 2004;9:157-9.

Scheinichen D, **Elsner HA**, Osorio R, Juettner B, Groeschel W, Jaeger K, Piepenbrock S. Lack of influence of COX inhibitors metazolol and diclofenac on platelet GPIIb/IIIa and P-selectin expression in vitro. *BMC Anesthesiol* 2004; 4: 4.

Scheinichen D, **Heuft HG**, Renken C, Jüttner B, Jaeger K, Schürholz T, **Blasczyk R**, Piepenbrock S, **Elsner HA**. Impact of tobacco smoking on platelet function in apheresis products in vitro. *Vox sang* 2004; 86: 252-6.

Schroeder M, **Elsner HA**, Kim TD, **Blasczyk R**. Eight novel MICB alleles, including a null allele, identified in gastric MALT lymphoma patients. *Tissue Antigens* 2004; 64: 276-80.

Skutek M, **Elsner HA**, **Slateva K**, Mayr HO, Weig TG, van Griensven M, Bosch U. Screening for arthrofibrosis after anterior cruciate ligament reconstruction: Analysis of association with human leukocyte antigen. *Arthroscopy* 2004; 20: 469-73.

Wieding JU, Kosterling H, **Peine S**, Wermes C, Mestres P, Wenzel E. Platelet retention test Homburg (RTH) and drug monitoring of platelet adhesive properties of von Willebrand factor. *Hämostaseologie* 2004; 24: 217-20.

Übersichten

Elsner HA, **Blasczyk R**. Diagnostische und immuntherapeutische Perspektiven für die allogene Blutstammzelltransplantation. *Med Welt* 2004; 5: 54-58.

Elsner HA, **Blasczyk R**. Immunogenetics of HLA null alleles: Implications for blood

stem cell transplantation. *Tissue Antigens*, *Tissue Antigens*. 2004; 64: 687-695.

Horn PA, Morris JC, Neff T, Kiem HP. Stem cell gene transfer-efficacy and safety in large animal studies. *Mol Ther*. 2004;10:417-31.

Buchbeiträge

Elsner HA, **Seltsam A**, **Blasczyk R**, **Heuft HG**. Grundlagen der Transfusionsmedizin. In: Pichlmayr I, Jaeger K (Hrsgb.). *Kompendium Anästhesiologie*. Abschnitt III-7.2. Ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg/Lech, 2004.

Abstracts

2004 wurden 28 Abstracts publiziert.

Wissenschaftspreise

Figueiredo C, Seltsam A, Holtkamp U, R. Blasczyk R.: Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie; Stable knock down of non-acceptable HLA mismatches in solid organ transplantation.

Figueiredo C, Seltsam A, Holtkamp U, R. Blasczyk R.: Abstractpreis der Deutschen Gesellschaft für Immunogenetik; Stable knock down of non-acceptable HLA mismatches in solid organ transplantation.

Patente

PCT/DE2004/000956; Verbindungen und Verfahren zur Immunsuppression, Blasczyk R, Ferreira de Figueiredo C, Seltsam A.

Weitere Tätigkeiten in der Forschung

Prof. Dr. R. Blasczyk: Fachgutachter des Institut national de la santé et de la recher-

che médical (Inserm, Frankreich), Mitglied des wissenschaftlichen Beirats der Cytonet Hannover GmbH, Mitglied des wissenschaftlichen Beirats der Cytonet GmbH & Co KG, Mitglied des wissenschaftlichen Beirats von „Transfusion Medicine and Hemotherapy.

Prof. Dr. A. Seltsam: Gutachter für die Zeitschriften Blood, Transfusion und BMC Genetics.

Dr. P. Horn: Fachgutachter für die Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy (FACT, Nebraska, USA).