

Aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Pathologie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Neonatale Alloimmunthrombozytopenie:**

**Die Entwicklung von rekombinanten  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Integrin Isoformen (HPA-1 Antigene)**

**und funktionelle Untersuchung einer seltenen Punktmutation auf  $\beta_3$ -Integrins**

**(Oe<sup>a</sup>-Antigen)**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Abdul Rahman**

Gießen 2003

Aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. G. Bein

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Pathologie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. M. Reinacher

**Neonatale Alloimmunthrombozytopenie:**

**Die Entwicklung von rekombinanten  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Integrin Isoformen (HPA-1 Antigene)**

**und funktionelle Untersuchung einer seltenen Punktmutation auf  $\beta_3$ -Integrins**

**(Oe<sup>a</sup>-Antigen)**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Abdul Rahman**

Tierarzt aus Selayar (Indonesien)

Gießen 2003

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Bein
2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Reinacher

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Februar 2003

Buat Ibunda,  
isteri tercinta Asmarinah  
dan tersayang  
Muthia, Aisyah dan Hafiz.  
Dengan dukungan mereka  
Dissertasi ini dapat diselesaikan.

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Literaturübersicht.....	4
2.1 Thrombozyten.....	4
2.1.1 Morphologie der Thrombozyten.....	4
2.1.2 Funktion der Thrombozyten.....	4
2.1.3 Thrombozytopenie.....	7
2.1.4 Thrombozytäre Alloantigene .....	8
2.1.5 Molekulargenetische Untersuchungsmethoden an Thrombozyten.....	14
2.2 Integrine.....	15
2.2.1 Struktur.....	16
2.2.2 Liganden.....	18
2.2.3 $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Integrin.....	18
2.2.3.1 Struktur.....	19
2.2.3.2 Funktion.....	22
2.2.3.3 Expression.....	25
2.2.3.4 Defekt.....	28
2.2.3.5 Allele.....	30
2.3 Neonatale Alloimmunthrombozytopenie.....	33
2.3.1 Neonatale Alloimmunthrombozytopenie beim Menschen.....	33
2.3.1.1 Pathogenese.....	33
2.3.1.2 Vorkommen und Häufigkeit.....	34
2.3.1.3 Klinik.....	34
2.3.1.4 Diagnose.....	36
2.3.1.5 Therapie.....	37
2.3.2 Neonatale Alloimmunthrombozytopenie beim Tier.....	38
2.3.2.1 Pathogenese.....	38
2.3.2.2 Vorkommen und Häufigkeit.....	40
2.3.2.3 Diagnose.....	42
2.3.2.4 Therapie.....	43

3. Material und Methoden .....	44
3.1 Material.....	44
3.1.1 Geräte.....	44
3.1.2 Kleinmaterial.....	44
3.1.3 Chemikalien und Biochemikalien.....	45
3.1.4 Monoklonale Antikörpern.....	46
3.1.5 Stabile HPA-1a- und HPA-1b-Zelllinien.....	46
3.1.6 Allelspezifische GPIIb- und GPIIIa-Konstrukte .....	46
3.2 Methoden.....	47
3.2.1 Kultuvierung der Zelllinien .....	47
3.2.2 Auftauen der Zellen.....	48
3.2.3 Splitten der Zellen.....	48
3.2.4 Einfriermedium.....	48
3.2.5 Einfrieren der Zellen.....	49
3.2.6 Transfektion von CHO-Zellen.....	49
3.2.7 Selektion der transfizierten CHO-Zellen.....	51
3.2.8 Selektion durch Antibiotika-Zugabe.....	51
3.2.9 Klonierung der transfizierten CHO-Zellen.....	51
3.2.10 Überprüfen der stabilen Transfektanten mit spezifischen Humansera.....	52
3.2.11 Fixieren der Zellen.....	52
3.2.12 Durchflußzytometrie.....	53
3.2.13 Adhäsionstest.....	54
3.2.14 Tyrosinphosphorylierung der PP125 <sup>FAK</sup> .....	54
4. Ergebnisse.....	56
4.1 Etablierung von stabilen HPA-1a und HPA-1b Transfektanten.....	56
4.1.1 Stabile Expression in CHO-Zellen.....	57
4.1.1.1 Nachweis der Expression von GPIIb/IIIa auf der Zelloberfläche.....	57
4.1.2 Klonierung der Transfektantenzellen.....	58
4.1.2.1 Nachweis der stabilen Expression von GPIIb/IIIa nach der Klonierung.....	59
4.1.2.2 Überprüfen der stabilen GPIIb/IIIa-Transfektanten mit Humansera.....	59
4.1.2.2.1 Versuche vor der Absorption.....	60

A. HPA-1a Transfektanzellen .....	60
B. HPA-1b Transfektanzellen.....	62
4.1.2.2.2 Versuche nach Absorption.....	63
A. HPA-1a Transfektanzellen.....	63
B. HPA-1b Transfektanzellen.....	64
4.2. Funktionelle Bedeutung von stabilen Transfektanten Oe <sup>a</sup> .....	65
4.2.1 HPA-1a/Oe <sup>a</sup> (+) Transfektanzellen.....	66
A. Die Reaktion von HPA-1a/Oe <sup>a</sup> (+) Transfektanzellen mit dem mAk Gi5.....	66
B. Die Reaktion von HPA-1a/Oe <sup>a</sup> (+) Transfektanzellen mit anti-HPA-1a.....	66
C. Die Reaktion von HPA-1a/Oe <sup>a</sup> (+) Transfektanzellen mit anti- Oe <sup>a</sup> .....	67
4.2.2 Funktion der rekombinanten GPIIb/IIIa-Komplex Oe <sup>a</sup> .....	68
4.2.2.1 Aktivierbarkeit der rekombinanten Oe <sup>a</sup> -Allele von GPIIb/IIIa Isoformen.....	68
4.2.2.2 Einfluß der Lys611-Deletion auf die Signaltransduktion des GPIIb/IIIa-Komplexes..	74
5. Diskussion.....	73
6. Zusammenfassung.....	78
7. Summary.....	79
8. Abkürzungen.....	80
9. Literaturverzeichnis.....	81
10. Anhang.....	97
10.1 Abbildungsverzeichnis.....	97
10.2 Tabellenverzeichnis.....	99

## 1. Einleitung

Thrombozyten spielen eine zentrale Rolle in der Physiologie der primären Blutstillung und bei pathophysiologischen Vorgängen der arteriellen Thrombose. Thrombozyten besitzen auf der Zelloberfläche eine Vielzahl von Glykoproteinen (GP), welche unter anderem die Adhäsion an extrazelluläre Matrixbestandteile und andere Zellen vermitteln. Die Glykoproteine dienen nicht nur als Adhäsionsrezeptoren, sondern tragen polymorphe Strukturen, welche als immunologische Ziele (Antigene) erkannt werden können. Diese Plättchenalloantigene sind von klinischer Bedeutung, da Immunisierung gegen Antigene zur Produktion von Alloantikörpern führen können. Die Alloantikörper führen zu einem gesteigerten Abbau der Thrombozyten und zu Thrombozytopenien bei drei pathophysiologischen Zuständen: posttransfusionelle Purpura (PTP), neonatale Alloimmunthrombozytopenie (NAIT) und posttransfusioneller Refraktärzustand.

Neonatale Alloimmunthrombozytopenie (NAIT) werden beim Fetus und bei Neugeborenen beobachtet. Mütter können während der Schwangerschaft, wenn das Kind ein der Mutter fehlendes thrombozytäres Antigen von seinem Vater geerbt hat, gegen dieses immunisiert werden. Die von der Mutter gebildeten Immunglobulin G (IgG)-Antikörper (Alloantikörper) passieren die Placenta, gelangen in den fetalen Kreislauf und führen zu einer beschleunigten Elimination kindlicher Blutplättchen.

Ein ähnliches Krankheitsbild ist bei Tieren auch beschrieben. Die Mutter wird gegen paternale Thrombozytenantigene immunisiert, indem in der späten Trächtigkeit oder unter der Geburt fetale Thrombozyten durch Schädigung fetaler Gefäße in den maternalen Kreislauf gelangen. Bei erneuten Trächtigkeiten nach Anpaarung derselben Elterntiere steigen die maternalen Antikörper gegen fetale Trombozyten an, so dass das Krankheitsbild frühestens



ab dem zweiten Wurf in Erscheinung tritt. Schweine und Pferde besitzen eine Plazenta epitheliochorialis, bei der eine diaplazentare Antikörperübertragung nicht möglich ist. Die Feten werden gesund geboren und haben vor der Kolostrumaufnahme normale Thrombozytenzahlen. Entscheidend für die Ausbildung einer NAIT ist hier die Aufnahme von Thrombozytenalloantikörpern der Klasse IgG mit dem Kolostrum während der ersten 48 h. Die Diagnose im Fall der NAIT des Quarter-Horse-Fohlens erfolgte durch den Nachweis von Immunglobulinen der Klasse IgG in Plasma, Serum und Milch der Mutter. Die Alloantikörper reagierten mit Thrombozyten des erkrankten Fohlens und seines um ein Jahr älteren Vollbruder, nicht aber mit Thrombozyten von Kontrolltieren.

Bei Menschen wurden fünf häufige Alloantigensysteme und elf seltene Antigene beschrieben, die auf den fünf Plättchenmembranglykoproteinen GPIa, GPIb<sub>α</sub>, GPIb<sub>β</sub>, GPIIb und GPIIIa lokalisiert werden konnten.

Wichtige Alloantigensysteme sind auf GPIIb/IIIa lokalisiert, die bei der primären Hämostase durch Bindung an Fibrinogen zur Vernetzung und Aggregation der Thrombozyten führt.

Durch molekulargenetische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass alle bisher bekannten Alloantigendeterminanten durch einzelne Basenaustausche entstanden sind, die zu einem Transfer der zugehörigen Aminosäure führten. Der Wechsel einer Aminosäure bedingt eine Konformationsänderung in der dreidimensionalen Struktur des thrombozytären Glykoproteins. Dadurch kann eine alloantigene Determinante entstehen, die von T- und B-Lymphozyten erkannt wird.

Während der letzten Jahre wurden große Fortschritte bei der Charakterisierung der thrombozytären Alloantigene erzielt. Neben serologischen Methoden, wie zum Beispiel dem MAIPA-Assay (*monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens*) benutzte man auch immunchemische Verfahren, um die Lokalisation der Alloantigene zuordnen zu

können. Ferner ermöglichte die *Polymerase-Chain-Reaction*-Technik molekulargenetische Untersuchungen an den kernlosen Thrombozyten, wobei die plättchenspezifische mRNA amplifiziert und auf molekularer Ebene charakterisiert wurde.

Basierend auf den molekulargenetischen Erkenntnissen über Plättchenantigene konnte eine Vielzahl an Verfahren zur Genotypisierung der DNA entwickelt werden, mit denen Typisierungen mit geringem technischen und personellen Aufwand selbst bei niedriger Thrombozytenzahl möglich sind.

Obwohl so die Typisierung thrombozytärer Alloantigene vereinfacht wurde, ist die diagnostische Methode zur Detektion der thrombozytären Alloantikörper noch mit vielen Schwierigkeiten verbunden. Für die Antikörperdetektion wird ein Panel von bekannten Antigenmustern aus Blutspendern benötigt. Für die seltenen Alloantigenen sind Blutspender nicht immer verfügbar. Die Herstellung von rekombinanten Antigenen könnten in der Zukunft dieses Problem lösen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen in stabilen Zelllinien die humanen Alloantigene HPA-1a und HPA-1b etabliert werden. Solche Zelllinien sollen als Thrombozytenersatz für die serologische Diagnostik der thrombozytären Alloantikörper eingesetzt werden.

Darüberhinaus soll die Funktion eines neuen Alloantigens Oe<sup>a</sup> auf Thrombozyten mit Hilfe von molekularbiologischen und zellbiologischen Methoden aufgeklärt werden.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1. Thrombozyten

#### 2.1.1. Morphologie der Thrombozyten

Die im Blut zirkulierenden humanen Thrombozyten werden im Knochenmark aus Megakaryozyten gebildet. Etwa 65-90 % der normalen Thrombozyten im peripheren Blut sind zwei bis vier  $\mu\text{m}$  große Gebilde von diskoider Form, deren Zahl im strömenden Blut zwischen 150000-300000/ $\mu\text{l}$  liegt. Der Rest zeigt mehr oder weniger ausgeprägte Pseudopodien als Zeichen einer Aktivierung. Blutplättchen sind von einer Lipiddoppelmembran umgeben, in die mehr als 100 verschiedene Glykoproteine eingebaut sind. Bis heute ist nur ein Teil ihrer Funktion bekannt. Etwa 70 % der Blutplättchen befinden sich im Blut, ca. 30 % werden in der Milz selektiv gespeichert. Plättchen altern in der Zirkulation und werden nach einer mittleren Lebensdauer von 7-12 Tagen durch das RES (retikuloendotheliales System) eliminiert (*mittlere Thrombozytenlebenszeit*).

Während niedere Wirbeltiere und Geflügel Thrombozyten mit Kernen besitzen, fehlt bei Säugern und Mensch der Zellkern (Übersicht bei Wicki et al., 1989).

#### 2.1.2. Funktion der Thrombozyten

Die wesentliche Funktion der Thrombozyten ist ihre Beteiligung an der Blutstillung. Der Prozeß der Blutstillung (Hämostase) wird durch Läsionen des Gefäßendothels ausgelöst und führt normalerweise zu einer Abdichtung des Defektes. Neben den Thrombozyten sind als weitere Funktionskomponenten die Gefäßwandaktionen und das plasmatische Gerinnungssystem beteiligt. Sobald es in einem Blutgefäß zu einer Läsion des Endothelüberzuges kommt, heften sich Plättchen an die kollagenen Bindegewebsfasern der

Wundränder (Plättchenadhäsion). Als Rezeptor für Kollagen fungiert auf den Thrombozyten der GPIa/IIa, GPVI Komplex. An das subendotheliale Fibronektin adhären Thrombozyten über den GPIc/IIa-Komplex. Unter dem Einfluß starker Scherkräfte, die vor allem in arteriellen Gefäßen vorgefunden werden, wird der von-Willebrand-Faktor zur Adhäsion benötigt. Dieser besetzt die beiden Bindungsstellen GPIb und GPIIb/IIIa auf Thrombozyten.

Durch die Adhäsion wird eine Aktivierung und Formänderung der Plättchen, verbunden mit einer Steigerung der Membrandurchlässigkeit, ausgelöst. Die Plättchen bilden Pseudopodien aus und legen sich eng aneinander. Es folgt eine Freisetzung zahlreicher Substanzen aus den Plättchengranula; ADP veranlaßt Plättchen zur Anheftung und leitet so die Plättchenaggregation ein. Hierzu wird Fibrinogen benötigt, um die Plättchen untereinander über GPIIb/IIIa zu vernetzen (Abbildung 1). Durch den Aktivierungsreiz wird aus den Phospholipiden der Plättchenmembran Arachidonsäure freigesetzt, aus der enzymatisch über Zwischenstufen das aggregationsfördernde Thromboxan A<sub>2</sub> entsteht. Letzteres verstärkt die Plättchenaggregation und ist eine vasokonstriktorische Substanz, welche die glatte Gefäßmuskulatur verletzter Arteriolen und Venolen zur Kontraktion veranlaßt. Diese Vasokonstriktion wird durch den Austritt von Blutplasma noch verstärkt, wodurch der von außen auf das Gefäß einwirkende Gewebedruck zunimmt. Außerdem kommt es zu einer Einrollung und Verklebung des Gefäßendothels. Das bei der Aktivierung des Gerinnungssystems inzwischen entstandene Thrombin bewirkt, dass die Blutplättchen zu einer aggregierenden Masse verschmelzen (irreversible Aggregation). Die beschriebenen Vorgänge führen innerhalb von ein bis drei Minuten nach der Endothelverletzung zu einem vorläufigen Sistieren der Blutung (Blutungszeit). Der zunächst allein aus Thrombozyten zusammengesetzte Gefäßpfropf ist nicht in der Lage, die verletzte Gefäßstelle dauerhaft zu verschließen.

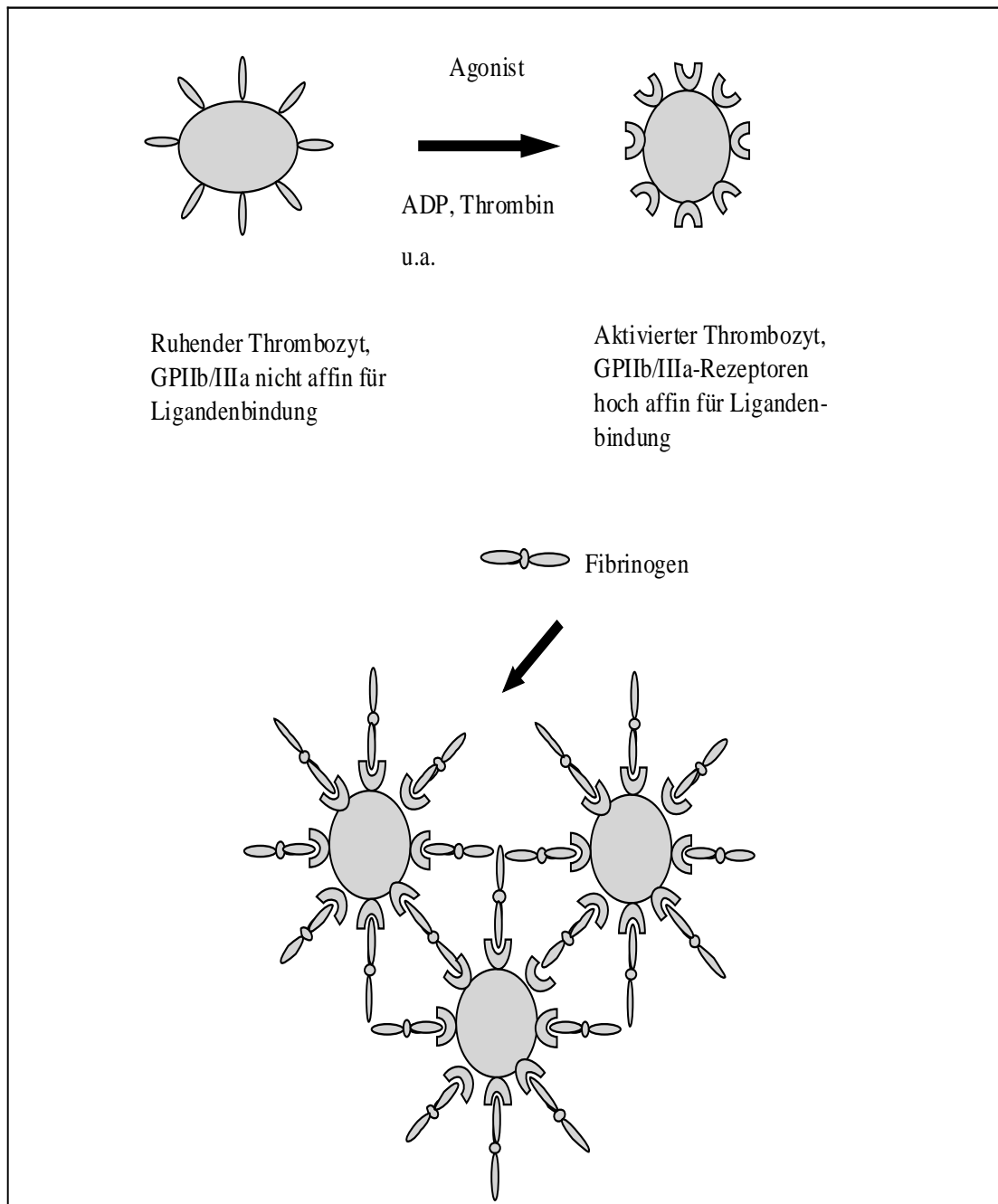


Abbildung 1: Überblick über den Prozeß der Plättchenaktivierung und -aggregation. Die Aktivierung der Thrombozyten verursacht eine Änderung ihrer äußeren Form und eine Konformationsänderung des GPIIb/IIIa-Rezeptors, die zur Ligandenbindung führt. Auf diese Weise werden benachbarte Plättchen über Fibrinogenmoleküle miteinander vernetzt, was zur Aggregation der Thrombozyten führt (Übersicht bei Lefkovits et al., 1995).

Hierzu bedarf es der Mitwirkung des Gerinnungssystems, das zur gleichen Zeit, während der sich die komplexen Plättchenvorgänge abspielen, am Ort der Verletzung aktiviert wird. Dieser deutlich langsamer ablaufende Prozeß gipfelt in der Ausbildung von Fibrinfäden, die den Gefäßpfropf netzartig durchziehen und sich in der Regel auch in der näheren Umgebung des Pfropfes ablagern, wobei reichlich Erythrozyten mit eingeschlossen werden. Seine endgültige Festigkeit erhält der Verschlusspfropf durch eine Kontraktion der mit ihren Pseudopodien untereinander sowie mit den Fibrinfäden verflochteten Thrombozyten, die ein aktomyosinähnliches, kontraktiles Protein (Thrombosthenin) enthalten. An diesem Vorgang, der normalerweise fünf bis sieben Minuten dauert (Gerinnungszeit), ist neben den Thrombozyten eine Vielzahl plasmatischer Faktoren beteiligt (Übersicht bei Du und Ginsberg, 1997).

### 2.1.3. Thrombozytopenie

Eine Thrombozytopenie, eine Abnahme der Thrombozytenzahl, kann eine verstärkte Blutungsneigung verursachen, die auch als hämorrhagische Diathese bezeichnet wird. Eine Thrombozytopenie führt zu einer Störung der Hämostase. Wird eine kritische Grenze von 10000-20000 Plättchen/ $\mu$ l unterschritten, so kann es zu spontanen Blutungen kommen. Charakteristisch ist das Auftreten von punktförmigen, petechialen Hautblutungen. Sinkt die Thrombozytenzahl unter 5000/ $\mu$ l, dann steigt die Blutungsgefahr sprunghaft an. Thrombozytopenien können hereditär bedingt sein oder erworben werden. Sie resultieren aus Störungen der Plättchenbildung im Knochenmark, des peripheren Plättchenumsatzes, der Plättchenverteilung bei Hypersplenismus oder aus einem Verdünnungseffekt (Übersicht bei Warkentin, 1999).

#### 2.1.4. Thrombozytäre Alloantigene

Thrombozytäre Alloantigene werden durch Alloantikörper definiert, die gegen genetisch bedingte Veränderungen an Proteinen oder Kohlenhydraten auf der Plättchenmembran gerichtet sind. Alloantikörper können von gesunden Individuen nach Kontakt mit Antigenen, zum Beispiel während der Schwangerschaft, durch Bluttransfusionen oder seltener durch Knochenmarkübertragungen, gebildet werden. Die Alloantikörper binden sich spezifisch an Alloantigene, was zu einem immunvermittelten, gesteigerten Plättchenabbau führt. Die klinisch relevanten Plättchenalloantigene können in zwei Klassen eingeteilt werden. Klasse I umfaßt die Alloantigene, die sowohl auf Plättchen als auch auf anderen Blutzellen und in Geweben vorkommen. Hierzu zählen die Glykoproteine des ABH-Blutgruppensystems und die stark polymorphen HLA-Klasse-1-Moleküle. Die meisten Alloantigene der Klasse II sind spezifisch für Thrombozyten und werden deshalb als „plättchenspezifische Alloantigene“ bezeichnet.

Die bisher nachgewiesenen thrombozytären Alloantigensysteme der Klasse II sind in Tabelle 1 gemäß der Nomenklatur der *Human Platelet Antigens* (HPA) aufgeführt (Übersicht bei Santoso, 2002).

Antigen	Synonym	Glykoprotein- lokalisation	Nukleotid- substitution	Aminosäure- substitution	Referenz
HPA-1a HPA-1b	Zw <sup>a</sup> , Pl <sup>A1</sup> Zw <sup>b</sup> , Pl <sup>A2</sup>	GPIIIa	T <sub>196</sub> C <sub>196</sub>	Leu <sub>33</sub> Pro <sub>33</sub>	Newman et al., 1989
HPA-2a HPA-2b	Ko <sup>b</sup> Ko <sup>a</sup> , Sib <sup>a</sup>	GPII $\alpha$	C <sub>524</sub> T <sub>524</sub>	Thr <sub>145</sub> Met <sub>145</sub>	Kuijpers et al., 1992
HPA-3a HPA-3b	Bak <sup>a</sup> , Lek <sup>a</sup> Bak <sup>b</sup>	GPIIb	T <sub>2622</sub> G <sub>2622</sub>	Ile <sub>843</sub> Ser <sub>843</sub>	Lyman et al., 1990
HPA-4a HPA-4b	Yuk <sup>b</sup> , Pen <sup>a</sup> Yuk <sup>a</sup> , Pen <sup>b</sup>	GPIIIa	G <sub>526</sub> A <sub>526</sub>	Arg <sub>143</sub> Gln <sub>143</sub>	Wang et al., 1992
HPA-5a HPA-5b	Br <sup>b</sup> , Zav <sup>b</sup> Br <sup>a</sup> , Zav <sup>a</sup>	GPIa	G <sub>1648</sub> A <sub>1648</sub>	Glu <sub>505</sub> Lys <sub>505</sub>	Santoso et al., 1993
HPA-6bW	Ca <sup>a</sup> , Tu <sup>a</sup>	GPIIIa	A <sub>1564</sub> G <sub>1564</sub>	Gln <sub>489</sub> Arg <sub>489</sub>	Wang et al., 1993
HPA-7bW	Mo <sup>a</sup>	GPIIIa	G <sub>1317</sub> C <sub>1317</sub>	Ala <sub>407</sub> Pro <sub>407</sub>	Kuijpers et al., 1993
HPA-8bW	Sr <sup>a</sup>	GPIIIa	T <sub>2004</sub> C <sub>2004</sub>	Cys <sub>636</sub> Arg <sub>636</sub>	Santoso et al., 1994
HPA-9bW	Max <sup>a</sup>	GPIIb	A <sub>2603</sub> G <sub>2603</sub>	Met <sub>837</sub> Val <sub>837</sub>	Noris et al., 1995
HPA-10bW	La <sup>a</sup>	GPIIIa	A <sub>281</sub> G <sub>281</sub>	Gln <sub>62</sub> Arg <sub>62</sub>	Peyruchaud et al., 1997
HPA-11bW	Gro <sup>a</sup>	GPIIIa	A <sub>1996</sub> G <sub>1996</sub>	His <sub>633</sub> Arg <sub>633</sub>	Simsek et al., 1997
HPA-12bW	Iy <sup>a</sup>	GPII $\beta$	A <sub>141</sub> G <sub>141</sub>	Glu <sub>15</sub> Gly <sub>15</sub>	Santoso et al., 1996
HPA-13bW	Sit <sup>a</sup>	GPIa	T <sub>2531</sub> C <sub>2531</sub>	Met <sub>799</sub> Thr <sub>799</sub>	Santoso et al., 1997
HPA-14bW	Oe <sup>a</sup>	GPIIIa	dAAG <sub>1931</sub>	dLys <sub>611</sub>	Santoso et al., 2002
HPA-15a HPA-15b	Gov <sup>a</sup> Gov <sup>b</sup>	CD109	A <sub>2108</sub> C <sub>2108</sub>	Tyr <sub>703</sub> Ser <sub>703</sub>	Schuh et al., 2002



HPA-16W	Duv <sup>a</sup>	GPIIIa	C <sub>517</sub> T <sub>517</sub>	Thr <sub>140</sub> Ile <sub>140</sub>	Jallu et al., 2002
---------	------------------	--------	--------------------------------------	--	-----------------------

Tabelle 1: Molekulargenetik der humanen thrombozytären Alloantigene. Glykoproteinlokalisierung, Nukleotidaustausch der DNA sowie entsprechender Aminosäureaustausch im Protein der humanen thrombozytären Alloantigene. Die tiefgestellten Zahlen geben die cDNA- bzw. Aminosäureposition an. (Übersicht bei Santoso, 2002).

Durch molekulargenetische Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß alle bislang veröffentlichten Alloantigendeterminanten durch einzelne Basenaustausche entstanden sind, die zu einem Transfer der zugehörigen Aminosäure führen (Newman et al., 1989). Der Wechsel einer Aminosäure bedingt eine Konformationsänderung in der dreidimensionalen Struktur des thrombozytären Glykoproteins, wodurch eine alloantigene Determinante entsteht, die von T- und B-Lymphozyten erkannt wird (Malanska et al., 1996).

Das Alloantigen Oe<sup>a</sup> wurde ein Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt. Als molekulare Grundlage für Oe<sup>a</sup> Alloantigen fanden wir eine Deletion eines Triplets im GPIIIa-Gen. Abbildung 2 gibt die Lage der Punktmutationen und der bekannten Deletion auf dem GPIIb/IIIa-Komplex an, die zur Ausbildung von thrombozytären Alloantigenen führen.

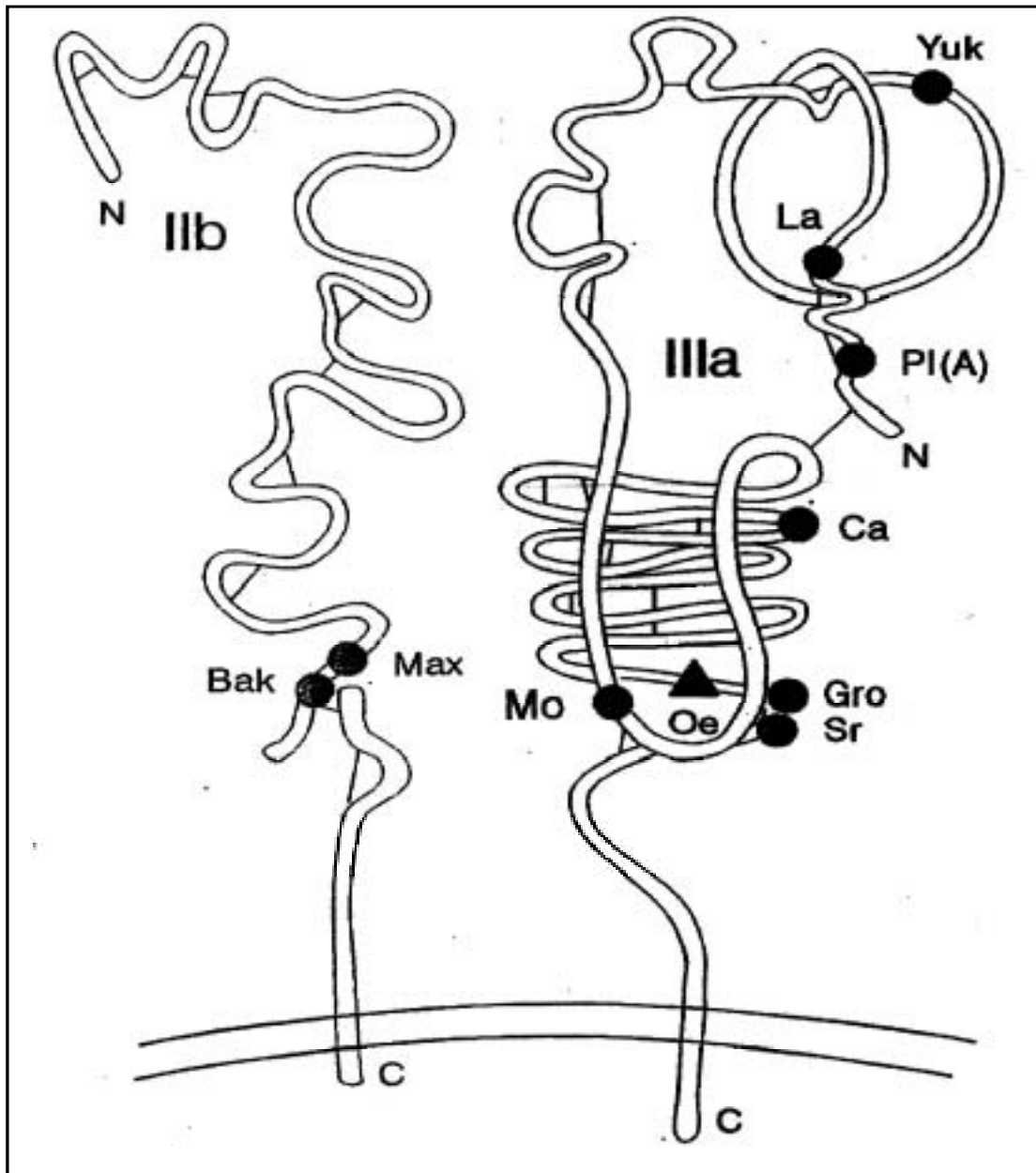


Abbildung 2: Modell für den isolierten Plättchenglykoproteinkomplex IIb/IIIa. Gezeigt sind die bekannten Punktmutationen (Punkte) und die bekannte Deletion (Dreieck), die zur Ausbildung von thrombozytären Alloantigenen führen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Sentot Santoso).

Um die evolutionäre Entstehung der humanen thrombozytären Alloantigene besser zu verstehen, verglichen Newman und Mitarbeiter (Newman und Nathalie, 1995) das GPIIIa Gen des Menschen mit dem GPIIIa Gen von Ratten und Xenopus. Ihre Untersuchung weist darauf hin, dass das häufigste GPIIIa Allel (GP3a\*01) bei Menschen dem Ursprungsallel

entspricht. Andere GPIIIa Allele (GP3a\*02, GP3a\*03, usw.) sind höchstwahrscheinlich durch unabhängige Punktmutation aus dem GPIIIa Ursprungsallel während der Evolution entstanden (Abbildung 3). Für das HPA-1 Alloantigen (GPIIIa Leu33Pro Dimorphismus) konnten die Autoren leider diese Hypothese nicht überprüfen, weil GPIIIa von Ratte und *Xenopus* weder Leucin noch Prolin an der Position 33 tragen (Ransom et al., 1993; Cieutat et al., 1993). Spätere Untersuchungen von Lipscomb und Mitarbeitern (Lipscomb et al., 1999) zeigten, dass GPIIIa von Hunden an der Position 33 die Aminosäure Leucin trägt, welche dem häufigsten Allel (GP3A\*01) des Menschen entspricht. Die evolutionäre Hypothese zur Entstehung von humanen thrombozytären Alloantigenen konnte durch Arbeiten unserer Gruppe bestätigt werden. Analyse verschiedener Affenspezies zeigte, dass das humane GPIIIa3a\*01 Allel dem GPIIIa von Affen entspricht (Santoso et al., 2002).

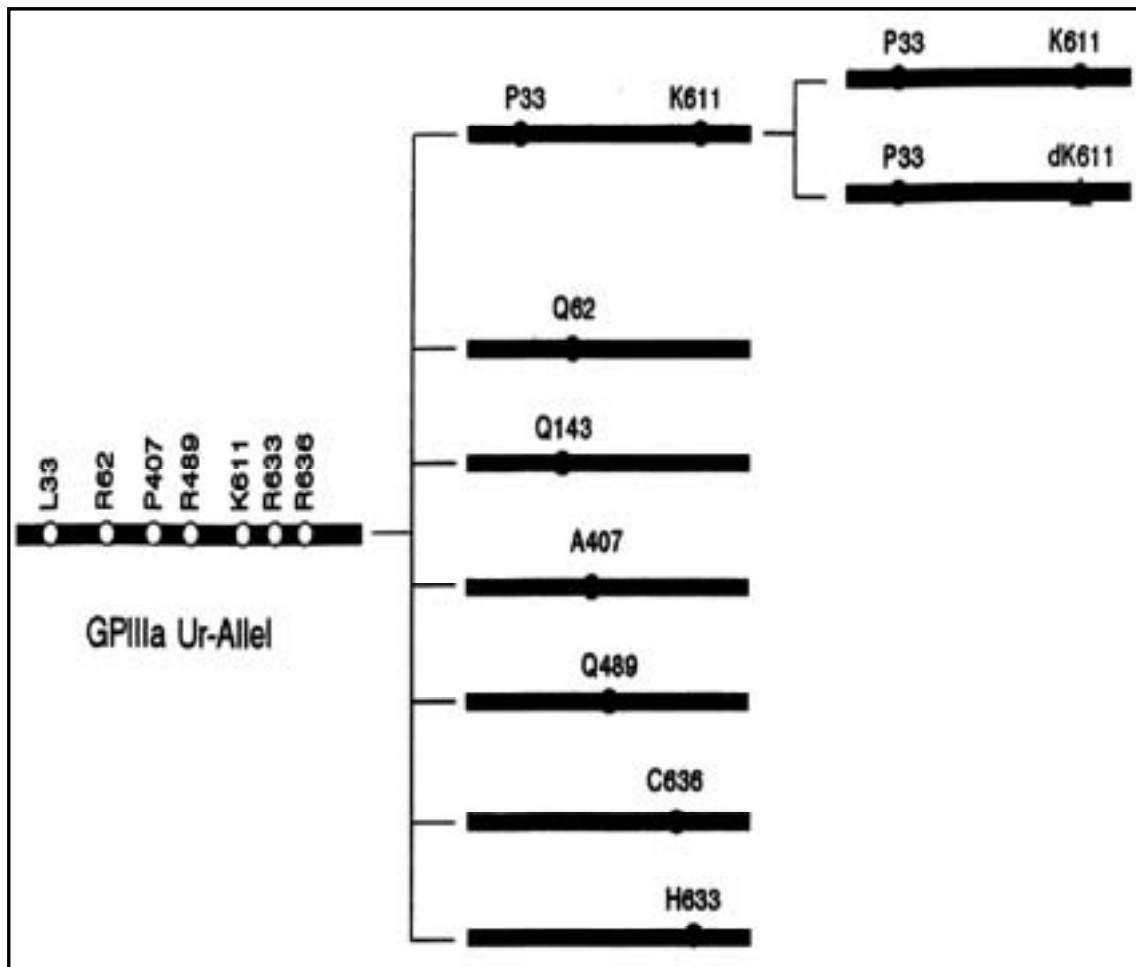


Abbildung 3: GPIIIa Allele. Die Aminosäuren, die sich bei den verschiedenen Allelen unterscheiden, sind durch die Positionsangabe und Bezeichnung im Ein-Buchstaben-Code kenntlich gemacht. Die zugehörigen Punkte weisen auf eine Punktmutation im GPIIIa Gen hin (helle Punkte symbolisieren die ursprüngliche Aminosäure, dunkle Punkte stehen für die mutierte Form). Das Dreieck kennzeichnet die Deletion einer Aminosäure.

### 2.1.5. Molekulargenetische Untersuchungsmethoden an Thrombozyten

Die molekulargenetischen Untersuchungen an Thrombozyten wurde dadurch erschwert, dass Thrombozyten als kernlose Zellen keine DNA und nur eine geringe Menge an mRNA besitzen (Wicki et al., 1989). Die Vorläuferzellen der Thrombozyten, die kernhaltigen Megakaryozyten, weisen zwar größere Mengen an mRNA auf, sind aber nur durch eine Knochenmarkspunktion zu gewinnen.

Molekulargenetische Untersuchungen könnten theoretisch mit DNA aus allen anderen kernhaltigen Körperzellen durchgeführt werden. Jedoch treten oft Schwierigkeiten durch die Komplexität der genomischen DNA auf, denn genaue Informationen über die Exon-Intron-Organisation sind erforderlich.

Im Jahr 1989 isolierten Wicki und Mitarbeiter mRNA aus Thrombozyten und stellten eine cDNA-Bibliothek auf. Hierfür waren jedoch große Mengen an Blut erforderlich, so dass sich diese Methode für die Untersuchung einzelner Personen nicht eignet.

Djaffar und Mitarbeiter zeigten 1991 mit der Northern-Blot-Technik eine Möglichkeit, größere genetische Veränderungen, wie zum Beispiel Deletionen, aus mRNA darzustellen. Ein entscheidender Fortschritt wurde durch die modifizierte PCR-Technologie von Newman und Mitarbeitern (1988) erzielt. Mit der PCR Amplifikation konnten geringe Menge thrombozytäre mRNA einzelner Personen amplifiziert und sequenziert werden. Mit Hilfe dieser Technik konnten Newman und Mitarbeiter den Basenaustausch auf GPIIIa cDNA entdecken, der mit der phänotypischen Ausprägung des thrombozytären Alloantigensystems HPA-1a/b korreliert ist (Newman et al., 1989).

Nach der Identifikation der molekulargenetischen Grundlagen von HPA-1a/b Polymorphismen können heute verschiedene Methoden zur Genotypisierung, wie zum Beispiel Untersuchung

des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) oder Einsatz sequenzspezifischer Primer (SSP), angewendet werden (McFarland et al., 1998).

## 2.2. Integrine der Thrombozyten

Auf Thrombozyten konnten bisher fünf verschiedene Integrine nachgewiesen werden (Tabelle 2). Integrine dienen als Rezeptoren für unterschiedliche Liganden und spielen eine zentrale Rolle in der Hämostase.

Integrin	Synonym	Ligand
$\alpha_2\beta_1$	GPIa/IIa	Kollagen, Laminin
$\alpha_5\beta_1$	GPIc/IIa	Fibronektin
$\alpha_6\beta_1$	GPIc'/IIa	Laminin
$\alpha_{IIb}\beta_3$	GPIIb/IIIa	Fibrinogen, Fibronektin, von-Willebrand-Faktor, Vitronektin, Thrombospondin
$\alpha_v\beta_3$	VnR/IIIa	Vitronektin, Fibrinogen, von-Willebrand-Faktor, Thrombospondin, Fibronektin, Osteopontin, Kollagen

Tabelle 2: Integrine auf Thrombozyten und ihre bekannten Liganden (Übersicht bei Hynes, 1992).

Integrine sind Adhäsionsrezeptoren, die Strukturen des Zytoskeletts mit der extrazellulären Matrix verbinden. Integrine kommen ubiquitär vor und finden sich auf nahezu allen Zellen. Neben der Thrombozytenaggregation und -adhäsion sind Integrine an der Gewebeentwicklung und -differenzierung, am Tumorzellwachstum, Homöostase, Embryonalentwicklung, Wundheilung, immunologischen Abwehrmechanismen und Metastasierung beteiligt.

Weiterhin tragen sie zur Leukozytenadhäsion sowie Migration und Steuerung der Lymphozytenadhäsion ("homing") in lymphatischen Geweben bei (Gawaz, 1999; Damsky et al., 2002).

Alle  $\alpha$ -Untereinheiten besitzen im N-terminalen Bereich spezielle Bindungsstellen für divalente Kationen. Diese sind essentiell für die Rezeptorfunktion, da sie die Affinität zu und Spezifität für die Liganden der Integrine beeinflussen und außerdem für die Assoziation der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten notwendig sind (Gailit und Ruoslahti, 1988; Kirchhofer et al., 1990a, 1991; Plow, 2000). Einige  $\alpha$ -Untereinheiten werden posttranslational gespalten in eine 25-30 kD große Transmembrankette (leichte Kette), die über eine Disulfidbrücke mit einer größeren, vollständig extrazellulären Kette (schwere Kette) verbunden bleibt. Beide Untereinheiten tragen zur Ausbildung der Ligandenbindungsstelle bei. Nach gegenwärtigem Verständnis verbinden sich die aminoterminalen Domänen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit zu einem Ligandenbindungskopf (Übersicht bei Hynes, 1992; Humphries, 2000). Die Erkennung der Liganden erfolgt meist über die, vielen Adhäsionsproteinen gemeinsame, Tripeptidsequenz Arg-Gly-Asp (RGD). Diese Sequenz kommt zum Beispiel in Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin und vielen anderen Adhäsionsproteinen vor und wird von verschiedenen Integrinen erkannt.

### 2.2.1. Struktur

Integrine sind heterodimere Moleküle, die sich aus zwei nicht kovalent gebundenen Untereinheiten zusammensetzen, wobei die jeweils größere als  $\alpha$ - und die kleinere als  $\beta$ -Untereinheit bezeichnet wird. Das relative Molekulargewicht der  $\alpha$ -Untereinheiten variiert zwischen 120-180 kDa, das der  $\beta$ -Untereinheiten zwischen 90-130 kDa. Bis heute sind 20 Integrine beschrieben mit 8 unterschiedlichen  $\alpha$ -Untereinheiten und 16 verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten. Beim Vergleich humaner Integrine mit homologen Molekülen verschiedener Tierarten finden sich im Laufe der Evolution hochkonservierte Strukturen, die vermutlich zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Entwicklungsgeschichte vor der Teilung in Protostomier und

Deuterostomier entstanden sind (Hemler, 1991; Hynes und Bader, 1997). Informationen über zelluläre Lokalisation, Molekulargewicht und Funktion der Integrine wurden erstmals gegen Ende der siebziger Jahre gewonnen durch immunologische und proteinchemische Untersuchungen humaner und muriner Zellen vor allem mit Hilfe monoklonaler Antikörper. Gegen Ende der achtziger Jahre gelang die Aufklärung der Primärstruktur für die meisten Integrine durch Sequenzierung komplementärer DNA (cDNA). Elektronmikroskopische Untersuchungen von Integrinen zeigen einen extrazellulär gelegenen, globulären Kopf, der über die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette mit der Zellmembran verbunden ist (Carrell et al., 1985).

Die  $\alpha$ -Untereinheiten von Mensch, Geflügel und Nagetieren weisen bezüglich der cDNA-Sequenz Homologien zwischen 70-95% auf (Hemler, 1991). Die Mehrzahl der  $\alpha$ -Untereinheiten besitzt eine insertierte Domäne (I-Domäne) von etwa 200 Basen. Die I-Domäne ist vermutlich eine Bindungsstelle für Kollagen. Durch Versuche an Chimären wurde nachgewiesen, dass nach Mutationen in der I-Domäne keine Bindung der Integrine an Liganden mehr erfolgte (Übersicht bei Hynes, 1992). Der C-terminale Bereich der  $\alpha$ -Untereinheit besteht aus einer längeren extrazellulären Domäne, an die sich eine jeweils kurze transmembrane und zytoplasmatische Domäne anschließen.

Die verschiedenen humanen  $\beta$ -Untereinheiten weisen bezüglich der cDNA-Sequenz der zytoplasmatischen Region eine Homologie von nur 30-50% auf. Im Vergleich der gesamten Sequenzen von Mensch, Maus, Huhn und Krallenfrosch (*Xenopus*) wurde eine Homologie zwischen 77-83% gefunden, wobei die zytoplasmatische Region sogar zu 98-100% konserviert ist. In der cysteinreichen, extrazellulären Domäne der  $\beta$ -Untereinheit werden durch Disulfidbrücken Schleifen gebildet (Übersicht bei Hemler, 1991).



### 2.2.2. Liganden

Integrine vermitteln die Adhäsion von Zellen zu zahlreichen unterschiedlichen Liganden. Mögliche Liganden sind neben extrazellulären Matrixproteinen (zum Beispiel Kollagen, Laminin, Fibronectin) Membranproteine (zum Beispiel ICAM-1, -2, -3, VCAM) sowie Serumproteine (zum Beispiel Fibrinogen, von-Willebrand-Faktor, Komplementfaktor 3b). Meistens erkennt ein Integrin nicht nur einen Liganden. Auch kann ein Ligand von mehreren verschiedenen Integrinen gebunden werden (Übersicht bei Hynes, 1992). Die Spezifität für bestimmte Liganden ist abhängig von Art und Zustand der Zellen (Kirchhofer et al., 1990). Die ursprünglich niedrige Affinität der Interaktionen kann durch Clusterbildung von Integrinen erhöht werden, die wahrscheinlich eine Rolle für die Regulation der Zellen spielt (Grabovsky et al., 2000; Feigelson et al., 2001).

Die Bindung der Liganden erfolgt in der N-terminalen Domäne beider Untereinheiten in Abhängigkeit von divalenten Kationen. Bei einigen  $\alpha$ -Untereinheiten ist die I-Domäne an der Ligandenbindung beteiligt. Bei anderen  $\alpha$ -Untereinheiten, die keine I-Domäne besitzen, liegt die Bindungsstelle für Liganden in der Nähe der Kationenbindungsstelle (Arnaout et al., 2002)

### 2.2.3. $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin

Die GPIIb- und IIIa-Vorläufer sind Produkte von verschiedenen Genen, die zusammen auf Chromosom 17 in der Region q21-22 lokalisiert sind (Sosnoski et al., 1988). Das GPIIb-Gen ist 17,2 kB lang und besteht aus 30 Exons mit Längen zwischen 45 und 249 Bp (Heidenreich et al., 1990). Die Größe des GPIIIa-Gens beträgt 63 kB und umfaßt 14 Exons (Wilhide et al., 1997; Zimrin et al., 1990). Das  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin (GPIIb/IIIa) ist auf der Thrombozytenmembran der Hauptrezeptor für Fibrinogen und vermittelt im Rahmen der

Hämostase die Thrombozytenaggregation und die Adhäsion von Thrombozyten an extrazelluläre Matrixproteine.

GPIIb/IIIa war eines der ersten Integrine die identifiziert (Nurden und Caen, 1974) und aufgereinigt (Jennings und Philips, 1982), später kloniert und sequenziert (Fitzgerald et al., 1987; Loftus et al., 1987, Poncz et al., 1987;) wurden und war das erste, welches in rekombinanter Form expremiert wurde (O'Toole et al., 1989). Der GPIIb/IIIa-Komplex ist der Hauptrezeptor für Fibrinogen, bindet aber auch Fibronektin, von-Willebrand-Faktor und Vitronektin. Durch seine Fähigkeit, Fibrinogen zu binden, ist er Vermittler der Plättchenaggregation. Sekundär ist er auch an der Plättchenadhäsion beteiligt (Hantgan et al., 1990; Lages und Weiss, 1994), wobei aber die anderen genannten Liganden die größere Rolle spielen.

#### 2.2.3.1. Struktur

Der GPIIb/IIIa ist ein typisches Integrin, also ein Heterodimer, welches sich aus einem Molekül des GPIIb ( $\alpha_{IIb}$ -Untereinheit) und einem Molekül des GPIIIa ( $\beta_3$ -Untereinheit) zusammensetzt (Abbildung 4). Die  $\alpha_{IIb}$ -Untereinheit ist plättchenspezifisch, die  $\beta_3$ -Untereinheit kommt dagegen auf verschiedenen Zelltypen vor. Der GPIIb/IIIa-Komplex benötigt  $Ca^{2+}$ , um seine heterodimere Struktur aufrecht zu erhalten (Kunicki et al., 1981; Fujimura und Philips, 1983), wobei GPIIb die Untereinheit des Komplexes ist, welche  $Ca^{2+}$  bindet (Fujimura et al., 1987; Charo et al., 1986).

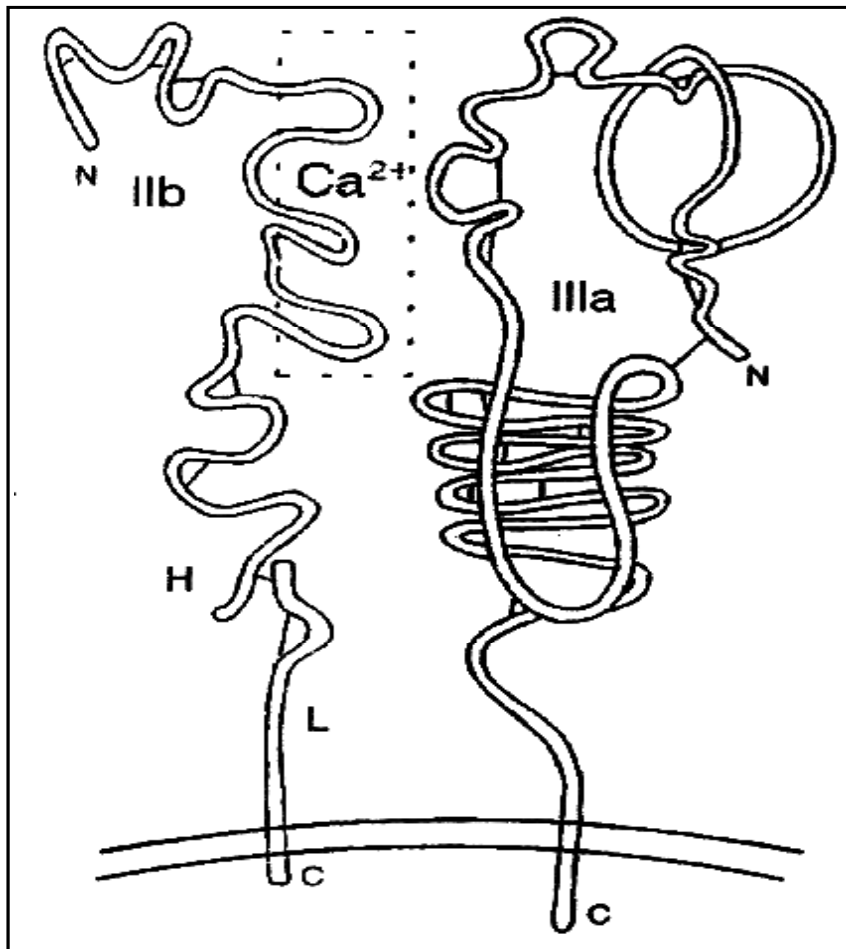


Abbildung 4: Schematische Darstellung des GPIIb/IIIa-Komplexes. Die gepunktete Region stellt die Kationenbindungsdomäne des GPIIb dar. N=Aminoterminus, C=Carboxyterminus, H=schwere Kette, L=leichte Kette.

Die  $\alpha_{IIb}$ -Untereinheit besteht aus einer schweren (114 kDa) und einer leichten (23 kDa) Kette, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (Calvete et al., 1989). Die  $\alpha_{IIIb}$ -Untereinheit besteht aus insgesamt 1039 Aminosäuren mit einer leichten Kette aus 137 Aminosäuren, einer schweren Kette (871 Aminosäuren) und einem Signalpeptid mit 30 Aminosäuren. Die leichte Kette enthält die transmembrane Domäne (26 Aminosäuren) und die zytoplasmatische Domäne (20 Aminosäuren). Die schwere Kette enthält insgesamt vier Kationenbindungsstellen von jeweils zwölf Aminosäuren, die homolog zu den

kalziumbindenden Regionen von Troponin C und Calmodulin sind (Kretsinger, 1976). Der zytoplasmatische Anteil der leichten Kette enthält ein hoch konserviertes Aminosäuremotiv (GFFKR), welches benötigt wird zur Ligandenaffinitätsmodulation (Übersicht bei O'Toole et al., 1994). Das GPIIIa ist eine einzige Polypeptidkette aus 762 Aminosäuren, die ein Molekulargewicht von ungefähr 90 kD aufweist und 15 % Kohlenhydratreste enthält (Fitzgerald et al., 1987). Es besteht aus einem kurzen zytoplasmatischen Fragment (41 Aminosäuren, C-terminal), einer stark hydrophoben 29 Aminosäurereste umfassenden Transmembranregion und einer großen extrazellulären Domäne (692 Aminosäuren, N-terminal). GPIIIa enthält 56 Cystein-Reste, die alle Disulfidbrücken bilden. Die Aminosäuresequenz enthält sieben potentielle N-Glykosylierungsstellen, wovon sechs im extrazellulären Bereich liegen.

Die Ligandenerkennungsstelle liegt in den N-terminalen Bereichen beider Untereinheiten (Übersicht bei Ginsberg et al., 1995). Man nimmt an, daß die beiden Glykoproteine eine dreidimensionale Liganden-Bindungstasche ausbilden (Plow et al., 2000). Eine Sequenz im GPIIIa (Asp<sub>109</sub>-Glu<sub>171</sub>), die proximal eines gebundenen Liganden liegt, ist wahrscheinlich in die Ligandenerkennung involviert, da Antikörper, die gegen diese Region gerichtet sind, eine Ligandenbindung verhindern können. Außerdem konnte nachgewiesen werden, daß isolierte Peptide aus dieser Region zur Ligandenbindung befähigt sind. In diesem Bereich des GPIIIa liegen vermutlich auch Kalziumbindungsstellen (Calvete et al., 1991).

#### 2.2.3.2. Funktion

Im Rahmen der Hämostase führt eine Konformationsänderung des  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins zur Bindung von Fibrinogen, welches die Vernetzung und Aggregation der Thrombozyten bedingt. Ferner ist das  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin ein Rezeptor bei der Thrombozytenadhäsion an Fibronectin, Vitronectin

und von-Willebrand-Faktor. Die Adhäsion von  $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$  an verschiedene Liganden führt über intrazelluläre Botenstoffe zu einer Thrombozytenaktivierung (Shattil et al., 1992). Die Bindung der Liganden ist abhängig von divalenten Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  (Smith et al., 1994).

Phillips und Mitarbeiter zeigten 1983, dass der GPIIb/IIIa-Komplex während der Plättchenaggregation mit dem Zytoskelett assoziiert ist. Somit können sich die Funktionen des GPIIb/IIIa auf Ligandenerkennung, transmembrane Signalübertragung, Induktion und Kontrolle der Plättchenformveränderung sowie die Ausbildung von Brücken zwischen Thrombozyten erstrecken (Übersicht bei Newman, 1991).

Auf ruhenden, d.h. nicht aktivierten Plättchen, ist die Affinität oder Avidität des GPIIb/IIIa für lösliche Liganden niedrig (Übersicht bei Shattil, 1995). Im Gegensatz dazu können ruhende Plättchen an immobilisiertes Fibrinogen, nicht aber an immobilisierten von-Willebrand-Faktor, binden (Savage et al., 1992). Die Aktivierung von Thrombozyten mit starken (z.B. Thrombin, Kollagen) oder schwachen (z.B. ADP, Adrenalin) Agonisten ist assoziiert mit Veränderungen in der äußeren Form der Plättchen und der Aktivierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors (Abbildung 1). Diese Rezeptoraktivierung äußert sich in einer Konformationsänderung der extrazellulären Domänen beider Untereinheiten (Sims et al., 1991; O'Toole et al., 1990), wird aber nicht durch eine direkte Interaktion der Agonisten mit dem Integrin ausgelöst, sondern erfolgt über die klassischen Signaltransduktionswege (Übersicht bei Ginsberg et al., 1995; Shattil, 1995).

Diese umfassen die Transduktion der Signale über G-Proteine, was über die Aktivierung der Phospholipase C eine Veränderung des zytosolischen Kalziumspiegels bewirkt und außerdem zelluläre Proteinkinasen aktiviert. So könnten die zytoplasmatischen Domänen des Integrins Substrat für die Proteinkinase C sein, wobei aber noch nicht gezeigt werden konnte, dass dies einen Einfluß auf die Affinitätsmodulation hat, sondern wohl eher bedeutende funktionelle Konsequenzen nach sich zieht (Übersicht bei Ginsberg et al., 1995).

Die Affinitätsmodulation der Integrine ist abhängig von einem hoch konservierten Aminosäuremotiv (GFFKR) der zytoplasmatischen Domäne der  $\alpha$ -Untereinheit (O'Toole et al., 1994). Wird dieses beispielsweise experimentell entfernt, so wird die Ligandenaffinität gesteigert und der GPIIb/IIIa-Rezeptor befindet sich in einem irreversibel aktivierten Zustand (O'Toole et al., 1994; Übersicht bei Ginsberg et al., 1995). Dies zeigte, daß die GFFKR-Sequenz zur Aufrechterhaltung eines niedrig affinen Stadiums benötigt wird. Diese Modulation der  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Affinität oder Avidität durch Plättchen-Agonisten wird auch als *inside-out signaling* bezeichnet (Ginsberg et al., 1992). Sie bewirkt außer der schon erwähnten Konformationsänderung der extrazellulären Domänen von  $\alpha_{IIb}\beta_3$  auch ein Rezeptor-*clustering*, wodurch mehrere Integrinkomplexe zusammengelagert werden (Santoso et al., 1986). Das Rezeptor-*clustering* wird durch Veränderungen der Zytoskelettproteine verursacht, die direkt oder indirekt an die zytoplasmatischen Anteile der beiden Rezeptoruntereinheiten binden (Fox, 1993; Fox et al., 1996). Die Erkennungsspezifität des GPIIb/IIIa-Rezeptors wird durch zwei Peptidsequenzen definiert. Die Sequenz Arg-Gly-Asp (RGD) wurde zuerst im Fibronektin als adhäsive Sequenz identifiziert (Pierschbacher und Ruoslahti, 1984), kommt aber auch in Fibrinogen, von-Willebrand-Faktor und Vitronektin vor. Alle diese Liganden enthalten mindestens eine RGD-Sequenz, monomeres Fibrinogen enthält zwei.

Die Interaktion des GPIIb/IIIa mit Fibrinogen wurde im Detail untersucht. Fibrinogen ist ein dimeres Molekül, welches aus drei Paaren von Polypeptidketten besteht, der A $\alpha$ -Kette, B $\beta$ -Kette und der  $\gamma$ -Kette (Übersicht bei Shattil, 1993). Jede A $\alpha$ -Kette besitzt eine RGD-Sequenz N-terminal und eine C-terminal, sodass Fibrinogen insgesamt vier RGD-Stellen aufweist (Übersicht bei Du und Ginsberg, 1997).

D'Souza und Mitarbeiter zeigten 1988, dass das RGD-Peptid an die Reste 109-171 des GPIIIa bindet. Peptide, die RGD-Sequenzen enthalten, binden reversibel mit einer 1:1 Stöchiometrie an GPIIb/IIIa (Übersicht bei Phillips et al., 1991).

Die zweite Erkennungssequenz umfaßt zwölf Aminosäuren (HHLGGAKQAGDV) am Carboxy-Terminus der Fibrinogen- $\gamma$ -Kette (Kloczewiak et al., 1982), welche an die Reste 294-314 des GPIIb bindet (D'Souza et al., 1990). Diese Daten zeigen, dass die beiden Erkennungssequenzen des Fibrinogens an unterschiedliche Domänen des GPIIb/IIIa-Komplexes binden. Trotzdem wurde durch frühere Studien belegt, dass die RGD-Sequenzen mit der Dodecapeptidsequenz um die Bindung an GPIIb/IIIa konkurrieren (Lam et al., 1987). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde hypothetisch angenommen, dass jedes der Peptide eine Konformationsänderung des GPIIb/IIIa induzieren kann, welche dann die Bindungsstelle des anderen Peptids verändert (Übersicht bei Phillips et al., 1991). Die Dodecapeptidsequenz ist bisher nur in Fibrinogen gefunden worden und ist wahrscheinlich die dominierende Bindungsstelle des Fibrinogen an GPIIb/IIIa (Farrell et al., 1992; Weisel et al., 1992). Die Ligandenbindung erfolgt schnell, da die Plasmakonzentration der Liganden hoch ist und die Bindung von einer Konformationsänderung des Liganden-Rezeptor-Komplexes begleitet wird (Übersicht bei Lefkovits et al., 1995)

Durch die Vernetzung der GPIIb/IIIa-Rezeptoren mit ihren Liganden kommt es, je nach Ligand, entweder zur Plättchenaggregation oder zur Plättchenausbreitung (Abbildung 5). Die Ligandeninteraktion mit GPIIb/IIIa bewirkt eine Signalübertragung ins Plättcheninnere. Diesen Prozeß bezeichnet man auch als *outside-in signaling*. Dadurch wird eine Serie intrazellulärer Ereignisse induziert, welche eine Reorganisation des Zytoskeletts, eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels und pH-Wertes, die Hydrolyse von Membranlipiden, die Phosphoinositylkaskade und die Aktivierung intrazellulärer Protein-

Kinasen beinhaltet (Übersicht bei Du und Ginsberg, 1997). Diese Signalübertragung und-verarbeitung führt zu einer sekundären Plättchenantwort, die sich in der Sekretion des Inhaltes der Granula sowie in einem zweiten Plättchen-Aggregationsschub äußert. Außerdem kommt es im Zuge der Zytoskelettorganisation zur Retraktion des Thrombozyten.

Als Antwort auf die Ligandenbindung werden verschiedene intrazelluläre Proteine, einschließlich einiger Proteintyrosinkinasen, an ihren Tyrosinresten phosphoryliert (Ferrell und Martin, 1989). Auch die zytoplasmatische Domäne der  $\beta_3$ -Untereinheit wird während der Plättchenaggregation an ihrem Tyrosinrest phosphoryliert (Law et al., 1996).

Abbildung 5 faßt die Funktionen von  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin und die damit verbundenen Beziehungen zu anderen Komponenten des Signalübertragungszyklus in Thrombozyten zusammen.

#### 2.2.3.3. Biosynthese und Expression

Das GPIIb und GPIIIa auf unterschiedlichen Geweben exprimiert werden können, zeigt, das ihre Transkription zum Teil durch unabhängige Faktoren reguliert wird. Im Gegensatz zu allen anderen bekannten Integrinen sind ihre Gene jedoch verbunden (Bray et al., 1988) , wodurch die Möglichkeit besteht, dass gemeinsame *cis*-aktive Elemente zur Koordinierung ihrer Genexpression in Megakaryozyten genutzt werden (Wilhide et al., 1997). Einige Integrin-Funktionen benötigen die Fähigkeit der Auf- und Abregulierung der Expression der Integrinmoleküle. Im Fall des GPIIIa ist bekannt, dass seine Expression vor der Menstruation und während der Schwangerschaft gesteigert wird (Lessey et al., 1992, 1994). Dieser Effekt wird durch Sexualhormone vermittelt (Yuan et al., 1996). Zutter und Mitarbeiter zeigten 1992, dass die GPIIIa-Expression auf der Ebene der Transkription kontrolliert wird.



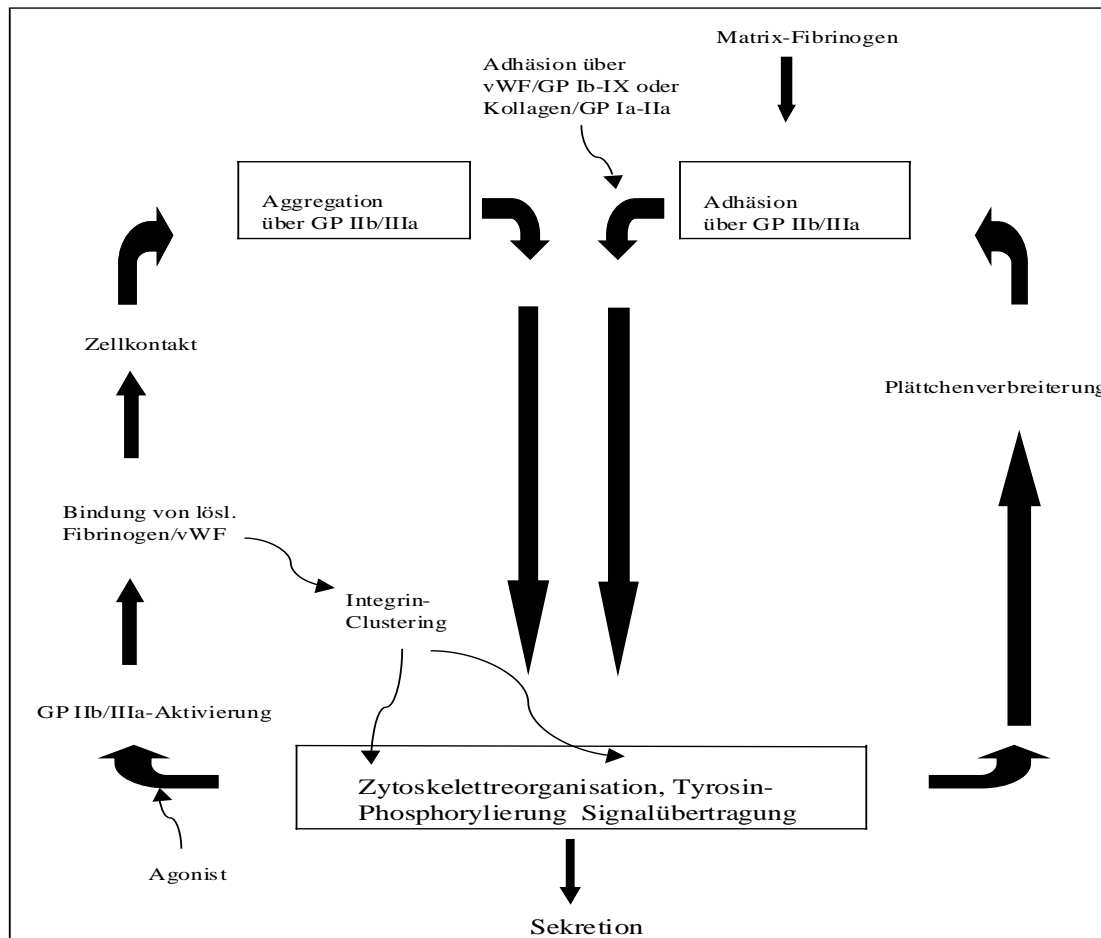


Abbildung 5: Beziehungen des  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins zu anderen Komponenten des Signaltransduktionszyklus in Thrombozyten. Der Zyklus auf der linken Seite demonstriert die Teilschritte der Aggregation und der damit verbundenen Signalübertragung, der Zyklus der rechten Seite stellt die Beziehungen zwischen Adhäsion und Signaltransduktion dar (Übersicht bei Shattil, 1993).

In Megakaryozyten wird die GPIIb-Vorstufe (Pro-GPIIb) als einzelne Polypeptidkette synthetisiert. Diese wird im endoplasmatischen Retikulum (ER) mit dem GPIIIa zum pro GP IIb/IIIa-Komplex assoziiert. Die Expression und richtige Faltung beider Untereinheiten wird für die normale Komplexformation, die Reifung im ER und die spätere Prozessierung des pro GPIIb benötigt. Nach der pro GPIIb/IIIa-Komplexbildung im ER wird dieser in den Golgi-Apparat transportiert. Dort werden die mannosereichen Kohlenhydratseitenketten von pro GPIIb in die schwere und die leichte Kette gespalten. Dies erfolgt durch die Golgi-assoziierte

Serinproteinase Furin oder eine Furin-ähnliche Proteinase (Bresnahan et al., 1990) innerhalb einer konservierten, Arginin-enhaltenden Konsensus-Sequenz (Kolodziej et al., 1991), die auch in anderen  $\alpha$ -Untereinheiten, einschließlich humanem und Nagetier-GPIIb, gefunden wurde (Poncz und Newman, 1990). Die schwere und die leichte Kette des GPIIb bleiben nach der Spaltung durch eine Disulfidbrücke verbunden (Phillips und Agin, 1977). Der reife GPIIb/IIIa-Komplex wird anschließend auf die Zelloberfläche transportiert (O'Toole et al., 1989) (Abbildung 6) und in einer nicht aktivierten und niedrig affinen Form exprimiert, die erst durch Aktivierung in ein hoch affines Stadium übergehen kann, in welchem dann lösliches Fibrinogen und andere Adhäsionsproteine gebunden werden können (Übersicht bei Phillips et al., 1991).

Auf ruhenden Plättchen werden circa 40000-80000 GPIIb/IIIa-Komplexe exprimiert (Wagner et al., 1996). Davon sind ungefähr 70 % zufällig auf der Plättchenoberfläche verteilt (Isenberg et al., 1987). Diese sind nur in der Lage, immobilisiertes Fibrinogen, nicht aber lösliche Liganden zu binden (Übersicht bei Phillips et al., 1991). Die anderen „kryptischen“ GPIIb/IIIa-Komplexe sind verteilt auf die Membranen des mit der Plättchenoberfläche verbundenen kanalikulären Systems (Woods et al., 1986) und auf die Membranen der zytoplasmatischen  $\alpha$ -Granula (Wencel-Drake et al., 1986), die ihren Inhalt nach Plättchenaktivierung freigeben. Damit wird auch die Exponierung der GPIIb/IIIa-Komplexe des internen Pools auf der Plättchenoberfläche ausgelöst.

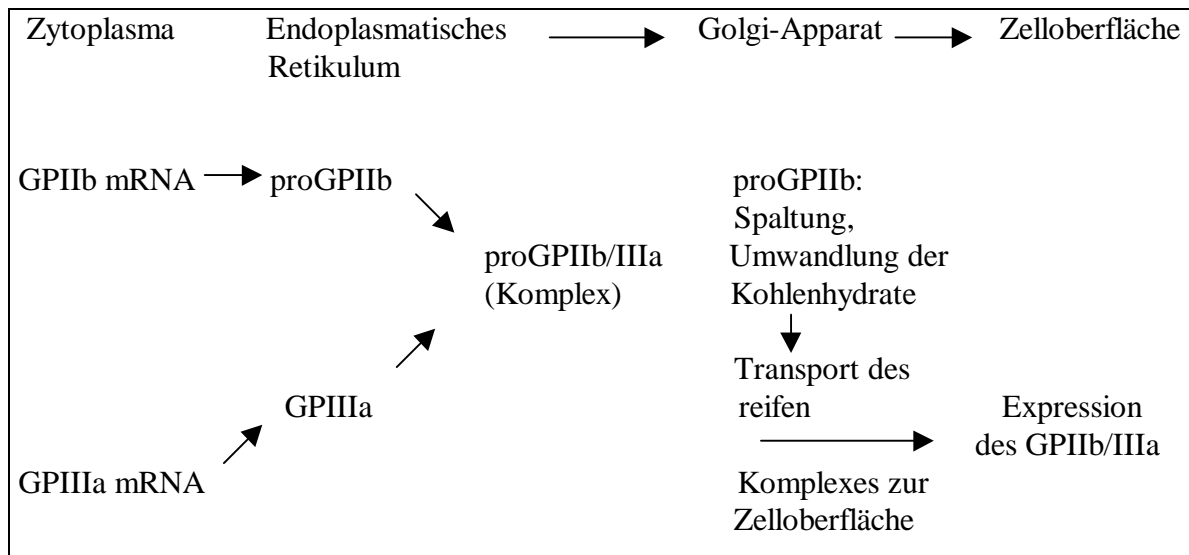


Abbildung 6: Biosynthese des GPIIb/IIIa-Komplexes

#### 2.2.3.4. GPIIb/IIIa-Defekt

Die ersten Hinweise, dass GPIIb/IIIa an der Fibrinogenbindung beteiligt ist, kamen von Studien eines Krankheitsbildes, das als Thrombasthenie Glanzmann beschrieben ist (Übersicht bei George et al., 1990). Die Thrombasthenie Glanzmann ist eine seltene, autosomal rezessiv vererbte Blutungskrankheit, bei der die Thrombozyten auch nach Stimulierung durch Agonisten nicht in der Lage sind zu aggregieren. Die Diagnose wird gestellt, wenn bei dem betroffenen Patienten eine mukokutane Blutungstendenz, eine verlängerte Blutungszeit, eine normale Plättchenzahl und fehlende Thrombozytenaggregation bei Anwesenheit von ADP, Kollagen und Ardenalin sowie eine mangelnde Retraktion des Gerinnsels vorliegen. Im Jahre 1974 entdeckten Nurden und Caen, dass bei dieser Krankheit eine Veränderung des normalen Musters der Plättchenglykoproteine vorliegt. Durch Untersuchungen mit Antikörpern, die von betroffenen Patienten nach mehrfachen Transfusionen entwickelt worden waren, wurde dann herausgefunden, dass diese Antikörper gegen den GPIIb/IIIa-Komplex gerichtet sind.

(Übersicht bei Caen und Rosa, 1995). Somit wurde erkannt, dass ein Defekt dieses wichtigen Glykoproteinkomplexes als Grundlage der Krankheit darstellt. Vor der Entdeckung der GPIIb/IIIa-Mutationen erfolgte eine Klassifizierung der Thrombasthenie Glanzmann in drei Kategorien (Caen, 1972). Diese basierte auf Untersuchungen des Plättchenfibrinogengehalts und der Retraktion des Blutgerinnsels. Bei Typ I fehlt das  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin fast vollständig (< 5 %), bei Typ II ist es reduziert auf 10-20 % der normalen Menge, und bei Typ III wird es in nahezu normalen Mengen (50-100 %), jedoch mit qualitativem Defekt expremiert (Übersicht: Caen und Rosa, 1995).

Heute sind bei GPIIb 27 und bei GPIIIa 23 genetische Defekte beschrieben, die Ursache der Thrombasthenie Glanzmann sind (Morel-Kopp et al., 1997; Grimaldi et al., 1998). Die Mehrheit dieser Defekte führt zu ein Typ I-Thrombasthenie Glanzmann, welcher durch *Nonsense*-Mutationen (Verschiebung des Leserasters) verursacht wird, die das pre-mRNA-*splicing* beeinflussen. Auf diese Weise kommt es zur Bildung von unstablen mRNA-Transkripten oder zur Produktion von unstablen oder verkürzten Proteinprodukten.

Eines der interessantesten Merkmale der Thrombasthenie Glanzmann ist der übereinstimmende Defekt sowohl im GPIIb als auch im GPIIIa. Die Erklärung dazu wird von den Erkenntnissen von O'Toole und Mitarbeitern (1989) geliefert. Sie zeigten, dass eine effiziente Oberflächenexpression des GPIIb/IIIa-Komplexes beide Untereinheiten benötigt. So führt die Abwesenheit eines Polypeptids (z.B. GPIIIa), die auf eine Veränderung des zugehörigen Gens zurückzuführen ist, zur Instabilität und Degradation des anderen Polypeptids (GPIIb), weil dieses keinen Komplex mit dem Partner eingehen kann. Auch könnte die Veränderung eines Gens mit der Expression des anderen Gens vor dem Translationsschritt interferieren.

Dies könnte denkbar sein, da die beiden Gene gemeinsam auf Chromosom 17 liegen und durch koordinierende regulatorische Elemente verbunden sein könnten (Übersicht bei Caen und

Rosa, 1995). Basierend auf diesen Kenntnissen der Defekte in der Biosynthese der beiden Glykoproteine wurde noch ein weiterer Klassifizierungsvorschlag unterbreitet (Kato et al., 1992). Nach diesem wird unterschieden zwischen Defekten, die bereits vor der Zusammenlagerung des pro GPIIb und des GPIIIa zum pro GPIIb/IIIa-Komplex wirksam werden (*preassembly defects*) und Defekten, die noch die Bildung eines stabilen Heterodimers zulassen (*postassembly defects*). Diese Klassifizierung berücksichtigt mehr die molekulare Basis der Thrombasthenie Glanzmann. Eine Dysfunktion des  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin auf der Thrombozytenoberfläche führt zu einer Verminderung der Fibrinogenbindung und Thrombozytenaggregation. Die Thrombasthenia Glanzmann ist u.a. durch eine normale Thrombozytenzahl bei pathologischer Thrombozytenaggregation gekennzeichnet. Im Gegensatz zu anderen hämorrhagischen Diathesen treten Blutungen selten spontan, sondern meist nach kleineren Traumen auf. Häufige Symptome der Patienten sind Purpura, Nasenbluten, Zahnfleischbluten und Menorrhagien (Übersicht bei George, 1990).

Durch molekulargenetische Untersuchungen wurden bei der Thrombasthenia Glanzmann verschiedene Defekte sowohl des Gens der  $\alpha_{IIb}$ -Untereinheit als auch der  $\beta_3$ -Untereinheit nachgewiesen. Bei Typ I-Defekten wurden meist Insertionen oder seltener Deletionen gefunden, bei Typ III-Defekten hingegen Punktmutationen (Übersicht bei Newman, 1991).

#### 2.2.3.5. GPIIIa Allele

GPIIIa ist eines der polymorphesten Moleküle auf der Plättchenoberfläche. Gegenwärtig sind für GPIIIa neun Allele im humanen Gen-*pool* bekannt und für GPIIb sind drei beschrieben (Tabelle 3). Diese einzelnen Allele sind für die Expression einzelner Epitope auf dem entsprechenden GP verantwortlich (Übersicht bei Santoso und Kiefel, 1998).

Populationsstudien in unterschiedlichen ethnischen Gruppen sowie vergleichend Evolutionsstudien zwischen verschiedenen Spezies zeigten, dass die häufigste allele Form des GPIIIa (*GP3A\*1*) das Ur-Allel repräsentiert, von dem alle anderen Allele abstammen (Übersicht: Newman und Valentin, 1995). Dieses Ur-Allel wurde im Laufe der Zeit durch acht unabhängige Mutationsereignisse verändert, woraus die anderen Allele (*GP3A\*2-9*) resultieren (Übersicht: Santoso und Kiefel, 1998).

Das *GP3A\*1*-Allel kodiert für die GPIIIa-Isoform, die außer dem HPA-1a-Epitop (Leu<sub>33</sub>) noch das Yuk<sup>b</sup>-Epitop (Arg<sub>143</sub>) und möglicherweise auch noch andere antigene Determinanten (Ca<sup>b</sup>, Mo<sup>b</sup>, Sr<sup>b</sup>, La<sup>b</sup>, Gro<sup>b</sup>) aufweist. Eine Substitution der Aminosäure Leucin an Position 33 durch die Aminosäure Prolin bewirkt die Ausbildung des HPA-1b-Epitops. Diese GPIIIa-Isoform trägt außerdem das Yuk<sup>b</sup>-Epitop.

Das *GP2B\*1*-Allel ist das häufigste Allel in Kaukasiern (Kiefel et al., 1993), nicht aber in der asiatischen Bevölkerung (Santoso et al., 1993). Ein ähnliches Evolutionsmodell führte zu der Hypothese, daß das *GP2B\*2*-Allel (es ist das häufigste Allel bei Indonesiern, Chinesen und Japanern) das Ur-Allel repräsentiert, von dem die *GP2B\*1*- und *GP2B\*3*-Allele abstammen.

Alle diese Allele der Gene von GPIIb und GPIIIa bewirken die Expression von unterschiedlichen Epitopen auf dem zugehörigen Glykoprotein und sind damit die Grundlage immunogener Strukturen, die unter bestimmten Umständen zur Bildung von Alloantikörpern führen können und damit klinische Bedeutung erlangen.

GP3A	GP3a Allele	GP3a Isoformen	Frequenz	Antigen-determinanten
GP3A*1	T <sub>196</sub> G <sub>281</sub> G <sub>526</sub> C <sub>1317</sub> G <sub>1564</sub> (AAG <sub>1931</sub> )G <sub>1996</sub> C <sub>2004</sub>	Leu <sub>33</sub> Arg <sub>62</sub> Arg <sub>143</sub> Pro <sub>407</sub> Arg <sub>489</sub> Lys <sub>611</sub> Arg <sub>633</sub> Arg <sub>636</sub>	0.834	PI <sup>A1</sup> (1a), Yuk <sup>b</sup> (4a)
GP3A*2	C <sub>196</sub> G <sub>281</sub> G <sub>526</sub> C <sub>1317</sub> G <sub>1564</sub> (AAG <sub>1931</sub> )G <sub>1996</sub> C <sub>2004</sub>	<b>Pro</b> <sub>33</sub> Arg <sub>62</sub> Arg <sub>143</sub> Pro <sub>407</sub> Arg <sub>489</sub> Lys <sub>611</sub> Arg <sub>633</sub> Arg <sub>636</sub>	0.116	PI <sup>A2</sup> (1b), Yuk <sup>b</sup> (4a)
GP3A*3	T <sub>196</sub> G <sub>281</sub> <b>A</b> <sub>526</sub> C <sub>1317</sub> G <sub>1564</sub> (AAG <sub>1931</sub> )G <sub>1996</sub> C <sub>2004</sub>	Leu <sub>33</sub> Arg <sub>62</sub> <b>Gln</b> <sub>143</sub> Pro <sub>407</sub> Arg <sub>489</sub> Lys <sub>611</sub> Arg <sub>633</sub> Arg <sub>636</sub>	<0.001	PI <sup>A1</sup> (1a), Yuk <sup>a</sup> (4b)
GP3A*4	T <sub>196</sub> G <sub>281</sub> G <sub>526</sub> C <sub>1317</sub> <b>A</b> <sub>1564</sub> (AAG <sub>1931</sub> )G <sub>1996</sub> C <sub>2004</sub>	Leu <sub>33</sub> Arg <sub>62</sub> Arg <sub>143</sub> Pro <sub>407</sub> <b>Gln</b> <sub>489</sub> Lys <sub>611</sub> Arg <sub>633</sub> Arg <sub>636</sub>	0.003	PI <sup>A1</sup> (1a), Yuk <sup>b</sup> (4a), Ca <sup>a</sup> (6bW)
GP3A*5	T <sub>196</sub> G <sub>281</sub> G <sub>526</sub> <b>G</b> <sub>1317</sub> G <sub>1564</sub> (AAG <sub>1931</sub> )G <sub>1996</sub> C <sub>2004</sub>	Leu <sub>33</sub> Arg <sub>62</sub> Arg <sub>143</sub> <b>Ala</b> <sub>407</sub> Arg <sub>489</sub> Lys <sub>611</sub> Arg <sub>633</sub> Arg <sub>636</sub>	0.001	PI <sup>A1</sup> (1a), Yuk <sup>b</sup> (4a), Mo <sup>a</sup> (7bW)
GP3A*6	T <sub>196</sub> G <sub>281</sub> G <sub>526</sub> C <sub>1317</sub> G <sub>1564</sub> (AAG <sub>1931</sub> )G <sub>1996</sub> <b>T</b> <sub>2004</sub>	Leu <sub>33</sub> Arg <sub>62</sub> Arg <sub>143</sub> Pro <sub>407</sub> Arg <sub>489</sub> Lys <sub>611</sub> Arg <sub>633</sub> <b>Cys</b> <sub>636</sub>	<0.001	PI <sup>A1</sup> (1a), Yuk <sup>b</sup> (4a), Sr <sup>a</sup> (8bW)
GP3A*7	T <sub>196</sub> <b>A</b> <sub>281</sub> G <sub>526</sub> C <sub>1317</sub> G <sub>1564</sub> (AAG <sub>1931</sub> )G <sub>1996</sub> C <sub>2004</sub>	Leu <sub>33</sub> <b>Gln</b> <sub>62</sub> Arg <sub>143</sub> Pro <sub>407</sub> Arg <sub>489</sub> Lys <sub>611</sub> Arg <sub>633</sub> Arg <sub>636</sub>	<0.001	PI <sup>A1</sup> (1a), Yuk <sup>b</sup> (4a), La <sup>a</sup> (10bW)
GP3A*8	T <sub>196</sub> G <sub>281</sub> G <sub>526</sub> C <sub>1317</sub> G <sub>1564</sub> (AAG <sub>1931</sub> ) <b>A</b> <sub>1996</sub> C <sub>2004</sub>	Leu <sub>33</sub> Arg <sub>62</sub> Arg <sub>143</sub> Pro <sub>407</sub> Arg <sub>489</sub> Lys <sub>611</sub> <b>His</b> <sub>633</sub> Arg <sub>636</sub>	<0.001	PI <sup>A1</sup> (1a), Yuk <sup>b</sup> (4a), Gro <sup>a</sup> (11bW)
GP3A*9	C <sub>196</sub> G <sub>281</sub> G <sub>526</sub> C <sub>1317</sub> G <sub>1564</sub> <b>A</b> (AAG <sub>1931</sub> )G <sub>1996</sub> C <sub>2004</sub>	<b>Pro</b> <sub>33</sub> Arg <sub>62</sub> Arg <sub>143</sub> Pro <sub>407</sub> Arg <sub>489</sub> <b>Δ</b> Lys <sub>611</sub> Arg <sub>633</sub> Arg <sub>636</sub>	<0.001	PI <sup>A2</sup> (1a), Yuk <sup>b</sup> (4a), Oe <sup>a</sup> (11bW)

Tabelle 3: Allele der Plättchenmembrannglykoproteine, die eine Neonatale Alloimmunthrombozytopenie verursachen können. Gen-Frequenz in Kaukasier (Kiefel et al., 1993; Kekomäki et al., 1993; Simsek et al., 1994).

## 2.3. Neonatale Alloimmunthrombozytopenie

### 2.3.1. Neonatale Alloimmunthrombozytopenie beim Menschen

Die NAIT ist eine Erkrankung des Feten oder Neugeborenen. Charakteristisch ist eine Thrombozytopenie mit oder ohne Zeichen verstärkter Blutungsneigung. Ursachen sind die Immunisierung der Mutter gegen fetale Thrombozytenalloantigene und der nachfolgende diaplazentare Übertritt von Antikörpern in den kindlichen Kreislauf. Die Antikörper führen zu einem gesteigerten Abbau der kindlichen Thrombozyten im retikuloendothelialen System (RES), der sich in verminderter Thrombozytenzahlen und hämorrhagischen Symptomen bis hin zu lebensbedrohlichen zerebralen Blutungen äußert (Übersicht bei Kiefel et al., 1994).

#### 2.3.1.1. Pathogenese

Die Erkrankung beruht auf einer fetomaternalen Inkompatibilität bezüglich plättchenspezifischer Antigene. Bereits vor der 18. Schwangerschaftswoche (SSW) gelangen fetale Thrombozyten diaplazentar in den mütterlichen Kreislauf. Ist der Fetus Träger eines paternalen Thrombozytenantigens, das der Mutter fehlt, kann der mütterliche Organismus immunisiert werden. Als Folge der Immunisierung werden mütterliche Antikörper der Klasse IgG gebildet, die diaplazentar in den fetalen Kreislauf übertreten. Der Abbau der antikörperbeladenen fetalen Thrombozyten im RES führt intrauterin oder postnatal zu einer Thrombozytopenie mit oder ohne Blutungsneigung. Die Pathogenese der NAIT gleicht dem ohne Blutungsneigung. Die Pathogenese der NAIT gleicht dem immunologisch bedingten Morbus haemolyticus neonatorum, obgleich die NAIT oft ohne vorhergehende Schwangerschaft oder Transfusion auftritt. Ein möglicher Grund dafür ist die frühzeitige Immunisierung (Übersicht bei Mueller-Eckhardt et al., 1996).



### 2.3.1.2. Vorkommen und Häufigkeit

Anfang der 50er Jahre wurden erstmals typische Fälle einer kongenitalen Immuntrombozytopenie beschrieben. Van Loghem et al. konnten 1959 den ersten Antikörper gegen ein plättchenspezifisches Alloantigen, HPA-1a (PI<sup>A1</sup>), definieren, der im Serum einer Patientin mit posttransfusionelle Purpura (PTP) nachgewiesen worden war. Grundlegende pathophysiologische Untersuchungen über den Einfluß von Alloantikörpern auf die Thrombozytenelimination wurden 1964 von Shulman et al. durchgeführt. Die Häufigkeit klinisch manifester Fälle von NAIT in der deutschen Bevölkerung liegt heute bei 1:2000 – 1:5000. Blande oder asymptomatisch verlaufende Fälle sind wesentlich häufiger. In einer Studie aus unserem Institut (Mueller-Eckhardt et al., 1996) besaßen zwei von 1211 Schwangeren HPA-1a-Antikörper und thrombozytopenische Kinder, was einer relativen Häufigkeit von 0,17% entspricht. Als Ursache von Alloimmunthrombozytopenie in der weißen Bevölkerung ist mit etwa 80% der HPA-1a-Antikörper am häufigsten vertreten. Der HPA-5b-Antikörper (Br<sup>a</sup>) ist mit etwa 15% am zweithäufigsten beteiligt, alle anderen Antikörperspezifitäten machen zusammen nur etwa 5% aus.

### 2.3.1.3. Klinik

Die klinische Verdachtsdiagnose wird gestellt, wenn eine gesunde Mutter ohne anamnestische Hinweise auf eine Blutungsneigung ein thrombozytopenisches Kind mit oder ohne Zeichen verstärkter Blutungsneigung gebiert und andere Ursachen für eine Thrombozytopenie ausgeschlossen werden können. Etwa die Hälfte aller Fälle tritt bereits während der ersten Schwangerschaft auf. Bei Mehrgebärenden muß stets danach gefragt werden, ob bei früheren Entbindungen ein Kind thrombozytopenisch war, beziehungsweise eine Blutungsneigung hatte.

Frühgeborene und Kinder mit geringem Geburtsgewicht (< 2500 g) sind unter den Betroffenen signifikant gehäuft. Hämorrhagische Zeichen können von Geburt an bestehen oder sich innerhalb der ersten 24-36 Lebensstunden entwickeln. Häufig werden Petechien oder Ekchymosen im Bereich des Körperstamms sowie Hämatome an mechanisch belasteten Stellen (Kopfschwarte, Gesäß, Inguinalfalten) gefunden. Die Thrombozytenzahl sinkt post partum rasch ab. Blutungen aus dem Magen-Darm-Trakt in Form von Melaena neonatorum oder blutigem Aspirat aus der Magensonde kommen in etwa 20% der Fälle vor. Urogenitalblutungen werden seltener beobachtet. Leber- und Milzvergrößerungen fehlen bei den Neugeborenen stets. Von größter klinischer Bedeutung sind intrazerebrale Blutungen, mit denen in ungefähr 10-20% der Fälle zu rechnen ist (Kiefel et al., 1994; Mueller-Eckhardt, 1996). Etwa die Hälfte aller intrazerebralen Blutungen treten bereits in utero auf, offenbar meistens nach der 28.-30. SSW. Wenn es nicht zum Fruchttod kommt, können sich aus den Blutungsherden große porenzephalische Zysten mit Degeneration des umgebenden Gehirngewebes entwickeln (Kuijpers et al., 1994; Govaert et al., 1995). Postnatal können größere Blutungen zu einem posthämorrhagischen Hydrozephalus führen. Viele der Kinder tragen lebenslange, zum Teil schwerste neurologische Schäden wie spastische Lähmungen oder Blindheit infolge Optikusatrophie davon. Langzeitfolgen treten mit gleicher Häufigkeit auf wie Letalität (5-10%). Die Schwere der Blutungsneigung, beziehungsweise der Thrombozytopenie hängt auch von der Antikörperspezifität ab. Antikörper, die gegen Antigene auf dem GPIIb/IIIa-Komplex (zB. anti-Pl<sup>A1</sup>/HPA-1a) gerichtet sind, verursachen in der Regel ein schwereres Krankheitsbild als Antikörper gegen GPIa/IIa (zB. anti-Br<sup>a</sup>/HPA-5b). Es ist anzunehmen, dass dies mit der viel niedrigeren Zahl von Antigenbindungsstellen des Br<sup>a</sup>-Antigens auf dem GPIa/IIa-Komplex (etwa 2000 pro Plättchen) im Vergleich zum HPA-1a-Antigen auf dem GPIIb/IIIa-Komplex (etwa 40000 pro Plättchen) zusammenhängt.

Die Dauer der Blutungsneigung, beziehungsweise der Thrombozytopenie, wird beeinflusst von der Eliminationsrate der antikörperbeladenen Thrombozyten im RES, von der kompensatorischen Neubildung der Thrombozyten im Knochenmark und von der Therapie. Ohne Therapie kommt es meistens innerhalb von 3-8 Wochen zur Normalisierung der Thrombozytenwerte (Mueller-Eckhardt et al, 1996).

#### 2.3.1.4. Diagnose

Das klinische Erscheinungsbild läßt nur die Verdachtsdiagnose NAIT zu. Der einzige auffällige Laborwert ist die Thrombozytopenie. Als Folge stärkerer Blutungen können vorübergehend Anämie und Hyperbilirubinämie auftreten. Die Beurteilung der Megakaryozytenzahl im Knochenmark kann keine eindeutigen Hinweise auf eine NAIT liefern, weil sie sowohl normal als auch erhöht oder erniedrigt sein kann (Übersicht bei Mueller-Eckhardt et al., 1996).

Eine gesicherte Diagnose konnte früher nur durch den Nachweis eines auslösenden Antikörpers erfolgen. Durch Verwendung markierter anti-Human-Antikörper zum Nachweis plättchenreaktiver Antikörper wurden empfindliche Methoden wie der Plättchensuspensionsimmunfluoreszenztest (von dem Borne et al., 1978) und dessen Modifikation, der Adhäsionstest (Schneider und Schnaidt, 1981), entwickelt. Heute werden Verfahren benützt, die eine Bestimmung des von einem Antikörper erkannten Epitops ermöglichen. Mit den klassischen immunchemischen Methoden wie Radioimmunpräzipitation (Santoso et al., 1989a) und Immunoblot (van der Schoot et al., 1986) können Antigene durch eine Messung des Molekulargewichts in der SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese) erkannt werden. Wegen seiner Zuverlässigkeit und Empfindlichkeit hat sich in der praktischen serologischen Diagnostik ein glykoproteinspezifischer Immuntest, *monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens* (MAIPA) (Kiefel et

al.,1987a), durchgesetzt, in dem mittels monoklonaler Antikörper einzelne Plättchenglykoproteine fixiert und nachgewiesen werden.

Im Zusammenhang mit NAIT wurde die Entdeckung sehr seltener Antigene dadurch möglich, dass bei der Untersuchung des mütterlichen Serums die Thrombozyten des Vaters als Testzellen eingesetzt wurden (Übersicht bei Kiefel et al., 1994).

Die Durchführung der immunologischen Nachweismethoden setzt die Verfügbarkeit von Seren mit definierten thrombozytären Antikörpern voraus. Neue Alternativen bieten molekularbiologische Untersuchungsmethoden (PCR-RFLP, PCR-SSP oder SSCP), die nach der Aufklärung der zugrundeliegenden genetischen Plättchenpolymorphismen eine Typisierung aus genomischer DNA ermöglichen (Kroll et al., 1998).

#### 2.3.1.5. Therapie

In der Behandlung der NAIT ist zu unterscheiden zwischen dem pränatalen diagnostischen und therapeutischen Vorgehen bei einer bereits bekannten, beziehungsweise vermuteten fetalen Alloimmunthrombozytopenie und der postnatalen Therapie der erstmalig auftretenden oder diagnostizierten NAIT.

##### **Pränatale Behandlung:**

Jede Schwangerschaft einer Frau, in deren Vorgeschichte eine NAIT auftrat, muß als Risikoschwangerschaft eingestuft werden. Das größte Risiko für das Kind stellen intrazerebrale Blutungen dar, die in etwa der Hälfte der Fälle bereits intrauterin auftreten. Empfehlenswert ist die Entnahme einer fetalen Blutprobe in der 20.-22. SSW durch perkutane Nabelschnurpunktion. Aus der Blutprobe werden anschließend die Thrombozytenzahl und der fetale und der paternale Genotyp des betroffenen Plättchenantigensystems bei heterozygotem Vater bestimmt. Aus der Thrombozytenzahl läßt sich das Blutungsrisiko abschätzen. Eine

erfolgversprechende Blutungsprophylaxe kann mit einer ausreichenden intrauterinen Transfusion von kompatiblen Thrombozyten an den Feten betrieben werden (Kroll et al., 1994), wobei wegen der relativ kurzen Überlebenszeit der Plättchen einer Vielzahl von Punktionen nötig ist. Die Mutter wird zusätzlich mit hochdosiertem intravenösen Immunglobulin (IgG) behandelt. Bei stark thrombozytopenischen Kindern wird die Entbindung durch Sectio caesarea empfohlen.

#### **Postnatale Behandlung:**

Bei schwerer Blutungsneigung, bei Verdacht intrazerebrale Blutungen, bei Thrombozytenzahlen unter 30000/ $\mu$ l oder bei rasch fallenden Thrombozytenzahlen ist die Gabe von mütterlichen, vom Plasma vollständig abgetrennten Plättchen oder kompatiblen Spenderthrombozyten indiziert (Übersicht bei Kiefel et al., 1994). In Abhängigkeit von der Entwicklung der Thrombozytenzahlen ist die Transfusion eventuell mehrfach zu wiederholen. Eine Alternative bietet die Gabe von hochdosiertem intravenösen IgG (Mueller-Eckhardt et al., 1989).

### 2.3.2. Neonatale Alloimmunthrombozytopenie beim Tier

Die NAIT ist in der Tierwelt bisher beim Saugferkel und beim Fohlen beschrieben worden. Die Bezeichnung „thrombozytopenische Purpura“ (TP) wird dabei synonym verwendet. Charakteristisch ist eine ausgeprägte Blutungsneigung, welche den Tod eines oder aller Neugeborenen zur Folge hat.

#### 2.3.2.1. Pathogenese

Die Ursache der Erkrankung ist auf eine Thrombozyteninkompatibilität zurückzuführen. Die Mutter wird gegen paternale Thrombozytenantigene immunisiert, indem in der späten

Trächtigkeit oder unter der Geburt fetale Thrombozyten durch Schädigung fetaler Gefäße in den maternalen Kreislauf gelangen (Schmidt et al., 1977; Dimmock et al., 1982). Bei erneuten Trächtigkeiten nach Anpaarung derselben Elterntiere steigen die maternalen Antikörper gegen fetale Thrombozyten an. Deshalb tritt das Krankheitsbild frühestens ab der zweiten Trächtigkeit in Erscheinung.

Schweine und Pferde besitzen eine Plazenta epitheliochorialis, bei der eine diaplazentare Antikörperübertragung nicht möglich ist. Die Feten werden gesund geboren und haben vor der Kolostrumaufnahme normale Thrombozytenzahlen (Lie, 1968). Entscheidend für die Ausbildung einer NAIT ist die Aufnahme von Thrombozytenalloantikörpern der Klasse IgG (Nielsen et al., 1973) mit dem Kolostrum während der ersten 48 h (Lie, 1968), was durch Kreuzsäugeversuche bewiesen wurde (Saunders und Kinch, 1968; Hall et al., 1972). Lie berichtete 1968, dass die thrombozytopenische Purpura (TP) schon 6 h post partum auftrat, wohingegen Saunders und Kinch (1968) einen Erkrankungszeitraum vom zweiten bis 30. Lebenstag angaben, mit Höhepunkten am dritten und 14. Tag. Es besteht beim Schwein kein Zusammenhang zwischen der Wurfgröße und der Anzahl der erkrankten Tiere (Saunders und Kinch, 1968; Andersen und Nielsen, 1973). Gemäß den Untersuchungen von Nielsen et al. (1973) sind Morbidität und Mortalität hoch. (70-100%). Der Schweregrad der Erkrankung hängt von der Menge der aufgenommenen Alloantikörper ab. Die Alloantikörper wirken zytotoxisch auf die Megakaryozyten im Knochenmark und führen zu einer biphasischen Thrombozytopenie. In den ersten zwei Lebenstagen sinkt die Thrombozytenzahl stark ab. Nach einem leichten Anstieg in den folgenden Tagen kommt es in der zweiten Lebenswoche zu einem erneuten starken Abfall. Der erste Abfall der Thrombozytenzahl ist bedingt durch die direkte Reaktion des Alloantikörpers mit den Thrombozyten im Blut. Es bilden sich intravasale Plättchenagglutinate, die durch das Komplementsystem lysiert und durch das RES in Milz und Leber abgebaut werden. Ferner ist die Lebensdauer der Blutplättchen nach Bindung an

Antikörper herabgesetzt, so dass sie schneller im RES abgebaut werden. Der kurzfristige Anstieg der Thrombozytenzahl nach einigen Tagen ist damit zu erklären, dass einerseits nach der Auflösung der Agglutinate Plättchen freigesetzt werden und andererseits Ersatzthrombozyten von nicht geschädigten Megakaryozyten im Knochenmark gebildet werden. Da die Lebensdauer der Thrombozyten acht bis elf Tage beträgt, führt die eingeschränkte beziehungsweise unterbliebene Neubildung von Plättchen durch die geschädigten Megakaryozyten im Knochenmark zum erneuten Abfall der Thrombozytenzahl in der zweiten Woche (Lie, 1968; Andersen und Nielsen, 1973). Letztere Autoren beschrieben jedoch einen Fall, in dem thrombozytopenische Purpura (TP) und Knochenmarkalterationen schon vor der Kolostrumaufnahme bei einem Ferkel auftraten. Es wurde spekuliert, dass die Alloantikörper gelegentlich doch durch die Plazenta in den fetalen Kreislauf treten können.

Die Diagnose im Fall der NAIT des Quarter-Horse-Fohlens erfolgte durch den Nachweis von Immunglobulinen der Klasse IgG in Plasma, Serum und Milch der Mutter (Buechner-Maxwell et al., 1977). Die Alloantikörper reagierten mit Thrombozyten des erkrankten Fohlens und seines ein Jahr älteren Vollbruders, nicht aber mit Thrombozyten von Kontrolltieren.

#### 2.3.2.2. Vorkommen und Häufigkeit

Zu Beginn der 60er Jahre wurden die ersten Fälle von thrombozytopenischer Purpura (TP) beim Saugferkel in Norwegen von Stormorken et al. (1963) beschrieben. Das Serum der betroffenen Muttersau wurde gegen die Thrombozyten von 300 Schlachthofschweinen getestet, wobei eine Agglutination bei 87% der Tiere auftrat. In der Veterinärpathologie Oslo wurden zwischen 1960 und 1963 acht betroffene Würfe gemeldet und von Nordstoga (1965) untersucht. Saunders und Kinch beschrieben 1968 eine Sammeluntersuchung über zehn Jahre in Großbritannien, wobei 51 Fälle vermerkt worden waren. Die NAIT trat in den meisten

Fällen bei Anpaarungen von Landrasse-Sauen, beziehungsweise Kreuzungen aus Landrasse-Sauen mit Large-White-Ebern (Yorkshire-Ebern) auf. Bei den erkrankten Ferkeln waren beide Geschlechter gleich häufig betroffen. Die Erkrankung trat bevorzugt beim vierten oder fünften Wurf einer Sau auf, niemals aber schon beim ersten Wurf. 1968 unternahm Lie Anpaarungsversuche zwischen einer norwegischen Landrasse-Sau und einem Yorkshire-Eber, deren Ferkel ebenfalls an thrombozytopenischer Purpura (TP) erkrankten. Die Ursprünge wurden in der schwedischen Landrasse vermutet, die einen großen Einfluß auf die norwegische Landrasse besaß. Zu Beginn der 70er Jahre wurden von Svenkerud (1972) Fälle aus Dänemark und Schweden berichtet. Hall et al. beschrieben 1972 das Krankheitsbild bei den Ferkeln aus der Anpaarung einer Landrasse-Sau mit einem Large-White-Eber. In Dänemark wurden zwischen 1970 und 1971 20 erkrankte Würfe untersucht (Andersen und Nielsen, 1973).

Nielsen et al. berichteten 1973 von 16 erkrankten Würfen in Dänemark zwischen 1968 und 1972, wobei auffällig war, dass die Erkrankung nie beim ersten Wurf einer Sau auftrat. Schmidt et al. veröffentlichten 1974, dass in Deutschland die Erkrankung in fünf Jahren nur bei (TP) zum ersten Mal zwischen 1971 und 1973 bei drei aufeinanderfolgenden Würfen auf einem Hof mit schwedischen Schweinen auf (Häni, 1976). In Australien wurde die NAIT 1982 bei den Ferkeln aus der Anpaarung eines Large-White-Ebers mit einer Landrasse-Sau bekannt (Dimmock et al., 1982).

Der bisher einzige diagnostizierte Fall einer NAIT beim Pferd wurde 1997 von Buechner-Maxwell et al. aus Michigan, USA beschrieben. Die Erkrankung trat bei einem neugeborenen Quarter-Horse-Fohlen aus der zweiten Anpaarung derselben Eltern auf.



### 2.3.2.3. Diagnose

Die Verdachtsdiagnose einer thrombozytopenischer Purpura (TP) beim Schwein stützt sich auf die charakteristischen Hautveränderungen und den Vorbericht der mehrmaligen Anpaarung derselben Elterntiere. Die Blutungszeit ist verlängert (Schmidt et al., 1977) und die Thrombozytenzahl stark verringert.

Bei Agglutinationstests reagieren die Alloantikörper aus dem Blutserum und der Molke der betroffenen Muttersau mit den Thrombozyten eigener Ferkel und auch fremder Tiere (Stormorken et al., 1963; Nielsen et al., 1973). Ferkelthrombozyten wurden nicht vom Serum des Vaters agglutiniert (Saunders und Kinch, 1968). Linklater stellte 1975 den Antiglobulin-Konsumptionstest als Diagnostikum der NAIT vor. Mit Hilfe fluoreszenzserologischer Untersuchungsmethoden konnten Schmidt et al. (1977) zeigen, dass Thrombozytenausstriche nach Inkubation mit Sauenserum beziehungsweise Molke im indirekten Immunfluoreszenztest eine starke Fluoreszenz ergaben. In Ausstrichpräparaten von Ferkelknochenmarkszellen wiesen Megakaryozyten ebenfalls deutliche Fluoreszenz auf. Bei der histologischen Untersuchung des Knochenmarks konnte die Degeneration der Megakaryozyten nachgewiesen werden. Als Differentialdiagnosen müssen Vergiftungen mit Cumarin-Derivaten, europäische Schweinepest und Infektionen mit *Clostridium perfringens*, Streptokokken, *E. coli* oder *Erysipelothrix rhusiopathiae* ausgeschlossen werden (Nordstoga, 1965; Andersen und Nielsen, 1973; Nielsen et al., 1973; Schmidt et al., 1974). Eine thrombozytopenische Purpura (TP) kann auch ausgelöst werden durch die alte Kristallviolett-Vakzine zur Schweinepestprophylaxe (Nordstoga, 1965).

#### 2.3.2.4. Therapie

Bei Ferkeln aus gefährdeten Würfen kann die Erkrankung verhindert werden, wenn die Kolostrumaufnahme an der eigenen Muttersau unterbunden wird und die Ferkel statt dessen künstlich oder mit einer Amme aufgezogen werden. Nachgewiesen wurde dies durch Kreuzsäugeversuche von Lie (1968) sowie von Saunders und Kinch (1968). Letztere Autoren erwähnten die Möglichkeit, eine Vollbluttransfusion intraperitoneal von einem gesunden Schwein durchzuführen, was unter Feldbedingungen jedoch nicht praktikabel erscheint. Linklater et al. (1973) berichteten, dass die Thrombozyten ohne Therapie Normalwerte von etwa 300000/ $\mu$ l nach 3-4 Wochen erreichen.

Das erkrankte Fohlen (Buechner-Maxwell et al., 1997) wurde künstlich über eine Nasenschlundsonde ernährt und mit einem Thrombozytenkonzentrat eines Spenderpferdes, welches vorher gegen das mütterliche Serum getestet worden war, transfundiert. Ferner erhielt das Fohlen eine antibiotische und antiphlogistische Behandlung.

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Material

#### 3.1.1. Geräte

Vortex: VF2, Janke & Kunkel, Staufen

Zellzähler: Sysmex Microcellcounter CC-130, Digitana Hamburg

Zentrifuge: Biofuge A und Biofuge 22 R, Heraeus, Hanau

Rotixa/A und Rotanta/TRC, Hettich, Tuttlingen

Pipetten: Firma Hirschmann, Eberstadt

Magnetrührer: Ikamag RET, Firma Janke & Kunkel, Staufen

Durchflußzytometer: Firma Ortho Diagnostic, Neckargemünd

Rotator: Roto-Rack, Firma Fisher Scientific, Kirchheim

Vakuumentrifuge: Firma Keutz, Reiskirchen

Schüttelwasserbad: Julabo SW-21C, Labortechnik GMBH, Seelbach/Schwarzwald

Brutschrank (37 °C; CO<sub>2</sub>-Begasungsrate 5 %): Heraeus, Hanau

Mikroskop: Leitz, Wetzlar

Sterilbank: Hera Safe, Heraeus, Hanau

#### 3.1.2. Kleinmaterial

Blue Caps: 15ml and 50 ml; Falcon, Heidelberg

Sterile Pipette: 1 ml, 10 ml, 25 ml; Greiner, Frickenhausen

Pipettenspitzen: Safe Seal-Tips 1000 µl, 100 µl, 10 µl, Firma Biozym, Oldendorf

Combitips: Eppendorf, Hamburg

Pipette und Multipipette: Eppendorf, Hamburg

Eppendorf Reaktionsgefäß: Safe-lock; Eppendorf, Hamburg

Filterpapier: Schleicher and Schüll, Dossel

Kulturflaschen: Multi well, 6- Loch, 24- Loch; Falcon, Heidelberg

Petrischalen: Gewebekulturpetrischalen Optilux; Falcon, Heidelberg

Gewebekulturplatten: Falcon 35 3003, Becton Dickinson Labware, England

Einfrierröhrchen: Nunc, Inter Med

Sterilfilter: 0,2 µm und 0,45 µm; Sartorius, Göttingen

White caps: 12 ml; Greiner, Frickenhausen

ELISA Mikrotiterplatten: Firma Greiner, Nürtingen

### 3.1.3. Chemikalien und Biochemikalien

Zur Herstellung von Puffern und Lösungen wurden Chemikalien der Firmen Merck (Darmstadt) und Gibco BRL (Eggenstein) verwendet. Die übrigen Reagenzien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Boehringer (Ingelheim), Pharmacia Biotech (Freiburg) und New England Biolabs (Schwalbach) bezogen.

Für einige Arbeitsschritte wurden folgende Reagenzien benötigt:

Lipofectin: Gibco, Karlsruhe, Deutschland

OptiMEM: Gibco, Karlsruhe, Deutschland

MEM ALPHA mit Gluta-max-I: PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich

Fetales Kälberserum (FKS): Fisher Scientific, Nidderau

Natriumpyruvat, 100 mM: Gibco/BRL, Eggenstein

Penicillin/Streptomycin, 10000 U/ml: Gibco/BRL, Eggenstein

Geneticin: G 418, Gibco/BRL, Eggenstein

Zeocin: Invitrogen, Groningen, Niederlande

D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) ohne Kalsium und Magnesium: Gibco, Eggenstein

Trypsin/EDTA: Gibco, Eggenstein

Fibrinogen: Calbiochem-Novabiochem, Hofheim

#### 3.1.4. Monoklonale Antikörpern (mAk)

MAk Gi5 und Gi16 (anti-GPIIb/IIIa bzw. GPIIb) sowie Gi14 (anti-GPIa/IIa) wurden von Dr. Sentot Santoso, Gießen hergestellt.

Kaninchen-anti-Maus-IgG und anti-Human-IgG wurden von Dako, Hamburg, geliefert.

#### 3.1.5. Stabile HPA-1a- und HPA-1b-Zelllinien

Zur Herstellung von stabilen Zelllinien wurden CHO-Zellen („Chinese Hamster Ovary“) mit Expressionsvektoren transfektiert, in denen die gesamte kodierende GPIIb- und GPIIIa-cDNA eingebaut waren. Die CHO-Zelllinie hat eine epithelähnliche Morphologie und wurde aus den Ovarzellen eines chinesischen Hamsters entwickelt.

Um rekombinante HPA-1a-bzw. HPA-1b-Alloantigene zu exprimieren, wurden zwei allelspezifische GPIIIa Expressionvektoren mit Zeocycin-Resistenzgen, die sich nur um eine Base unterscheiden (Lysin oder Prolin an der Position 33), konstruiert. Zur Erleichterung der Klonierung von stabilen Zellen, wurden die Zellen mit dem GPIIb-Konstrukt kotransfiziert, welcher Neomycin-Resistenzgen (pRC/RSV neo) besitzt.

#### 3.1.6. Allelspezifische GPIIb- und GPIIIa-Konstrukte

Die in der Arbeit verwendeten Konstrukte wurden von Frau Dipl. biol. Ina Richter in unserer Arbeitsgruppe hergestellt. Die Ausgangsplasmide, welche die full length-cDNA von GPIIIa

bzw. GPIIb im Vektor pcDNA 3 (freundlichst zur Verfügung gestellt von Dr. Peter Newman) enthielten, wurden durch Transformation in *Escherichia coli*-Bakterien (*E. coli*) eingeschleust. Dazu wurden je 5-50 ng gereinigte Plasmid-DNA in 100 µl kompetente *E. coli*-Bakterien (Max Efficiency DH5 Competent Cells; Gibco/BRL, Eggenstein) gegeben und 30 Min. auf Eis inkubiert. Ein anschließender zweiminütiger Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad bewirkte die Aufnahme der DNA in die Bakterien.

## Methoden

### 3.2.1. Kultivierung der Zelllinien

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zelllinien wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, in 14 ml sterilfiltriertem Vollmedium (MEM ALPHA mit Gluta-max-I; Gibco/BRL, Eggenstein, mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS, Fisher Scientific, Nidderau, 1 % Natriumpyruvat, 100 mM; Gibco/BRL, Eggenstein und 0,5 % Penicillin/Streptomycin, 10000 U/ml; Gibco/BRL, Eggenstein) gezüchtet. Die stabilen Zelllinien wurden unter Zugabe von 800 µg Geneticin (G 418, Gibco/BRL Eggenstein) und 500 µg/ml Zeocin (Invitrogen, Groningen, Niederlande) in Gewebekulturflaschen (250 ml, Falcon, Heidelberg) kultiviert. Für die Einhaltung der optimalen Wachstumsbedingungen sorgte ein Brutschrank (Heraeus, Hanau), der die Temperatur (37 °C) und die CO<sub>2</sub>-Begasungsrate (5 %) regelt. Nach Erreichen von 70-80 % Konfluenz (2-3 Tage) wurden die Zellen umgesetzt. Zur Umsetzung der Zellen wurden alle verwendeten Medien auf 37 °C vorgewärmt. Nach dem zweiten Waschen mit 7 ml gepufferter Kochsalzlösung (D-PBS; Gibco, Eggenstein) wurden die Zellen durch Inkubation (2-3 Min.) mit 1 ml Trypsin/EDTA (Gibco, Eggenstein) aus der Gewebekulturflasche abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in 6,5 ml Vollmedium aufgenommen und sorgfältig

resuspendiert. Zur weiteren Kultivierung wurde eine Verdünnung der Zellen von 1:25 – 1:30 hergestellt.

### 3.2.2. Auftauen der Zellen

Eingefrorene Zellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, bis nur noch eine geringe Menge Eis zu erkennen war. Die aufgetauten Zellen wurden dann unverzüglich in eine Gewebekulturflasche überführt, in die zuvor 14 ml Vollmedium vorgelegt worden waren.

### 3.2.3. Splitten der Zellen

Zellkulturmedium (Vollmedium), D-PBS und Trypsin/EDTA (Accutase) wurden auf 37 °C vorgewärmt. Zellkulturmedium wurden aus der Zellkulturflasche entfernt. Die Zellen wurden zwei Mal mit 7 ml D-PBS gewaschen und mit 1ml Trypsin/EDTA für 2-5 Min. überschichtet. Die Zellen wurden durch Kopfen an die Seite der Zellkulturflasche vom Boden gelöst und sofortig 6,5 ml Zellkulturmedium (Vollmedium) zugegeben. Anschließend wurden die Zellen durch mehrmaliges Aufziehen mit einer 10 ml Pipette vorsichtig resuspendiert. Für das Splitten der Zellen wurden 1,25 ml Zellsuspension zu 13,75 ml Zellkulturmedium in eine neue Zellkulturflasche gegeben.

### 3.2.4. Einfriermedium

Am einfachsten setzt man den Gefrierschutz zu, indem man vorab eine doppelkonzentrierte Lösung nach folgendem Rezept ansetzt: 80 % (v/v) Vollmedium (mit 10 % hitzeinaktivierendem FCS, 1 % Natriumpyruvat, 0,5 % Penicillin/Streptomycin) und 20 % (v/v) DMSO. Diese Mischung sollte man in der gerade beschriebenen Reihenfolge ansetzen und durch Umrühren vermischen. Man kann sie mit Hilfe eines 0,2 µm-Einmalsterilfilters in ein

steriles Zentrifugenröhrchen füllen und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahren. Gibt man dieses doppeltkonzentrierte Medium zum gleichen Volumen einer Zellsuspension in Kulturmedium, so erhält man die benötigten Konzentrationsverhältnisse der Einfrierlösung.

### 3.2.5. Einfrieren der Zellen

Ausgehend von einer 250 ml-Gewebekulturflasche wurden die Zellen zunächst zwei Mal mit D-PBS gewaschen, mit 1 ml Trypsin/ EDTA abgelöst, in 6,5 ml Vollmedium aufgenommen und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Dann wurden die Zellen 10 Min. bei Raumtemperatur (RT) und 630 g abzentrifugiert, der Mediumüberstand verworfen, die Zellen in 2 ml Einfriermedium (Vollmedium mit 10 % DMSO) resuspendiert, in eine Einfrierampulle (2 ml; Nunc, Roskilde, Dänemark) überführt und sofort bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  für etwa 24 Stunden eingefroren. Danach wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff aufbewahrt.

### 3.2.6. Transfektion von CHO-Zellen

Vor Beginn der Transfektion wurden zunächst  $8 \times 10^5$  CHO-Zellen mit 9 ml DMEM auf einer Gewebekulturpetrischale ausgesät und bis zu einer Dichte von 70-80 % kultiviert. Danach wurden die Zellen zwei Mal mit 7 ml D-PBS gewaschen. Die Zellen wurden GPIIb/IIIa-kotransfiziert. Für die Transfektion wurden pro Plasmid 3  $\mu\text{g}$  in 200  $\mu\text{l}$  OPTIMEM (Gibco/BRL, Eggenstein) aufgenommen und gemischt. 25  $\mu\text{l}$  des Transfektionsreagenzes Lipofectin (Gibco/BRL, Eggenstein) wurden ebenfalls in 200  $\mu\text{l}$  Opti-MEM resuspendiert. Dann wurden 1,8 ml Opti-MEM in ein steriles 15 ml-Falcon-Röhrchen vorgelegt, dazu unter Schwenken die 200  $\mu\text{l}$  Opti-MEM mit den Plasmiden hinzupipettiert, gevortext und die 200  $\mu\text{l}$  Opti-MEM mit lipofectin hinzugefügt und wieder gevortext. Das Transfektionsgemisch wurde anschliessend 15 Min. bei Raumtemperatur (RT) vorinkubiert, um eine Verbindung von



Liposomen und Plasmiden zu schaffen. Danach wurde das Transfektionsgemisch auf die CHO-Zellen in der Petrischale gegeben und durch Schwenken gleichmässig verteilt. Nach einer 12-16stündigen Inkubation im Brutschrank bei 37° C wurde das Transfektionsgemisch wieder von den Zellen abgesaugt und diese mit 9 ml DMEM überschichtet. Es folgte eine Kultivierungsphase von 24-48 Stunden, nach der die transfizierten Zellen selektiert wurden.

Schematisch wird die Transfektion von CHO-Zellen in Abbildung 7 gezeigt.

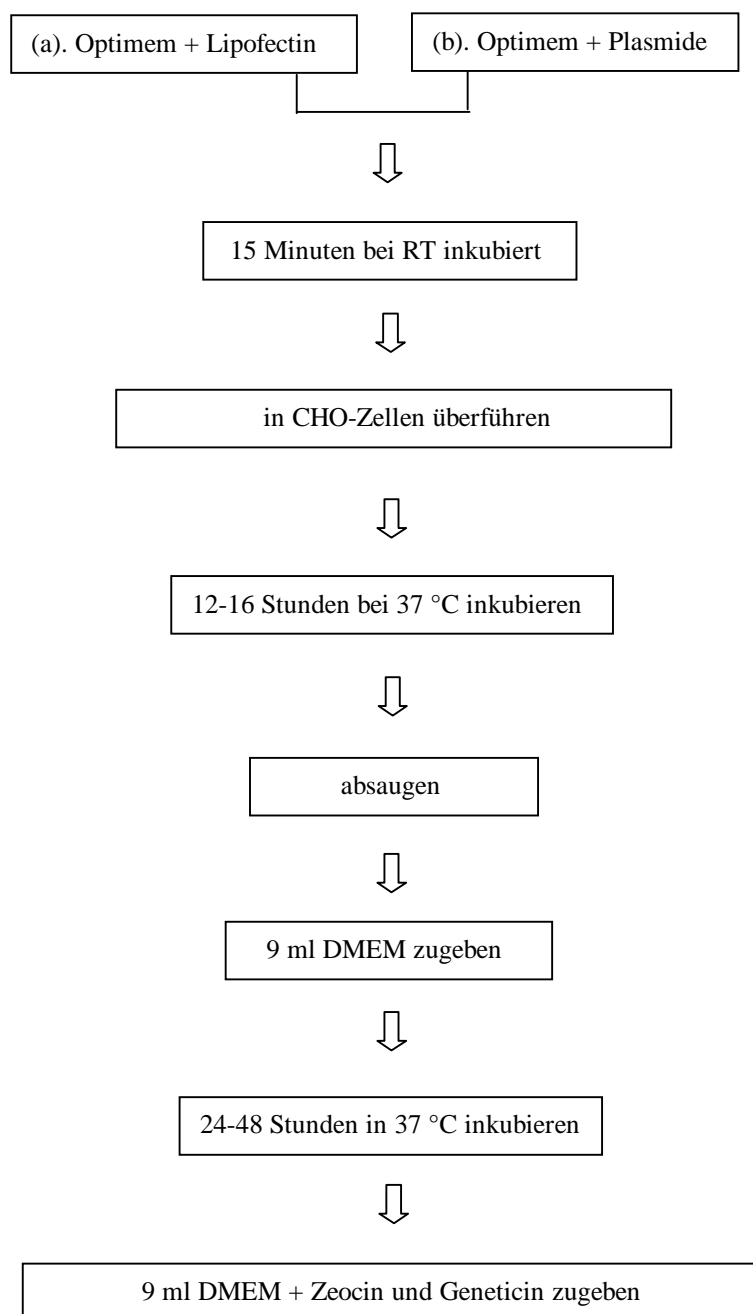


Abbildung 7: Schema der Transfektion der Zellen.

### 3.2.7. Selektion der transfizierten CHO-Zellen

Die Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen erfolgte während der weiteren Kultivierung durch die Zugabe zweier Antibiotika, für welche die Resistenzgene mit eingeschleust worden waren. Anschließend wurden die Transfektanten mittels Adhäsion an Fibrinogen selektiert werden (siehe unten).

### 3.2.8. Selektion durch Antibiotika-Zugabe

Die Plasmide, mit denen die CHO-Zellen transfiziert worden waren, beinhalteten außer einem Ampicillin-Resistenzgen noch ein weiteres Gen und zwar entweder eines, welches Resistenz gegen das Antibiotikum Zeocin verleiht, oder aber das Neomycin-Gen. Letzteres kodiert für das Enzym Neomycin-Phosphotransferase II (NPT II) und vermittelt dadurch eine Resistenz gegen das Aminoglycosid-Antibiotikum Geneticin (G 418), einem effizienten Inhibitor der Proteinbiosynthese. Erst durch eine erfolgreiche Transfektion mit beiden Plasmiden waren die Zellen gegen beide Antibiotika resistent und konnten in der Kultur überleben. Das Selektionsmedium beinhaltete daher zusätzlich zu den Komponenten des Vollmediums noch 800 µg/ml Geneticin und 500 µl/ml Zeocin

### 3.2.9. Klonierung der transfizierten CHO-Zellen

Die Zellen wurden zwei Mal mit D-PBS gewaschen, mit 1 ml Trypsin/EDTA abgelöst, in 10 ml Vollmedium (DMEM mit Geneticin und Zeocin) aufgenommen, gut resuspendiert und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Dann wurden 100 µl Zellsuspension aufgenommen und in ein Eppendorfgesäß überführt. Die Suspension wurde mit Türkscher Lösung (z.B 1: 10 oder 1 : 100) verdünnt und in einer Neubauer Kammer gezählt.

Danach wurden die Zellen in 24 Loch-Kulturflaschen kultiviert. Pro Loch sollen 2 bzw. 5 bzw. 10 Zellen vorhanden sein, damit eine einzelne Zellkolonie jeweils leicht gefunden wird. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach einer Woche wurden die Zellen resuspendiert und bis zu einer Zelldichte von ca. 70 – 80 % weiter inkubiert. Die Zellen wurden in 6-Loch-Kulturflaschen überführt und weiter bis zu einer Dichte von 70 – 80 % inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit primären und sekundären Antikörpern markiert. Danach wurden die Zellen im FACS getestet.

### 3.2.10. Überprüfen der stabilen Transfektanten mit spezifischen Humansera

Untransfizierten und transfizierte CHO-Zellen (HPA-1a, HPA-1b, Oe<sup>a</sup>) wurden aufgetaut und kultiviert. Die Zellen wurden danach gesplittet und geerntet. Es wurden 10<sup>6</sup> Zellen/100 µl in Vollmedium abzentrifugiert und mit Paraformaldehyd fixiert. CHO-Zellen wurden zu je 100 µl in kleine Eppendorfgefäße aufgenommen und bei 13000 Upm (15600 g) 1 Min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Danach wurden die Zellen mit 20 µl PBS und 2 % BSA blockiert und resuspendiert. Später wurde mit 40 µl humanen Seren (AB-Serum, anti-HPA-1a, anti-HPA-1b und anti-Oe<sup>a</sup>) gemischt und bei Raumtemperatur 1 Stunde stehen gelassen. Nach zweimaligem Waschen bei 13000 Upm (15600 g) 1 Min. wurden die Zellen mit den sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörpern inkubiert. Anschließend wurden die markierten Zellen gewaschen und in der Durchflußzytometrie gemessen.

### 3.2.11. Fixieren der Zellen

Es wurden 2 x 10<sup>6</sup> bzw. 10<sup>6</sup> Zellen in Vollmedium abzentrifugiert (1400 g, 1 Min.) und in 500 µl D-PBS aufgenommen. Nach zweimaligem Waschen mit 500 µl D-PBS (1400 g, 1 Min.) wurden die Zellen in 500 µl 1 % Paraformaldehyd (1 % PFA in PBS) aufgenommen und für 10

Min. bei Raumtemperatur im Dunkeln fixiert. Anschließend wurden die fixierten Zellen erneut dreimal mit 500  $\mu$ l D-PBS gewaschen, in 750  $\mu$ l D-PBS aufgenommen und bei 4 °C über Nacht zur weiteren Testung gelagert.

### 3.2.12. Durchflußzytometrie

Stabile Transfektant wurden mit Trypsin/EDTA geerntet, mit D-PBS gewaschen und 5 Min. mit 1 %igem Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt) fixiert. Zur Entfernung des überschüssigen Paraformaldehyds wurden die fixierten Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen (630 g, 1 Min.), in 300  $\mu$ l PBS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Für den Test wurden  $8 \times 10^5$  Zellen in 200  $\mu$ l mit 40  $\mu$ l mAk Gi5 (40  $\mu$ g/ml) oder 10-50  $\mu$ l humanen Seren (anti-HPA-1a, -HPA1-b, -Oe<sup>a</sup>) für 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (0,2 % BSA) wurden die Zellen mit 80  $\mu$ l Fluoreszeinisothiozyanat (FITC)-konjugiertem Kaninchen-anti-Maus-IgG oder anti-Human-IgG (1:50 in PBS verdünnt; Dako, Hamburg) 30 Min. bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln angefärbt. Anschließend wurden die markierten Zellen zwei Mal mit PBS (0,2 % BSA) gewaschen, in 300  $\mu$ l PBS (0,2 % BSA) aufgenommen, und im Durchflußzytometer (FACS Calibur, Becton Dickinson) analysiert.

Danach wurden die Oe<sup>a</sup>-transfizierten Zellen noch mit 1 mM Peptid (RGDW oder RGEW) und 20  $\mu$ l mAk D3 (0,02 mg/ml) für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Für die Bindung des mAk PAC-1 (gegen aktiviertes GPIIb/IIIa gerichtet) wurde den Zellen ( $2 \times 10^7$ ) 1 ml Tyrodepuffer (137 mM NaCl, 2,8 mM KCL, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM Hepes, pH 7,4) zugegeben, mit 10mM Dithiothreitol (DDT) oder Puffer behandelt und für 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden in 1 ml Tyrodepuffer mit 3,5 mg/ml BSA (TB) gewaschen, resuspendiert, auf zwei Portionen (100  $\mu$ l ohne DDT und 100  $\mu$ l mit DDT) verteilt, mit 20  $\mu$ l FITC markierten mAk PAC-1 (1  $\mu$ g/ml) inkubiert und mit 10  $\mu$ l 10 mM

MgCl<sub>2</sub> und 1mM CaCl<sub>2</sub> 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen, in 500 µl TB (MgCl<sub>2</sub> und CaCl<sub>2</sub>) resuspendiert und im Durchflußzytometer (FACS Calibur, Becton Dickinson) analysiert.

### 3.2.13. Adhäsionstest

Eine Mikrotiterplatte wurde mit 100 µl Fibrinogen (Calbiochem, Schwalbach), 10 µg/ml mAk Gi5 und 1 % BSA über Nacht bei 4°C beschichtet und mit 1 % BSA in PBS bei Raumtemperatur blockiert. Danach wurden die Lösungen aus der Vertiefung durch Umkippen der Mikrotiterplatte entfernt und mit 200 µl 1 % BSA in PBS (Waschlösung) zweimal gewaschen. Nach weiterer Inkubation mit 2 µM Calcein-AM (Mobictec, Göttingen, Germany) bei 37°C für 30 Min. wurden 100 µl Zellsuspension (2x10<sup>5</sup> Zellen in Vollmedium) in die Vertiefungen pipettiert und für eine Stunde bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> (Brutschrank) inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen, welche nicht adhärirten, vorsichtig durch dreimaliges Waschen mit 200 µl 1 % BSA in PBS (Waschlösung) entfernt. Nach der Zugabe von 100 µl Substratlösung (6 mg/ml p-Nitrophenylphosphat in 50 mM Natriumacetat, 1 % Triton X-100) wurde die Umsetzung der endogenen alkalischen Phosphatase nach einer Stunde mit 50 µl 1N NaOH gestoppt und die Exitationen im Photometer (Spectrafluor Plus, Tecan, Crailsheim, Germany) bei 485 nm und 515 gemessen.

### 3.2.14. Tyrosinphosphorylierung der PP125<sup>FAK</sup>

Eine Mikrotiterplatte wurde mit 100 µl Fibrinogen (Calbiochem, Schwalbach) mit BSA (10 mg/ml; Serva, Heidelberg, Germany) oder nur mit 1 % BSA für 2 Stunden bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Danach wurden die Lösungen aus der Vertiefung durch Umkippen der Mikrotiterplatte entfernt und mit 200 µl 1 % BSA in PBS (Waschlösung)

zweimal gewaschen. Nach weiterer Inkubation mit 2  $\mu$ M Calcein-AM (Mebitec, Göttingen) bei 37°C für 30 Min. wurden 100  $\mu$ l Zellsuspension ( $2 \times 10^5$  Zellen in Vollmedium) in die Vertiefungen pipettiert und für eine Stunde bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Adhärenente Zellen wurden mit RIPA-Puffer (1 % Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0,5 % Nonidet P40, 1 % Sodium Desoxycholate, 2 mM PMSF, und 10  $\mu$ g/ml Aprotinin und Leupeptin) lysiert, und bei 15 000 x g für 30 Min. bei 4°C zentrifugiert. Die Proteinkonzentration des Zellysates wurde mit BCA-Protein (Perbio, Bonn, Germany) determiniert. 500  $\mu$ g Protein wurde mit 5  $\mu$ l Kaninchen-poliklonalem-Anti-PP125<sup>FAK</sup> (Becton Dickinson) über Nacht inkubiert.

Die Immunpräzipitate wurden auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran überführt und die Tyrosinphosphorylierung mit dem mAk 77 (250  $\mu$ g/ml) und PY20 (1 mg/ml) spezifisch für PP125<sup>FAK</sup> bzw. Phosphotyrosin (Verdünnungen 1:1000) in 62,5 mM Tris Puffer, pH 6,7 (2 % SDS und 100 mM  $\beta$ -Merkaptoethanol) für 30 Min. bei 50°C inkubiert. Das Protein wurde mit Peroxidase-konjugiertem Kaninchen-anti-Maus-IgG (Verdünnungen 1:10000; Dianova, Hamburg) und Chemilumineszenz-Substrat (ECL Plus; Amersham Pharmacia, Freiburg) angefärbt. Das Signal wurde mit der Software "Correl Photo Paint" analysiert und mit Kodax 1D Image abgebildet. Die Phosphorylierung der PP125<sup>FAK</sup> wurde aus dem Quotienten der mittleren Intensitäten des Densitometric-Scans von pTyr und PP125<sup>FAK</sup> bestimmt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Etablierung von stabilen HPA-1a und HPA-1b Transfektanten

Abbildung 8 gibt einen schematischen Überblick über die Durchführung unserer Experimente zur Etablierung von stabilen GPIIb/IIIa Transfektanten in Säugertierzellen, die entweder HPA-1a- (Leucin33) oder HPA-1b-Epitope (Prolin33) exprimieren.

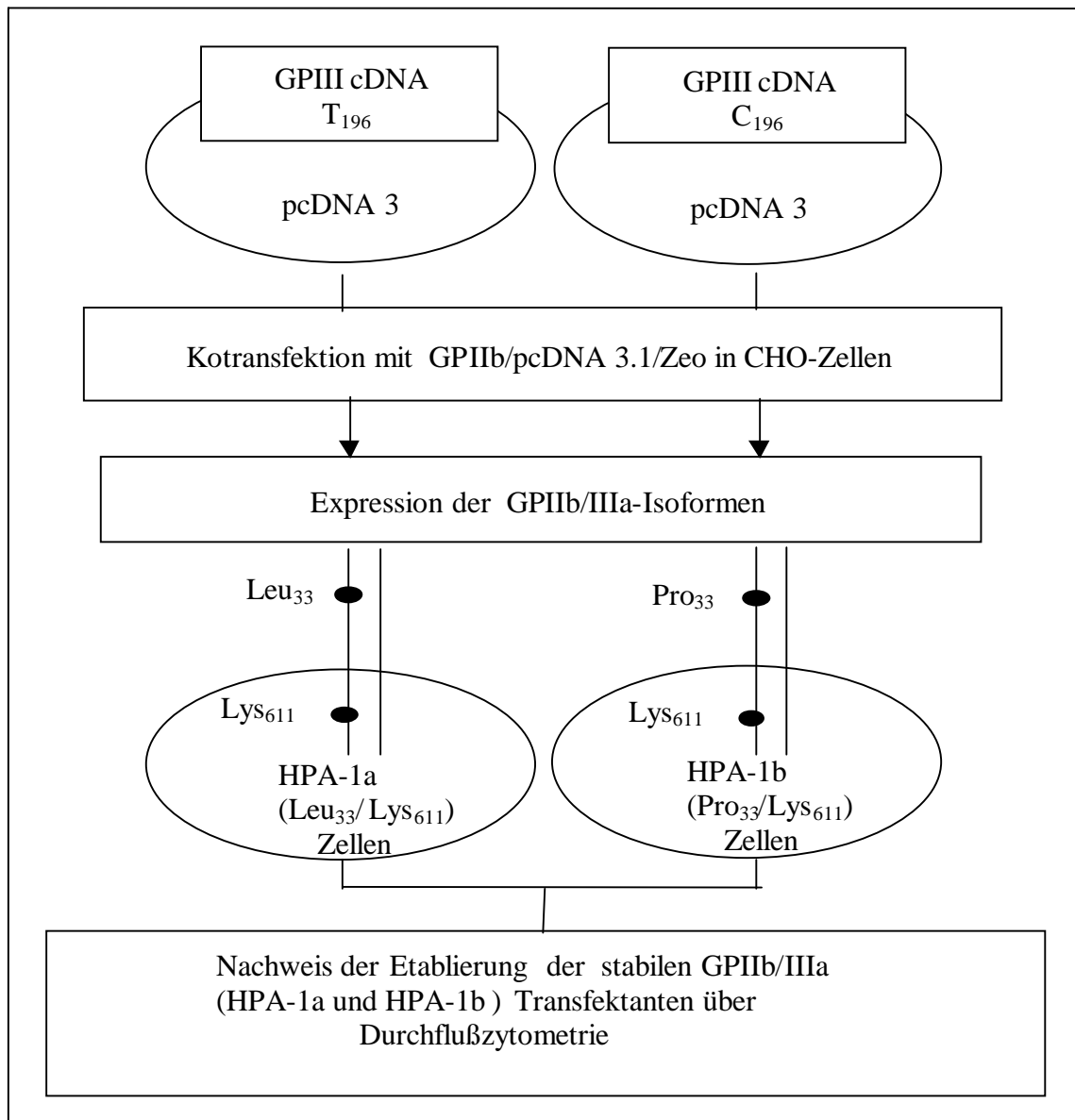


Abbildung 8: Transfektion der GPIIb- und allelspezifischen GPIIIa-Konstrukte in CHO-Zellen, deren Expression und ihr immunologischer Nachweis.

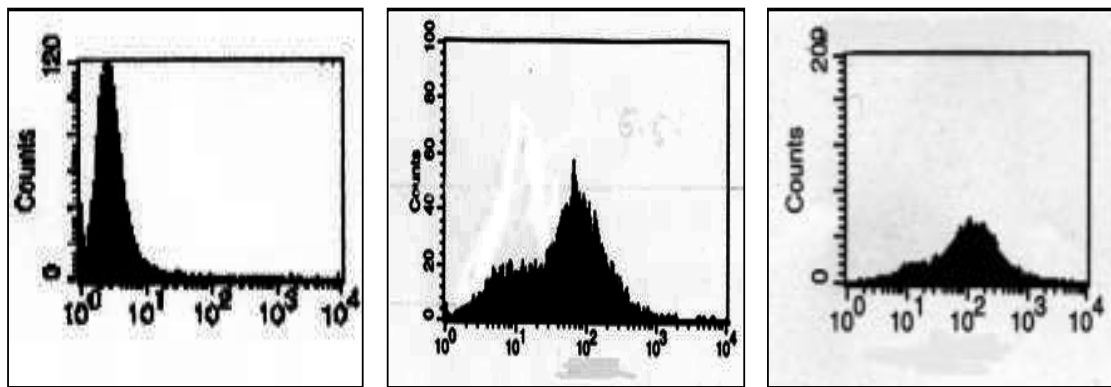
#### 4.1.1. Stabile Expression in CHO-Zellen

Für die Herstellung von stabilen Zelllinien, die humane HPA-1a- oder HPA-1b-Alloantigene exprimieren, war es erforderlich, die entsprechenden Konstrukte in Säugertierzellen (Chinese-Hamster-Ovary; CHO-Zellen) zu transfizieren. CHO-Zellen wurden mit zwei verschiedenen allelspezifischen GPIIIa-Konstrukten (Abbildung 8) und dem GPIIb-Expressionsvektor mit Hilfe des Transfektionsreagens Lipofektin kotransfiziert. In den 14 Tagen nach der Transfektion wuchsen einzelne resistente Klone in Anwesenheit von 800 µg Geneticin und 500 µg Zeocin pro ml Medium heran. Nachdem resistente Zellen herangewachsen waren, wurde die Expression der rekombinanten GPIIb/IIIa-Membranproteine mit immunologischen Methoden nachgewiesen.

##### 4.1.1.1 Nachweis der Expression von GPIIb/IIIa auf der Zelloberfläche

Als Methode zum Expressionsnachweis der rekombinanten GPIIb/IIIa-Proteine wurde die Durchflußzytometrie angewandt. Die Transfektanten wurden mit dem mAk Gi5 gegen GPIIb/IIIa markiert. Als Sekundärantikörper wurden FITC-gekoppelte anti-Maus-Antikörper verwendet. Anschließend wurden die markierten Zellen im Durchflußzytometer) analysiert. Abbildung 9 zeigt die Markierung von GPIIb/IIIa Transfektanten mit dem mAk Gi5.





CHO-Zellen

HPA-1a

HPA-1b

Abbildung 9: Analyse von untransfizierten CHO-Zellen, HPA-1a und HPA-1b Transfektanten mit dem mAk Gi5 in der Durchflußzytometrie.

Die X-Achse zeigt den Logarithmus der Fluoreszenz und die Y-Achse die Anzahl der gemessenen Zellen je Kanal.

Abbildung 9 zeigt unsere Ergebnisse der Expression der GPIIIa-Leu33 (HPA-1a) bzw. GPIIIa-Pro<sub>33</sub> (HPA-1b) in CHO-Zellen. Der mAk Gi5, welcher gegen monomorphe Strukturen auf dem GPIIb/IIIa-Komplex gerichtet ist, reagierte mit den GPIIb/IIIa-Heterodimeren der beiden Transfektanten (HPA-1a, HPA-1b). Im Gegensatz dazu reagierten untransfizierten CHO-Zellen nicht mit dem mAk Gi5. Da Zellpopulationen auftraten, die schwächer mit dem mAk Gi5 reagierten (niedrige GPIIb/IIIa Expression), wurden die Zellen nochmals kloniert, um eine homogene hochexprimierende GPIIb/IIIa Zelllinie zu erhalten.

#### 4.1.2. Klonierung der Zellen

Zur weiteren Selektion von hochexprimierendem GPIIb/IIIa wurden die Zellen mit Hilfe von Limiting-Dilution Technik kloniert (1 Zelle/Loch). Mehrere Klone wurden gepickt und nach einer Woche wuchsen daraus Zellkolonien, die dann anschließend in der Durchflußzytometrie getestet wurden.

#### 4.1.2.1 Nachweis der stabilen Expression von GPIIb/IIIa Transfektanten nach der Klonierung.

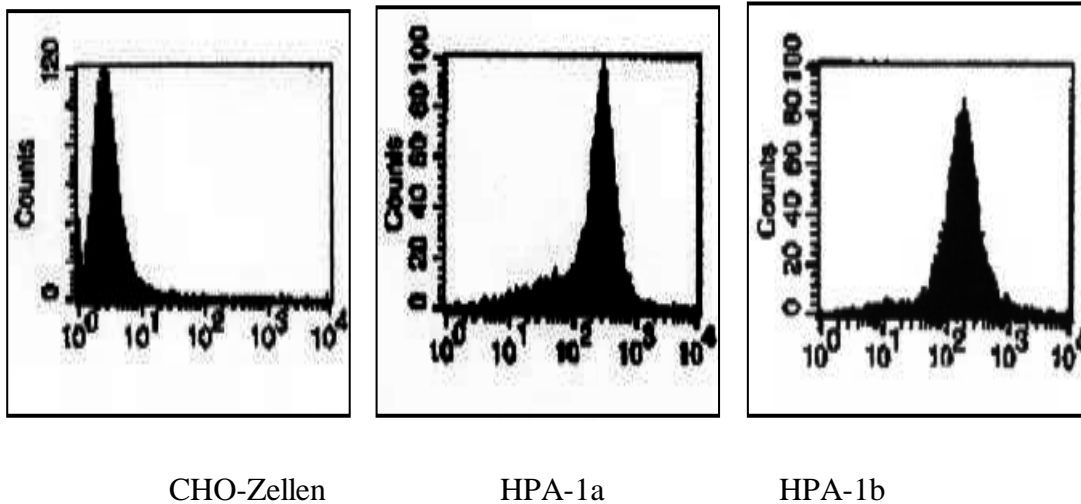


Abbildung 10: Analyse von untransfizierte CHO-Zellen, HPA-1a und HPA-1b Transfektanten mit Gi5 nach der Klonierung in der Durchflußzytometrie.

Abbildung 10 zeigt die Expression von stabilen Transfektanten (HPA-1a und -1b) mit hoher GPIIb/IIIa Dichte. Im Gegensatz zu untransfizierten CHO-Zellen reagierten beide Transfektanten stark und homogen mit dem mAk Gi5.

#### 4.1.2.2. Überprüfen der stabilen GPIIb/IIIa-Transfektanten mit Humansera

Um die HPA-Spezifität der Transfektanten nachzuweisen, wurden die Zellen mit anti-HPA-1a und anti-HPA-1b mittels Durchflußzytometrie analysiert. Für diese Versuchen wurden die HPA-1a und HPA-1b Seren entweder direkt eingesetzt oder erst an untransfizierten CHO-Zellen vorabsorbiert. Dazu wurden AB-Serum, anti-HPA-1a und anti-HPA-1b mit CHO-Zellen inkubiert. Nach Absorption wurde der Überstand abgenommen und das vorabsorbierte Serum mit HPA-1a- und HPA-1b-Transfektanten in der Durchflußzytometrie analysiert.

#### 4.1.2.2.1. Versuche vor der Absorption

##### A. HPA-1a Transfektanzellen

Die HPA-1a Transfektanzellen wurden mit verschiedenen Seren (AB-Serum, anti-HPA-1a und anti-HPA-1b) und monoklonalen Antikörper gegen GPIa/IIa (Gi14) getestet (Abbildung 11). Anti-HPA-1a erkannte spezifisch die HPA-1a-Transfektanten. Es trat allerdings das Phänomen auf, dass anti-HPA-1b auch mit den HPA-1a-Transfektanten schwach reagierte. Diese Reaktion war stärker positiv als die negative Kontrolle mit AB-Serum oder mit dem monoklonalen Antikörper gegen GPIa/IIa (Gi14). Wir vermuten, dass es sich um eine unspezifische Reaktion handelt, die durch eine Reaktion zwischen einem Glykoprotein (GP) auf der Oberfläche von CHO-Zellen und den Antikörpern (AB-Serum, anti-HPA-1a, anti-HPA-1b und mAk Gi14) verursacht wird. Ähnliche unspezifische Reaktionen wurden bei HPA-1b Transfektanten beobachtet (Abbildung 12).

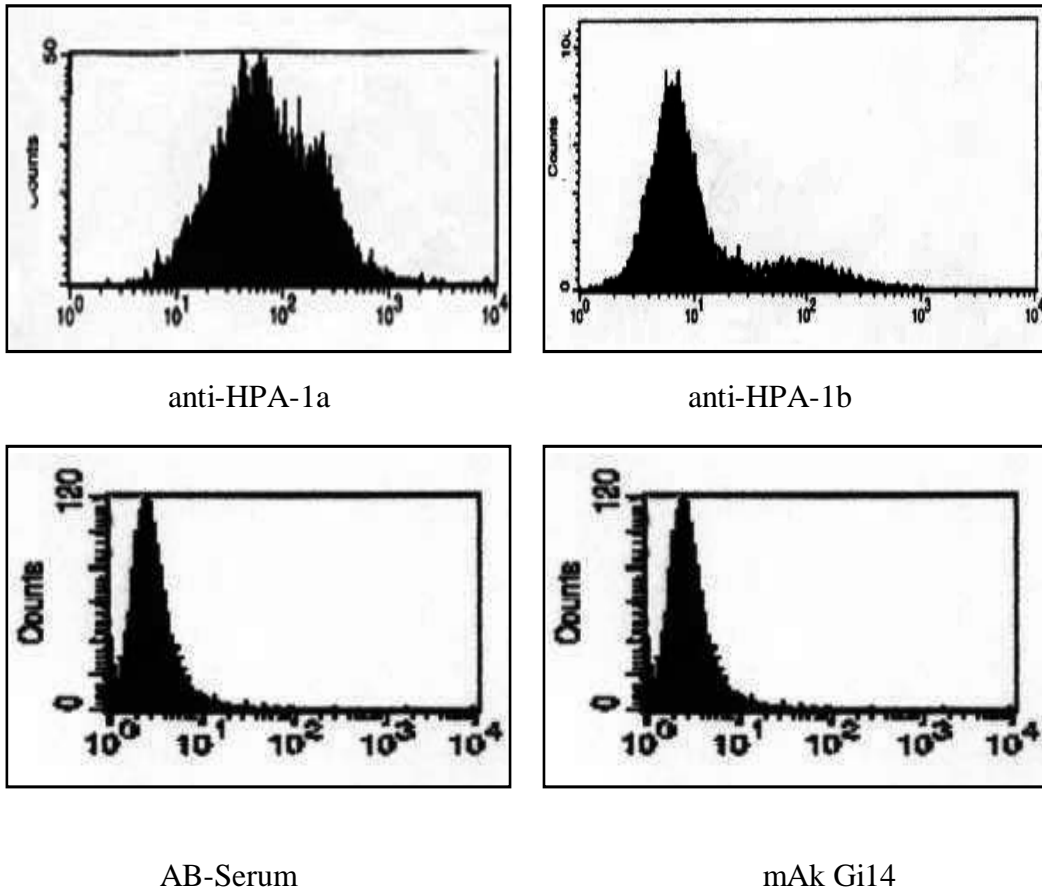


Abbildung 11: Analyse von HPA-1a Transfektanten mit nichtabsorbierten anti-HPA-1a, anti-HPA-1b, AB-Serum und dem mAk Gi14 in der Durchflußzytometrie.

## B. HPA-1b Transfektantenzellen

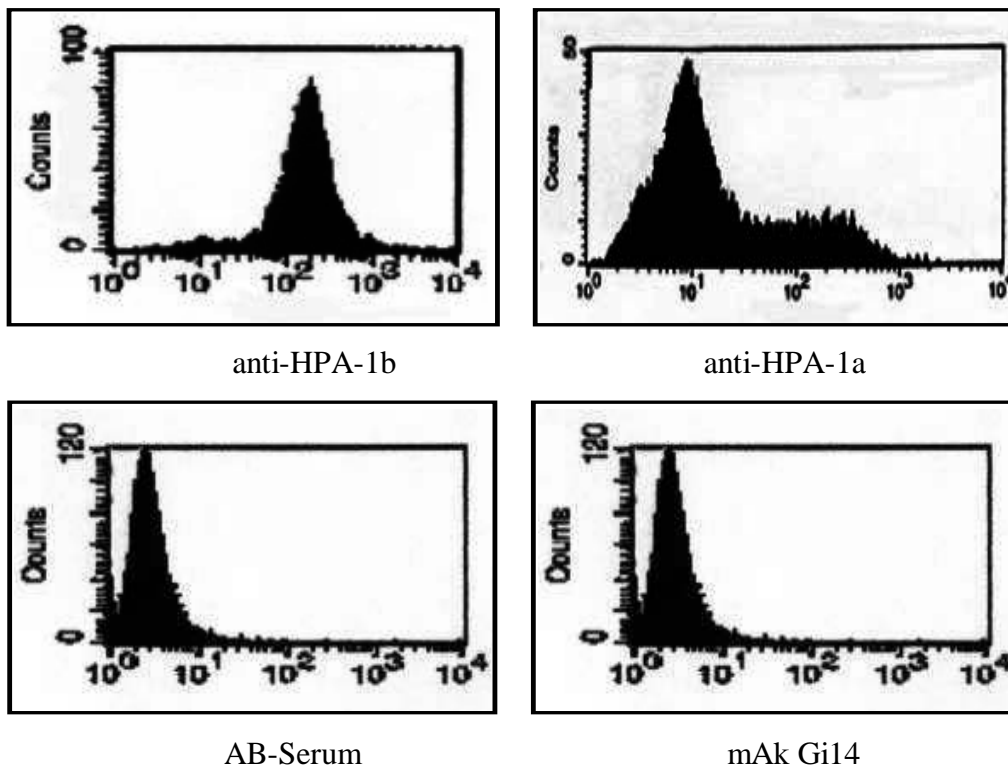


Abbildung 12: Analyse von HPA-1b Transfektanten mit nichtvorabsorbierten anti-HPA-1b, anti-HPA-1a, AB-Serum und dem mAk Gi14 in der Durchflußzytometrie.

Um unspezifische Reaktionen zwischen CHO-Zellen und den eingesetzten Antikörpern zu vermeiden, haben wir eine Absorption der Antikörper mit CHO-Zellen versucht. Die Methode der Absorption wurde in Kapitel 4.1.2.2. beschrieben.

#### 4.1.2.2.2 Versuche nach Absorption

Nach Absorption mit untransfizierten CHO-Zellen zeigten die gereinigten HPA-1a und HPA-1b Antikörpern spezifische Reaktion mit den Transfektanzellen. Anti-HPA-1a erkannte spezifisch nur den HPA-1a-Transfektanten, aber nicht den HPA-1b-Transfektanten (Abbildung 13). Anti-HPA-1b dagegen reagierte mit dem HPA-1b- und nicht mit dem HPA-1a-Transfektanten (Abbildung 14). Diese Ergebnisse zeigen, dass unsere GPIIb/IIIa-Transfektanten HPA-1a und HPA-1b Epitope auf ihrer Oberfläche exprimieren.

##### A. HPA-1a Transfektanzellen

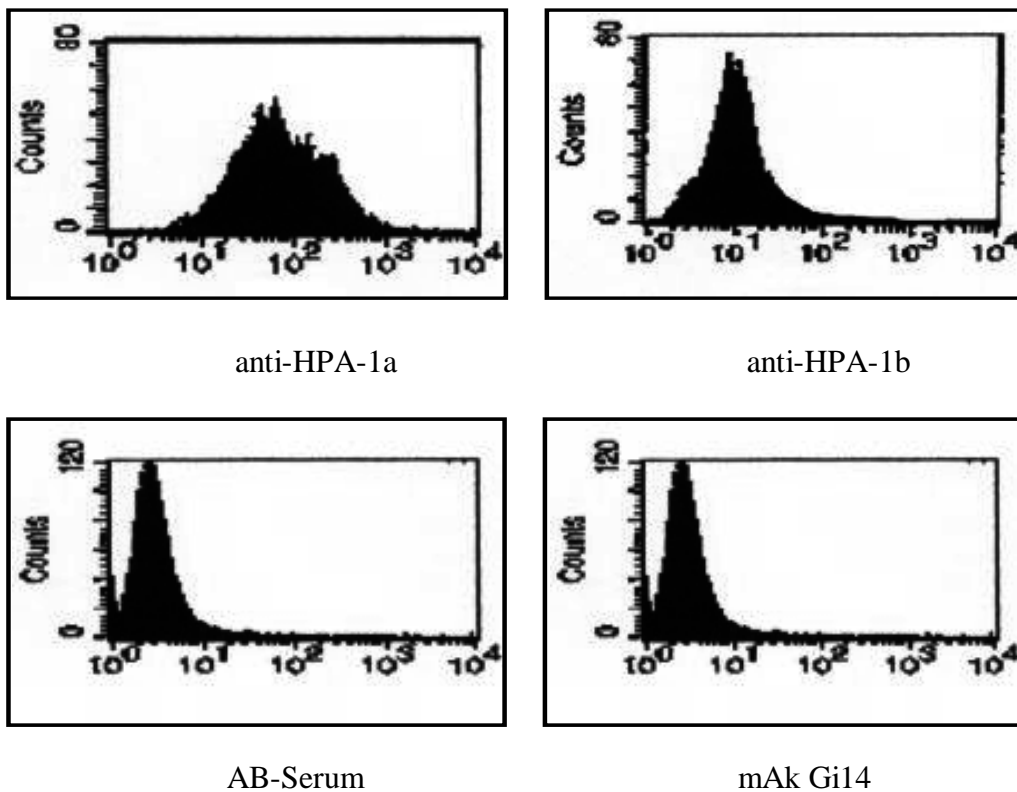


Abbildung 13: Reaktion von HPA-1a Transfektanten mit vorabsorbierten anti-HPA-1a, anti-HPA-1b, AB-Serum und dem mAb Gi14 in der Durchflußzytometrie.

## B. HPA-1b Transfektantenzellen

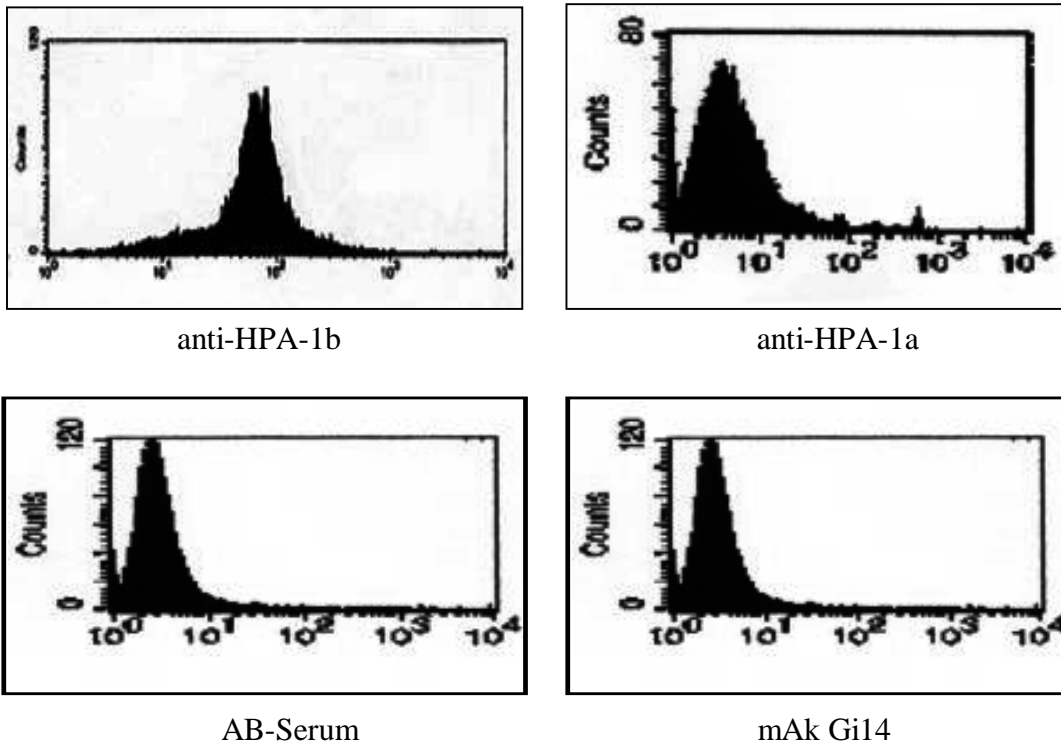


Abbildung 14: Reaktion von HPA-1b Transfektanten mit vorabsorbierten mit anti-HPA-1b, anti-HPA-1a, AB-Serum und dem mAk Gi14 in der Durchflußzytometrie.

## 4.2. Funktionelle Bedeutung von stabilen Transfektanten GPIIb/IIIa (Oe<sup>a</sup>)

Abbildung 15 gibt einen schematischen Überblick über die Durchführung unserer Experimente zum Nachweis der Funktion des GPIIb/IIIa-Rezeptors von stabilen Transfektanten (Oe<sup>a</sup>)

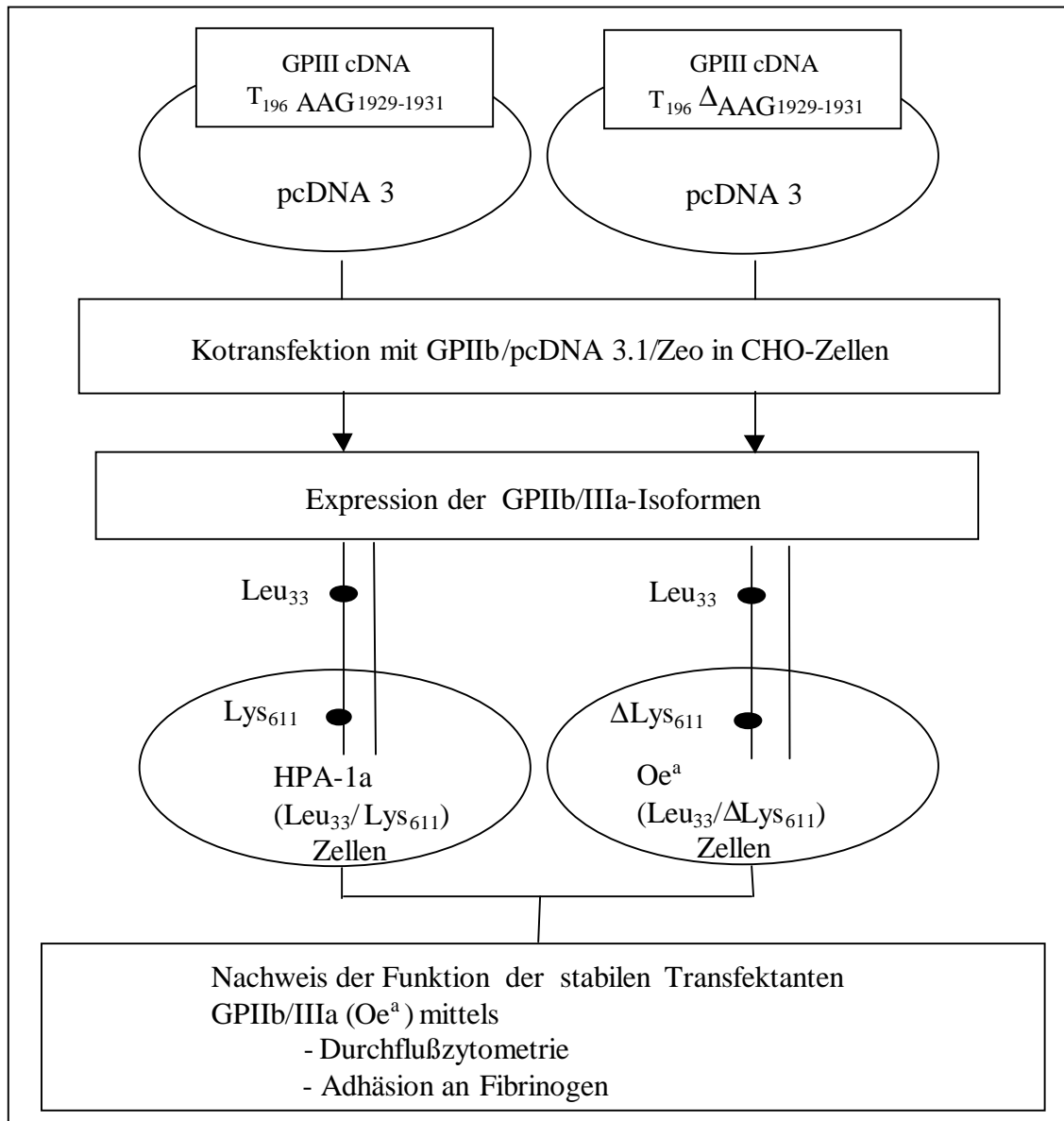


Abbildung 15: Transfektion der GPIIb- und allelspezifischen GPIIIa-Konstrukte in CHO-Zellen, deren Expression und funktionelle Bedeutung.



### 4.2.1 HPA-1a/Oe<sup>a</sup>(+) Transfektanzellen

#### A. Die Reaktion von HPA-1a/Oe<sup>a</sup> (+) Transfektanzellen mit dem mAk Gi5

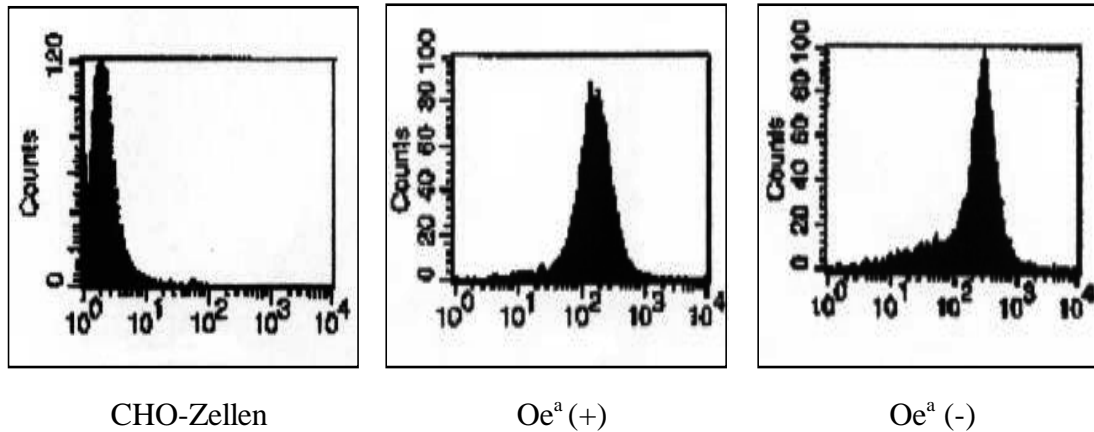


Abbildung 16: Analyse von Oe<sup>a</sup> (+) und Oe<sup>a</sup> (-) Transfektanten nach der Klonierung mit dem monoklonalen Antikörper gegen GPIIb/IIIa (Gi5) in der Durchflußzytometrie. Die negative Kontrolle aus untransfizierten CHO-Zellen zeigt keine Reaktion mit dem mAk Gi5.

Die Analyse mit Gi5 (anti-GPIIb/IIIa) zeigt, dass beide Transfektanten den GPIIb/IIIa-Komplex auf ihrer Oberfläche tragen (Abbildung 16).

#### B. Die Reaktion von HPA-1a/Oe<sup>a</sup> (+) Transfektanzellen mit anti-HPA-1a

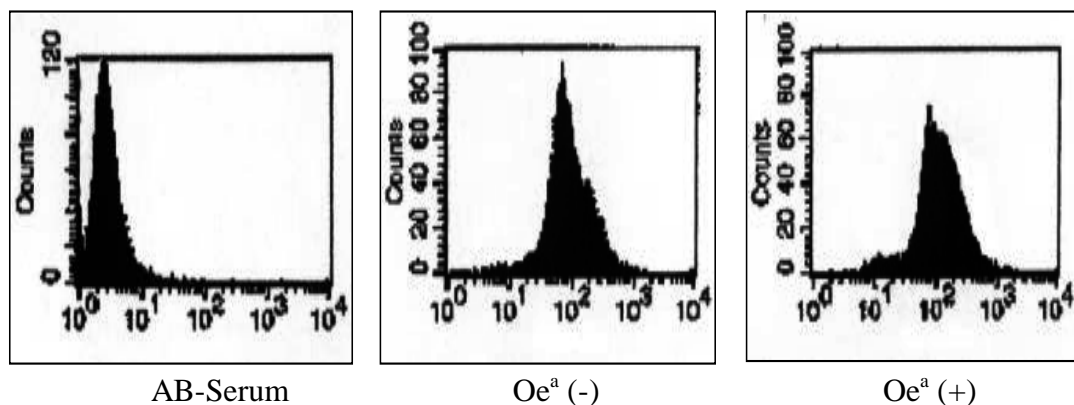


Abbildung 17: Analyse von HPA-1a/Oe<sup>a</sup> (-) und HPA-1a/Oe<sup>a</sup> (+) Transfektanten mit anti-HPA-1a/Oe<sup>a</sup> (-) und anti-HPA-1a/Oe<sup>a</sup> (+) in der Durchflußzytometrie. Die negative Kontrolle (AB-Serum) zeigt mit HPA-1a/Oe<sup>a</sup> (+) keine Reaktion.

Sowohl HPA-1a/Oe<sup>a</sup> (-) als auch anti-HPA-1a/Oe<sup>a</sup> (+) reagieren mit dem anti-HPA-1a Antikörper. Diese Ergebnisse zeigen, dass HPA-1a/Oe<sup>a</sup> (+) Zellen HPA-1 Epitope exprimieren und die Deletion der Aminosäure an der Position 611 die Ausbildung von HPA-1a Epitope nicht beeinträchtigt (Abbildung 17).

### C. Die Reaktion von HPA-1a/Oe<sup>a</sup> (+) Transfektanzellen mit anti-Oe<sup>a</sup>

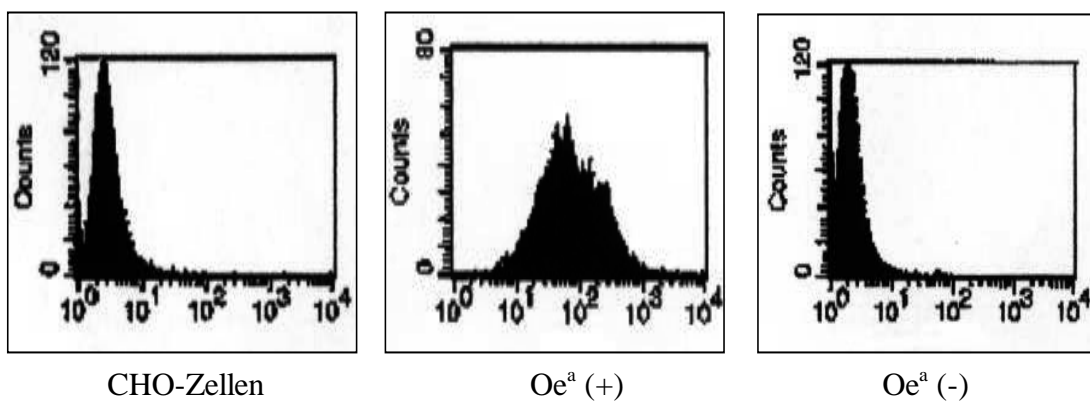


Abbildung 18: Die Reaktion von CHO-Zellen, HPA-1a/Oe<sup>a</sup> (-) und HPA-1a/Oe<sup>a</sup> (+) Transfektanten mit anti-Oe<sup>a</sup> Serum.

Um die Spezifität unserer Transfektanten weiter zu untersuchen, wurden HPA-1a/Oe<sup>a</sup> (-) und HPA-1a/Oe<sup>a</sup> (+) Transfektanten mit anti-Oe<sup>a</sup> analysiert. Im Gegensatz zu HPA-1a/Oe<sup>a</sup> (-) Transfektanten reagierten HPA-1a/Oe<sup>a</sup> (+) positiv mit anti-Oe<sup>a</sup> Antikörpern. Diese Ergebnisse belegen, dass die Deletion der Aminosäure an der Position 611 direkt für die Ausbildung der Oe<sup>a</sup>-Epitope verantwortlich ist (Abbildung 18)

## 4.2.2. Funktion des rekombinanten GPIIb/IIIa-Komplexes (Oe<sup>a</sup>)

### 4.2.2.1. Aktivierbarkeit der rekombinanten Oe<sup>a</sup>-Allele von GPIIb/IIIa-Isoformen

Zur Untersuchung der Aktivierbarkeit des GPIIb/IIIa Komplexes von rekombinanten Oe<sup>a</sup>-Allelen wurden stabile Pro33 $\Delta$ Lys611 mit dem Pro33Lys611 Isoformen nach Aktivierung mit RGDW (Arginin-Glycin-Asparagin-Tryptophane) oder RGEW (Arginin-Glycin-Glutamin-Tryptophane) verglichen (Abbildung 19). Die konformationale Veränderung des GPIIb/IIIa Komplexes wurde mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper D3 und anti LIBS (Ligand-induced binding-specificity) in Durchflußzytometrie gemessen. Im Kontrollversuch mit dem RGEW-Peptid zeigten beide Transfektanten, Pro33 $\Delta$ Lys611 (Oe<sup>a</sup> (+)) und Pro33Lys611 (Oe<sup>a</sup> (-)) keine Bindung an den mAk D3. Nach Aktivierung mit RGDW binden beide Transfektanten in gleichem Ausmass den mAk D3. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die  $\Delta$ Lys611 Deletion die Aktivierbarkeit des GPIIb/IIIa Komplexes nicht beeinflusst.

Weitere Versuche mit Dithiothreitol (DTT) als Aktivierungssubstanz zeigten gleiche Ergebnisse. DTT-aktivierte GPIIb/IIIa Komplexe des Wildtyps (Pro33Lys611) und Mutante (Pro33 $\Delta$ Lys611) binden in gleichem Ausmass den spezifischen mAk PAC-1. Da der PAC-1 Antikörper bekanntlich Fibrinogen nachahmen kann (Ligandmimetik), zeigen unsere Ergebnisse, dass die  $\Delta$ Lys611 Mutation die Fibrinogenbindung nicht beeinflusst (Abbildung 20).

Weiterhin wurde die Adhäsionsfähigkeit der beiden Transfektanten an Fibrinogen verglichen. Um den Einfluß der unterschiedlichen GPIIb/IIIa Expression auf die Bindung der Adhäsionszellen auszugleichen, wurde die Adhäsion der Zellen an den mAk Gi5 gemessen (Abbildung 21). Alle diese Ergebnisse zeigen, dass die  $\Delta$ Lys611-Form des GPIIb/IIIa-Rezeptors normale Rezeptorfunktion besitzt.

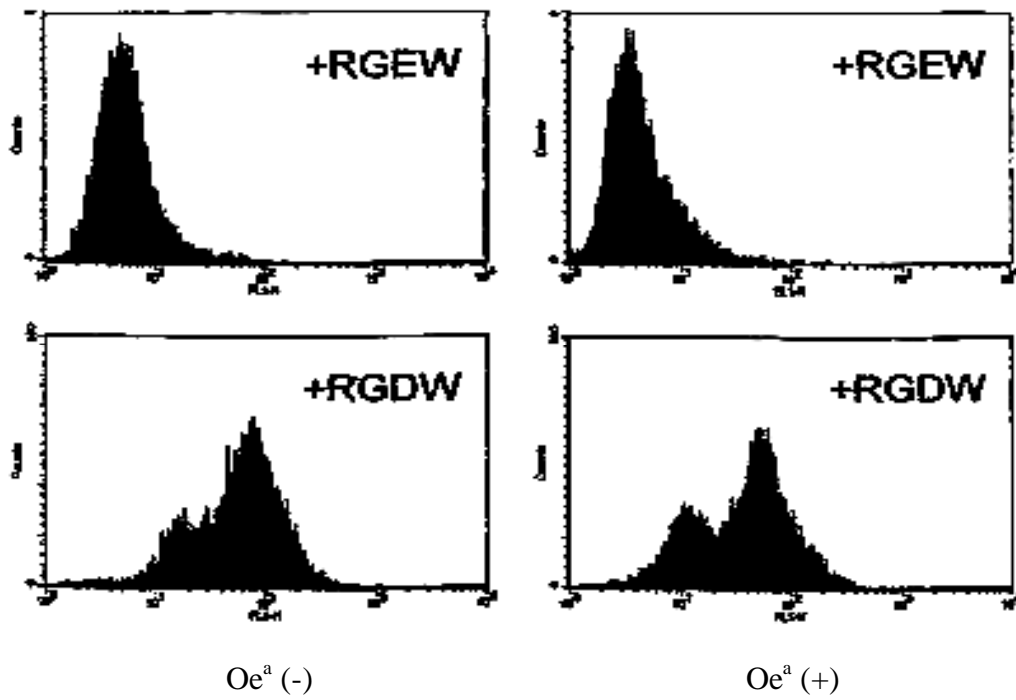


Abbildung 19: Analyse von Pro33 $\Delta$ Lys611 (Oe<sup>a</sup>(+)) und Pro33Lys611 (Oe<sup>a</sup>(-)) Transfektanten nach der Aktivierung mit RGDW oder RGEW-Zugabe als negative Kontrolle. Beide Transfektanten binden in gleichem Ausmass den mAk D3 (anti-LIBS) in der Durchflußzytometrie.

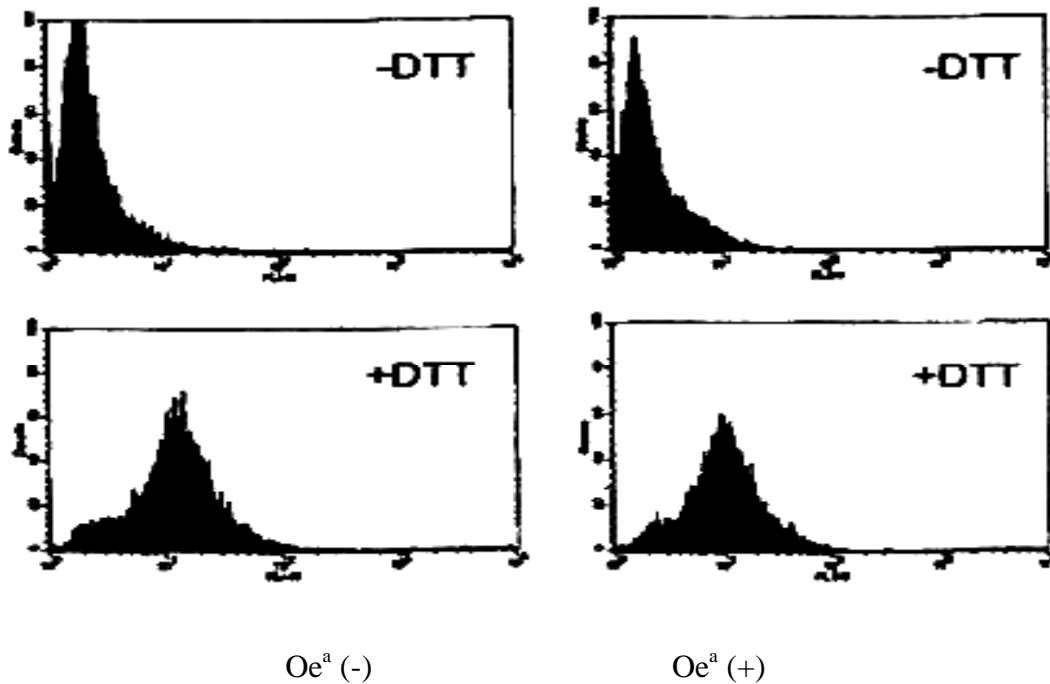


Abbildung 20: Analyse von Pro33 $\Delta$ Lys611 (Oe<sup>a</sup>(+)) und Pro33Lys611 (Oe<sup>a</sup>(-)) Transfektanten nach der Aktivierung mit Dithiothreitol (DTT). Beide Transfektanten binden in gleichem Ausmass den mAk PAC-1 in der Durchflußzytometrie. Die negative Kontrolle (ohne DDT) zeigt bei beiden Transfektanten keine Bindung des mAk PAC-1.

#### 4.2.2.2 Einfluß der Lys611-Deletion auf die Signaltransduktion des GPIIb/IIIa Komplexes

Nachdem die Adhäsion von GPIIb/IIIa-Transfektantenzellen mit Fibrinogen gemessen wurde (Abbildung 21), wurde untersucht, ob  $\Delta$ Lys611 einen Einfluß auf das "outside-in signaling" von GPIIb/IIIa hat. Um diesen Einfluss zu bestimmen wurde die GPIIb/IIIa abhängige Tyrosinphosphorylierung von PP125<sup>FAK</sup> gemessen (Abbildung 22). PP125<sup>FAK</sup> vom Wildtyp (Pro33Lys611) und die Mutante (Pro33 $\Delta$ Lys611) GPIIb/IIIa wurden mit dem polyklonalen Antikörper anti PP125<sup>FAK</sup> präzipitiert und mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen Phosphotyrosin und PP125<sup>FAK</sup> quantifiziert. Unterschiede der Phosphorylierung zwischen Wildtyp und der Mutante wurden nicht beobachtet. Demnach hat  $\Delta$ Lys611 (Lys611-Deletion) keinen Einfluß auf das "outside-in signaling".

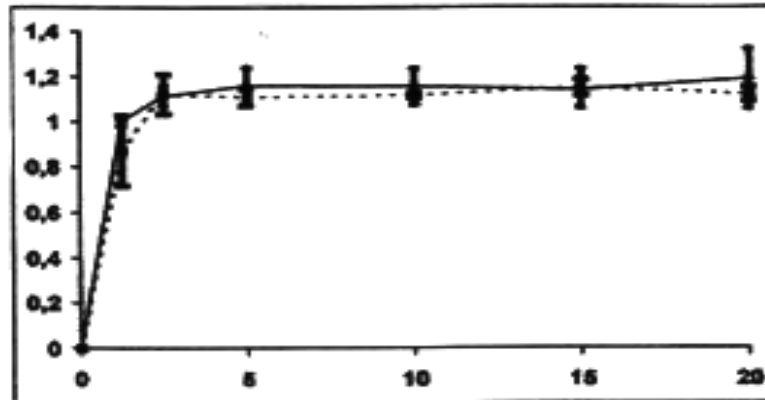


Abbildung 21: Adhäsionsfähigkeit des GPIIb/IIIa Pro33 (Wildtyp, durchgezogene Linie) und Pro33ΔLys611 (Mutante; gestrichelte Linie) an Fibrinogen und an Gi5 (anti-GPIIb/IIIa). Transfektanten wurden mit fluoreszierenden Calcein-AM markiert und an Fibrinogen oder an den mAk Gi5 adhären gelassen. Nach dem Waschen wurde die Fluoreszenz der adhären Zellen gemessen. Die Zahl an Fibrinogen bzw. Gi5 der adhären Zellen wird als Verhältnis zueinander dargestellt.

Die X-Achse zeigt das Verhältnis der gebundenen Zellen (Fibrinogen/Gi5) und die Y-Achse die Menge von Fibrinogen (µg/Loch).

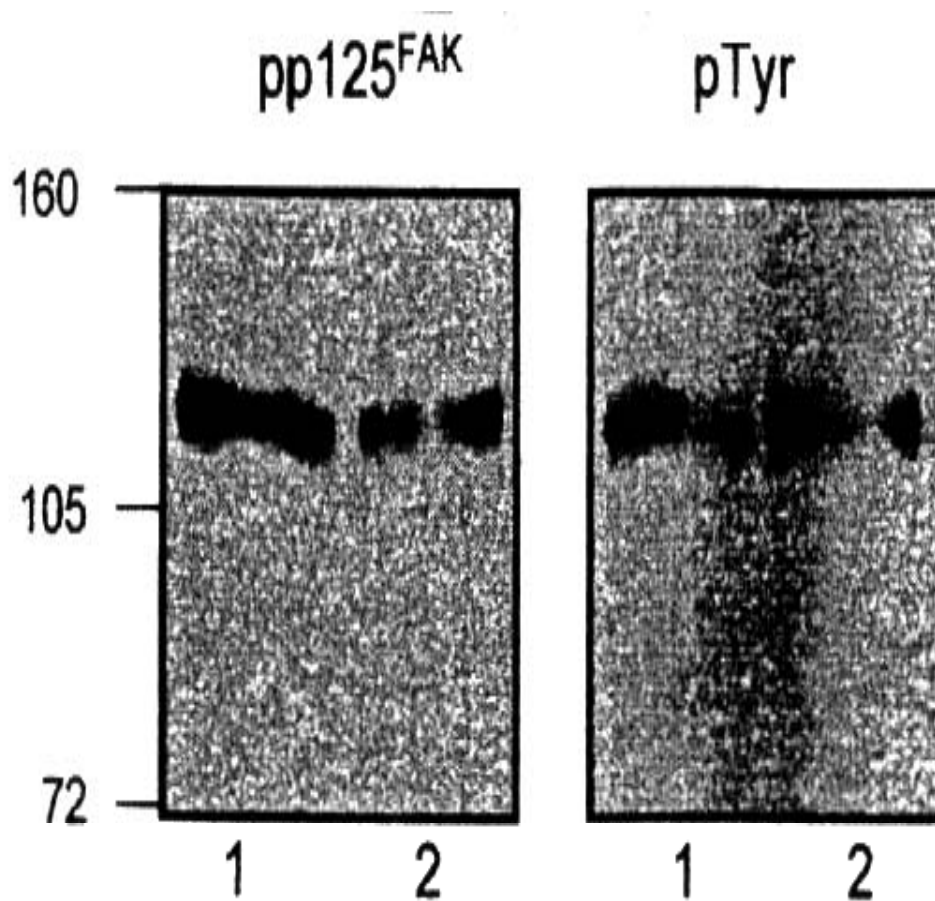


Abbildung 22: Tyrosinphosphorylierung von GPIIIa Isoformen. Stabile GPIIb/IIIa Pro33 Lys611 (1. Bahn) und GPIIb/IIIa Pro33 $\Delta$ Lys611 (2. Bahn) Transfektanten wurden an Fibrinogen adhären lassen, lysiert und mit Kaninchen-Antiserum gegen PP125<sup>FAK</sup> präzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden auf SDS-PAGE (7,5 %) getrennt, auf Nitrozellulosemembran übertragen und mit einem mAk gegen PP125<sup>FAK</sup> und Phosphotyrosine markiert. Immunkomplexe wurden dann durch Verwendung von peroxidasemarkierten sekundären Antikörpern und Chemilumineszenz sichtbar gemacht.

## 5. Diskussion

Kürzlich konnten wir einen Fall von NAIT durch mütterliche Immunisierung gegen ein neues seltenes Alloantigen, das Oe-Antigen entdecken (Kroll et al., 1995). Crossmatch Analyse zwischen mütterlichen Seren und väterlichen Thrombozyten in MAIPA (*monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens*) geeignet und sind als Ersatz von zeigten, dass das Oe-Alloantigen auf dem GPIIIa lokalisiert ist. Diese Ergebnisse konnten mit Hilfe von immunchemischen Untersuchungen (Immunopräzipitation, Immunoblot) bestätigt werden.

Molekulargenetische Untersuchungen zeigten, dass das Oe-Alloantigen nicht wie alle anderen bisher bekannten thrombozytären Alloantigene durch Mutation, sondern durch eine Deletion der Aminosäure Lysin an der Position 611 ( $\Delta$ Lys611) verursacht wurde. Diese Deletion liegt in der cysteinreichen Region des carboxyterminalen Endes des GPIIIa Moleküls (Santoso et al., 2002).

Einige Untersuchungen haben kürzlich gezeigt, dass die cysteinreiche Region des GPIIIa Moleküls eine wichtige Rolle in der Regulation des GPIIb/IIIa Rezeptors spielt. Wippler et al. (1994) demonstrierten, dass das Fehlen von Cystein in der GPIIIa-Untereinheit zu einer erhöhten Affinitätsbindung des GPIIb/IIIa-Rezeptors an Fibrinogen führt.

Weiterhin konnten Kashiwagi et al. 1999 zeigen, dass eine Punktmutation (Thr<sub>562</sub>Asn) in der cysteinreichen Region eine Aktivierung sowohl von  $\alpha_{IIb}\beta_3$ - als auch  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin verursachte. Diese Aktivierung führte zur spontanen Fibrinogenbindung (Rezeptor „ON“) und „inside out signalling“.

Um die funktionelle Bedeutung der Lys<sub>611</sub>-Deletion für die GPIIb/IIIa-Rezeptorfunktion zu untersuchen, haben wir mit Hilfe molekularbiologischer Methoden stabile Transfektanten entwickelt, die dauerhaft GPIIb/IIIa Isoformen (Wildtyp und Mutante Lys<sub>611</sub>) auf der



Zelloberfläche exprimieren. Eine Analysen von seltenen Alloantigenen mit Hilfe von Transfektanten ist insbesondere von Vorteil, da die seltenen Alloantigene auf Thrombozyten nur als heterozygote Form existieren.

Die Analyse der Aktivierbarkeit des GPIIb/IIIa Rezeptors und seiner Affinität zu Fibrinogen zeigte keinen Einfluss der Lys<sub>611</sub>-Deletion auf die Integrinfunktion.

Darüberhinaus zeigte der Phosphorylierungsversuch keinen Einfluss der Lys<sub>611</sub>-Deletion auf die Signalübertragung. Diese Ergebnissen legen nahe, dass Lys<sub>611</sub> keinen Einfluß auf die Integrinfunktion zu haben scheint.

Vor sechs Jahren berichteten Weiss et al. (1996), dass die GPIII Polymorphismen HPA-1a und HPA-1b nicht nur als Ursache von Alloimmunthrombozytopenie, sondern auch als genetische Risikofaktoren für die Entstehung einer arteriellen Thrombose eine Rolle spielen. Das seltene Allel HPA-1b wird von manchen Autoren als genetischer Risikofaktor koronare Herzerkrankung angesehen (Feng et al. 1997 und Michelson et al. 2000). Kürzlich zeigte Vijayan et al. 2000, dass HPA-1b Polymorphism die Funktion (z.B. Adhäsion, Aggregation) des GPIIb/IIIa Rezeptors beeinflusst.

Während eine Reihe von Arbeitsgruppen diese Beobachtung bestätigen konnten (Carter et al., 1996; Zotz et al., 1998; Anderson et al., 1999; Bray, 2000; Santoso und Kunicki, 2001; Mikkelsson et al., 2001; Pongracz et al., 2001), fanden andere Gruppen keine Assoziation zwischen PLA-Polymorphismus und Thromboserisiko (Marian et al., 1996; Osborn et al., 1996; Herrmann et al., 1997; Durante-Mangoni et al., 1998; Kekomaki et al., 1999; Böttinger et al., 2000), und in wieder anderen Veröffentlichungen fanden sich Hinweise auf einen Einfluß auf die Plättchenfunktion (Feng et al., 1997; Michelson et al., 2000; Vijayan et al., 2000).

Um den Einfluss des GPIIIa Polymorphismus (Pro33Leu), der verantwortlich für die Bildung von HPA-Epitopen ist, auf die Rezeptorfunktion zu untersuchen, verglichen Bray et al. (2000) die Bindungseigenschaft der Leu33 und Pro33 GPIIIa-Transfektanten.

Ein Unterschied wurde festgestellt bezüglich Fibrinogenbindung, Signalübertragung, Aggregation. Im Gegensatz zu einer Mutation in der cysteinreichen Region bewirkt eine Mutation in der N-terminal Region eine Änderung der Funktion des Rezeptors (Kashiwagi et al., 1999).

Einige Arbeitsgruppen (Flug et al., 1991; Wang et al., 1992) versuchten, kurze allelspezifische Peptide (ca. 13-mer) zum Nachweis von HPA-1, -2 bzw. HPA-3-Alloantikörpern einzusetzen. Die allelspezifischen Peptide für HPA-1a und HPA-1b unterschieden sich zum Beispiel nur um eine Aminosäure (Leucin bzw. Prolin) (Goldberger et al., 1991).

Kürzlich konnten Bowditch et al. (1992) und Barron-Caselle et al. (1994) das aminoterminal Ende vom GPIIIa-Fragment aus 66 Aminosäuren in prokaryontischen Expressionssystemen exprimieren. Dieses Fragment hatte an der Position 33 entweder die Aminosäure Leucin oder Prolin (HPA-1a oder HPA-1b). Die Autoren zeigten, dass solche rekombinanten HPA-1-Antigene zum Nachweis von HPA-1a- und -1b-Antikörpern geeignet sind.

Zum Nachweis der GPIIb/IIIa-Alloantikörper gibt es mehrere Methoden z.B.: funktionelle Tests (Plättchen-Agglutination, Komplementbindungsreaktion), Bindungstests unter Verwendung von sekundären Antikörpern (PIFT, ELISA, FACS), glykoproteinspezifische Verfahren unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern (MAIPA) und immunchemische Verfahren (Western Blot, Radioimmunpräzipitation).

Bindungsverfahren unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten oder enzymmarkierten sekundären Antikörpern sind heute die gebräuchlichsten Methoden zur Detektion von thrombozytären Antikörpern.

Der Nachteil dieser Methoden ist das Fehlen einer Unterscheidungsmöglichkeit zwischen thrombozytenspezifischen Antikörpern und HLA Antikörpern.

HLA Antikörper sind klinisch für die Pathogenese von Alloimmunthrombozytopenie nicht relevant. Deshalb wurde ein glykoproteinspezifischer Assay zum Nachweis von thrombozytenspezifischen Antikörpern entwickelt.

Mit Hilfe der eleganten Methode "MAIPA" wurden thrombozytäre Alloantikörper isoliert. Diese Methode ist ein glykoproteinspezifischer Enzymimmuntest, der mit Hilfe monoklonaler Antikörper eine direkte Identifizierung des von einem Antikörper erkannten Glykoproteins erlaubt (Kiefel et al., 1987). Die Grundlage für den Antikörpernachweis mit der MAIPA-Methode ist, dass auf der Thrombozytenmembran ein trimolekularer Protein-Komplex aus zwei Antikörpern, einem humanen und einem monoklonalen Antikörper der Maus, die mit unterschiedlichen Determinanten auf dem gleichen Glykoprotein reagieren, entsteht.

Obwohl MAIPA zum Nachweis der thrombozytären Alloantikörper verwendet werden kann, ist die Anwendung auf Antigene von frischen Thrombozyten jedoch noch beschränkt. Die Isolierung der Antigene aus frischen Thrombozyten bereitet in der Thrombozytenserologie noch größere Probleme. Darüber hinaus gibt es Schwierigkeiten beim Nachweis von Antikörpern gegen seltene Antigene.

Dieses Problem führt zu dem Versuch, stabile Säugerzelllinien wie CHO-Zellen zu verwenden. CHO-Zellen werden mit cDNA transfektiert, welches zur Genexpression von Human Platelet Antigen (HPA) führt. Eventuell könnten stabile Transfektanten ausser für funktionelle Untersuchung auch zur Gewinnung von Thrombozyten-Antigen (als Reagenzien) eingesetzt werden.

Die Anwendung solcher Transfektanten als Reagenzien zum Nachweis von Alloantikörpern gegen Neutrophil Antigen (NA) wurde bereits eingesetzt (Bux, et al., 1999).

Kürzlich berichteten Telen et al. (1994) über die Anwendung von rekombinanten Cromer-Blutgruppenantigenen aus Transfektanten zum Nachweis von anti-Cromer-Antikörpern in humanen Seren. Diese Autoren verwendeten Zellysate aus ihren Transfektanten als Antigen im Dot-Blot. Basierend auf diesen Ergebnissen haben wir stabile Transfektanten etabliert, die HPA-1a und HPA-1b Antigenen exprimieren. Die direkte Austestung von solchen Zelllinien in der Durchflußzytometrie mit anti-HPA-1a oder anti-HPA-1b Seren zeigte leider unspezifische Reaktionen, die durch Vorabsorption der Seren mit nicht transfizierten CHO-Zellen eliminiert werden konnten. Diese Methode ist allerdings umständlich und daher schlecht in der Routinelabor Diagnostik anwendbar. Solche Transfektanten sind aber für die MAIPA (*monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens*) geeignet und können als Ersatz von seltenen Thrombozyten eingesetzt werden.

Auf dem tiermedizinischen Sektor besteht bezüglich der Immunthrombozytopenien noch ein erheblicher Bedarf an Grundlagenforschung. Es ist anzustreben, dass mit den heutigen Kenntnissen und Arbeitsmethoden aus der Humanmedizin die Möglichkeit genutzt wird, bei Tieren die molekulargenetischen Grundlagen für die Bindung antigener Strukturen auf Thrombozyten zu analysieren und darauf basierend neue Ansätze für die pränatale und postnatale Diagnostik und Therapie in der Veterinärmedizin zu entwickeln. Die Aufklärung der molekularen Grundlagen der NAIT bei Tieren würde auch die Möglichkeit eröffnen, Tiermodelle zu etablieren, um die Vorsorge und Therapie bei Kindern mit NAIT zu verbessern.

## 6. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird eine Methode zum Nachweis von Alloantikörper gegen das thrombozytäre Oberflächenglykoprotein GPIIb/IIIa als Ursache der neonatalen Alloimmunthrombozytopenie (NAIT) vorgestellt.

Mit Hilfe molekularbiologische Methoden wurden stabile Transfektanten mit HPA-1a, HPA-1b und Oe<sup>a</sup>-Antigenen des GPIIb/IIIa entwickelt. Diese können für die Detektion von Alloantikörper bei neonataler Alloimmunthrombozytopenie verwendet werden. Darüberhinaus können solche Transfektanten für die Analyse der Funktion von GPIIb/IIIa-Rezeptor eingesetzt werden. Aus der Analyse von natürlichen Punktmutationen (wie zum Beispiel Oe<sup>a</sup>) lässt sich weitere Information über die Struktur des GPIIb/IIIa-Rezeptors ableiten.

Weitere Anstrengung in der Zukunft werden sein, gereinigte Antigene aus solchen Transfektanten in großen Mengen zu isolieren und in einem einfachen Solid-Phase-Testsystem einzusetzen. Ein solches Testsystem würde eine schnelle Diagnose der Alloimmunthrombozytopenien ermöglichen, die für die richtige Therapiestrategie der Kinder mit der neonatalen Alloimmunthrombozytopenie unabdingbar ist.

Auf dem tiermedizinischen Bereich besteht bezüglich der Immunthrombozytopenien noch ein erheblicher Bedarf an Grundlagenforschung. Es ist anzustreben, dass mit den heutigen Kenntnissen und Arbeitsmethoden aus der Humanmedizin die Möglichkeit genutzt wird, bei Tieren die molekulargenetischen Grundlagen der Antigenstrukturen auf Thrombozyten zu analysieren und darauf basierend neue Ansätze für die pränatale und postnatale Diagnostik und Therapie in der Veterinärmedizin zu entwickeln. Die Aufklärung der molekularen Grundlagen der NAIT bei Tieren würde auch die Möglichkeit eröffnen, Tiermodelle zu etablieren, um die Pathomechanismen der Alloimmunthrombozytopenie besser zu verstehen und die Vorsorge und Therapie bei Kindern mit NAIT zu verbessern.

## 7. Summary

It is well known that alloantibodies against the platelet glycoprotein IIb/IIIa polymorphism (HPA-1a and HPA-1b) as a major cause of neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT). However, the laboratory diagnostic of these antibodies is hampered by the use of serological technique, which is still cumbersome and time consuming. Here, with the help of molecular biological methods we developed stable transfectants expressing HPA-1a and HPA-1b epitopes. We could demonstrate that these transfectants were able to differentiate anti-HPA-1a and anti-HPA-1b antibodies in flowcytometry. Thus, in the future such transfectant can be used directly for the detection of HPA-1a antibody. These stable cell lines represent a source for production of recombinant HPA-1 antigens and will help us to develop simple serological assay (solid phase assay) for the detection of anti-HPA. Such test system will help us to accelerate the diagnosis of alloimmune thrombocytopenia, which is necessary for the adequate therapy of the children with neonatal alloimmune thrombocytopenia.

Futhermore, by the development of stable transfectant expressing Oe<sup>a</sup> alloantigen, we were able to demonstrate that the deletion of aminoacid 611 in the cysteine-rich region of GPIIIa is responsible for the epitope formation of Oe<sup>a</sup>, but has no influence on the function of GPIIb/IIIa receptor. Analysis of natural point mutations (e.g. Oe<sup>a</sup>) will provide us further information about the structure of important functional region of the GPIIb/IIIa receptor.

The transfer of this knowledge in veterinary medicine concerning the immune thrombocytopenia is a challenge for the research, which is necessary for the development of animal model to study the pathophysiology and therapy of NAIT.

## 8. Abkürzungen

Ak	Antikörper
CHO	Chinese Hamster Ovary
ELISA	Enzymimmuntest
FACS	fluoreszenzaktivierter Zellsorter
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
GP	Glykoprotein
HLA	Human Leukozyte Antigen
HPA	Human Platelet Antigen
mAk	monoklonaler Antikörper
MAIPA	monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens
NAIT	neonatale Alloimmunthrombozytopenie
PCR	polymerase chain reaction
PIFT	Plättchen-Immunfluoreszentest
PTP	posttransfusionelle Purpura
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAH	rabbit anti human
RAM	rabbit anti mice
RES	reticuloendotheliales System
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
SSP	sequenzspezifische Primer
TP	thrombozytopenische Purpura

## 9. Literaturverzeichnis

Andersen S, Nielsen R

Pathology of isoimmune purpura thrombocytopenica in Piglets. *Nordisk Veterinaermedicin* 1973; 25:211-219.

Anderson JL, King GJ, Bair TL, Elmer SP, Muhlestein JB, Habashi J, Carlquist JF. Associations between a polymorphism in the gene encoding glycoprotein IIIa and myocardial infarction or coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33:727-733.

Arnaout MA, Goodman SL, Xiong JP.

Coming to grips with integrin binding to ligands Opinion. *Cell Biology* 2002; 14:641-651.

Barron-Caselle EA, Kickler TS, Rogers OC, Casella JF.

Expression and purification of functional recombinant epitopes for the platelet antigens, PI<sup>A1</sup> and PI<sup>A2</sup>. *Blood* 1994; 84: 1157-63.

Borne AE, Verheugt FW, Oosterhof F, Riesz E, de la Riviere AB, Engelfriet CP.

A simple immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies. *Br J Haematol* 1978; 39:195-207.

Böttinger C, Kastrati A, Koch W, Mehilli J, Seidl H, Schomig K, von Beckerath N, Schomig A.

HPA-1 and HPA-3 polymorphisms of the platelet fibrinogen receptor and coronary artery disease and myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2000; 83:559-562.

Bray PF, Barsh G, Rosa JP, Luo XY, Magenis E, Shuman MA.

Physical linkage of the genes for platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:8683-7.

Bray PF.

Platelet glycoprotein polymorphisms as risk factors for thrombosis. *Curr Opin Hematol* 2000; 7:284-9.

Bresnahan PA, Leduc R, Thomas L, Thorner J, Gibson HL, Brake AJ, Barr PJ, Thomas G.

Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro- $\beta$ -NGF in vivo. *J Cell Biol* 1990; 111:2851-9.

Bowditch RD, Tani PH, Halloran CE, Frelinger III AL, McMillan R, Ginsberg MH.

Localization of a PI<sup>A1</sup> epitope to the amino terminal 66 residues of platelet glycoprotein IIIa. *Blood* 1992; 79:559-62

Buechner-Maxwell V, Scott MA, Godber L, Kristensen A.

Neonatal alloimmune thrombocytopenia in a quarter horse foal. *J Vet Int Med* 1997; 11:304-308.



- Bux J, Kissel K, Hofmann C, Santoso S.  
The use of allele-specific recombinant Fc gamma receptor IIIb antigens for the detection of granulocyte antibodies. *Blood* 1999; 93:357-362.
- Caen J  
Bleeding time. *Nouv Presse Med* 1972; 1:711-3.
- Caen JP, Rosa JP  
Platelet-Vessel wall interaction: from the bedside to molecules. *Thromb Haemost* 1995; 74:18-24.
- Calvete JJ, Henschen A, Gonzales-Rodriguez J.  
Assignment of disulphide bonds in human platelet GPIIIa. A disulphide pattern for the  $\beta$ -subunits of the integrin family. *Biochem J* 1991; 274:63-71.
- Calvete JJ, Henschen A, Gonzalez-Rodriguez J.  
Complete localization of the intrachain disulphide bonds and the N-glycosylation points in the  $\alpha$ -subunit of human platelet glycoprotein IIb. *Biochem J* 1989; 261:561-568.
- Carrell NA, Fitzgerald LA, Steiner B, Erickson HP, Phillipps DR.  
Structure of human platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa as determined by electron microscopy. *J Biol Chem* 1985; 260:1743-1749.
- Carter AM, Ossei-Gerning N, Grant PJ.  
Platelet glycoprotein IIIa P1<sup>A</sup> polymorphism in young men with myocardial infarction. *Lancet* 1996; 348:485-6.
- Cieutat A-M, Rosa J-P, Letourneuer F, Poncz M, Rifat S.  
A comparative analysis of cDNA-derived sequences for rat and mouse  $\beta_3$  integrins (GPIIIa) with their human counterpart. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 193:771-778.
- Charo IF, Fitzgerald LA, Steiner B, Rall SC Jr, Bekeart LS, Phillips DR.  
Platelet glycoproteins IIb and IIIa: evidence for a family of immunologically and structurally related glycoproteins in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:8351-5.
- Damsky CH, Ilic D.  
Integrin signaling: it's where the action is. *Cell Biol* 2002; 14:594-602
- DeSimone DW, Hynes RO.  
Xenopus laevis integrins. Structural conservation and evolutionary divergence of integrin beta subunits. *J Biol Chem* 1988; 263:5333-5340.
- Dimmock CK, Webster WR, Shiels IA, Edwards CL.  
Isoimmune thrombocytopenic purpura in piglets. *Australian Veterinary Journal* 1982; 59:157-159.
- Djaffar I, Vilette D, Bray PF, Rosa JP.  
Quantitative isolation of RNA from human platelet. *Thromb Res* 1991; 62:127-135.

D'Souza SE, Ginsberg MH, Lam SC, Plow EF.

Chemical cross-linking of arginyl-glycyl-aspartic acid peptides to an adhesion receptor on platelets. *J Biol Chem* 1988; 263:3943-51.

D'Souza SE, Ginsberg MH, Burke TA, Plow EF.

The ligand binding site of the platelet integrin receptor GPIIb/IIIa is proximal to the second calcium binding domain of its alpha subunit. *J Biol Chem* 1990; 265:3440-6.

Du X, Ginsberg MH.

Integrin alpha IIb beta 3 and platelet function. *Thromb Haemost* 1997; 78:96-100.

Durante-Mangoni E, Davies GJ, Ahmed N, Ruggiero G, Tuddenham EG.

Coronary thrombosis and the platelet glycoprotein IIIa gene  $PI^{A2}$  polymorphism. *Thromb Haemost* 1998; 80:218-219.

Farrell DH, Thiagarajan P, Chung DW, Davie EW.

Role of fibrinogen alpha and gamma chain sites in platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:10729-32.

Feigelson SW, Grabovsky V, Winter E, Chen LL, Pepinsky RB, Yednock T, Yablonski D, Lobb R, Alon R.

The Src kinase p56 (Lck) up-regulates VLA-4 integrin affinity. Implications for rapid spontaneous and chemokine-triggered T cell adhesion to VCAM-1 and fibronectin. *J Biol Chem* 2001; 276:13891-13901.

Feng D, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, O'Donnell CJ, Lipinska I, Schmitz C, Sutherland PA, Silbershatz H, D'Agostino RB, Muller JE, Myers RH, Levy D, Tofler GH.

Increased platelet aggregability associated with platelet GPIIIa polymorphism: the Farmingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 19:1142-1147.

Ferrell JE Jr, Martin GS.

Thrombin stimulates the activities of multiple previously unidentified protein kinases in platelets. *J Biol Chem* 1989; 264:20723-9.

Fitzgerald LA, Steiner B, Rall SC Jr, Lo SS, Phillipps DR.

Protein sequence of endothelial glycoprotein IIIa derived from a cDNA clone. Identity with platelet glycoprotein IIIa and similarity to "integrin". *J Biol Chem* 1987; 262:3936-3939.

Flug F, Espinola R, Liu LX, SinQuee C, DaRosso R, Nardi M, Karpatkin S.

A 13-mer peptide straddling the leucine33/proline polymorphism in glycoprotein IIIa does not define the  $PI^{A1}$  epitope. *Blood* 1991; 77: 1964-9.

Fox JE.

The platelet cytoskeleton. *Thromb Haemost* 1993; 70:884-93.

Fox JE, Shattil SJ, Kinlough-Rathbone RL, Richardson M, Packham MA, Sanan DA. The platelet cytoskeleton stabilizes the interaction between  $\alpha_{IIb}\beta_3$  and its ligand and induces selective movements of ligand-occupied integrin. *J Biol Chem* 1996; 271:7004-11.

Fujimura K, Phillips DR.

Calcium cation regulation of glycoprotein IIb/IIIa complex formation in platelet plasma membranes. *J Biol Chem* 1983; 258:10247-52.

Fujimura K, Fujimoto T, Takemoto M, Oda K, Maehama S, Kuramoto A.

Cytoskeletal proteins in blood platelets. *Rinsho Byori* 1987; 73:1-13. Japanese.

Gailit J, Ruoslahti E.

Regulation of the fibronectin receptor affinity by divalent cations. *J Biol Chem* 1988; 263:12927-32.

Gawaz M.

Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York 1999; 1:30-33

George JN, Caen JP, Nurden AT.

Glanzmann's thrombasthenia: The spectrum of clinical disease. *Blood* 1990; 75:1383-1395.

Ginsberg MH, Du X, Plow EF.

Inside-out integrin signalling. *Curr Opin Cell Biol* 1992; 4:766-71.

Ginsberg MH, Du X, O'Toole TE, Loftus JC.

Platelet integrins. *Thromb Haemost* 1995; 74:352-9.

Goldberger A, Kolodziej M, Poncz M, Bennett JS, Newman PJ.

Effect of single amino acid substitutions on the formation of the P1A and Bak alloantigenic epitopes. *Blood* 1991; 78:681-7.

Govaert P, Bridger J, Wigglesworth J.

Nature of the brain lesion in fetal allo-immune thrombocytopenia. *Dev Med Child Neurol* 1995; 37:485-95.

Grabovsky V, Feigelson S, Chen C, Bleijs DA, Peled A, Cinamon G, Baleux F, Arenzana-Seisdedos F, Lapidot T, van Kooyk Y, Lobb RR, Alon R.

Subsecond induction of  $\alpha_4$ -integrin clustering by immobilized chemokines stimulates leukocyte tethering and rolling on endothelial vascular cell adhesion molecule 1 under flow conditions. *J Exp Med* 2000; 192:495-506.

Grimaldi CM, Chen F, Wu C, Weiss HJ, Coller BS, French DL.

Glycoprotein IIb Leu214Pro mutation produces glanzmann thrombasthenia with both quantitative and qualitative abnormalities in GPIIb/IIIa. *Blood* 1998; 91:1562-71.

Hall SA, Rest JR, Linklater KA, McTaggart HS.

Concurrent haemolytic disease of the newborn and thrombocytopenic purpura in piglets without artificial immunisation of the dam. *Vet Rec* 1972; 91:677-678.

Häni H.

Thrombozytopenische Purpura bei Saugferkeln aus 3 Würfen der gleichen Elterntiere. Schweiz Arch Tierhkd 1976; 118:347-350.

Hantgan RR, Hindriks G, Taylor RG, Sixma JJ, de Groot PG.

Glycoprotein Ib, von Willebrand factor, and glycoprotein IIb/IIIa are all involved in platelet adhesion to fibrin in flowing whole blood. Blood 1990; 76:345-53.

Heidenreich R, Eisman R, Surrey S, Delgrosso K, Bennett JS, Schwartz E, Poncz M.

Organization of the gene for platelet glycoprotein IIb. Biochemistry 1990; 29:1232-44.

Hemler ME, Ware CF, Strominger JL.

Characterization of a novel differentiation antigen complex recognized by a monoclonal antibody (A1A5): unique activation-specific molecular forms on stimulated T cells. J Immunol 1983; 131:334-340.

Hemler ME.

Structures and functions of VLA proteins and related integrins. In: Receptors for Extracellular Matrix. Hrsg. McDonald JA, Mecham RP. Academic Press, San Diego, California 1991; 255-287.

Herrmann SM, Poirier O, Marques-Vidal P, Evans A, Arveiler D, Luc G, Emmerich J, Cambien F.

The Leu33/Pro polymorphism (PI<sup>A1</sup>/PI<sup>A2</sup>) of the glycoprotein IIIa (GPIIIa) receptor is not related to myocardial infarction in the ECTIM study. Thromb Haemost 1997; 77:1179-1181.

Humphries MJ.

Integrin activation: the link between ligand binding and signal transduction. Curr Opin Cell Biol 1996; 8:632-640.

Humphries MJ.

Integrin structure. Biochem Soc Trans 2000; 28:311-339.

Hynes RO.

Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell 1992; 69:11-25.

Hynes RO, Bader BL.

Targeted mutations in integrins and their ligands: their implications for vascular biology. Thromb Haemost 1997; 78:83-7.

Isenberg WM, McEver RP, Phillips DR, Shuman MA, Bainton DF.

The platelet fibrinogen receptor: an immunogold-surface replica study of agonist-induced ligand binding and receptor clustering. J Cell Biol 1987; 104:1655-63.

Jallu V, Meunier M, Brement M, Kaplan C.

A new platelet polymorphism Duv<sup>at</sup>, localized within the RGD binding domain of glycoprotein IIIa, is associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia. Blood 2002; 99:4449-56.

Jennings LK, Phillips DR.

Purification of glycoproteins IIb and IIIa from human platelet plasma membranes and characterization of a calcium-dependent glycoprotein IIb/IIIa complex. *J Biol Chem* 1982; 257: 10458-10466.

Kashiwagi H, Tomiyama Y, Tadokoro S, Honda S, Shiraga M, Mizutani H, Handa M, Kurata Y, Matsuzawa Y, Shattil SJ.

A mutation in the extracellular cysteine-rich repeat region of the  $\beta_3$  subunit activates integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  and  $\alpha_v\beta_3$ . *Blood* 1999; 93:2559-2568.

Kato A, Yamamoto K, Miyazaki S, Jung SM, Moroi M, Aoki N.

Molecular basis for Glanzmann's thrombasthenia (GT) in a compound heterozygote with glycoprotein IIb gene: a proposal for the classification of GT based on the biosynthetic pathway of glycoprotein IIb/IIIa complex. *Blood* 1992; 79:3212-8.

Kekomäki R, Partanen J, Pitkänen S, Ilanmaa E, Ämmälä P, Teramo K.

Glycoprotein Ib/IX-specific alloimmunization in an HPA 2b-homozygous mother in association with neonatal thrombocytopenia. *Thromb Haemostas* 1993; 69:99.

Kekomäki R, Raivio P, Kero P.

A new low-frequency platelet-specific alloantigen, Va<sup>a</sup>, on glycoprotein IIIa, involved in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfus Med* 1992; 2:27-33.

Kekomäki S, Partanen J, Kekomäki R.

Platelet alloantigens HPA-1, -2, -3, -5 and -6b in Finns. *Transfus Med* 1995; 5:193-198.

Kekomaki S, Hamalainen L, Kaupppinen-Makelin R, Palomaki H, Kaste M, Kontula K.

Genetic polymorphism of platelet glycoprotein IIIa in patients with acute myocardial infarction and acuta ischaemic stroke. *J Cardiovasc Risk* 1999; 6:13-17.

Kiefel V, Kroll H, Bonnert J, Unkelbach K, Katzmann B, Nebenführer Z, Santoso S, Mueller-Eckhardt C.

Platelet alloantigen frequencies in Caucasians: a serological study. *Transfus Med* 1993a; 3: 237.

Kiefel V, Kroll H, Mueller-Eckhardt C.

Neonatale Alloimmunthrombozytopenien. *Dtsch Med Wschr* 1994; 119:1512-1517.

Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, Mueller-Eckhardt C.

Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood* 1987a; 70:1722-1726.

Kiefel V, Shechter Y, Atias D, Kroll H, Santoso S, Mueller-Eckhardt C.

Neonatal alloimmune thrombocytopenia due to Anti-Br<sup>b</sup> (HPA-5a). *Vox Sang* 1991; 60:244-245.

Kloczewiak M, Timmons S, Hawiger J.

Localization of a site interacting with human platelet receptor on carboxy-terminal segment of human fibrinogen gamma chain. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 107:181-7.

- Kolodziej MA, Vilaire G, Gonder D, Poncz M, Bennett JS.  
Study of the endoproteolytic cleavage of platelet glycoprotein IIb using oligonucleotide-mediated mutagenesis 1991; 266:23499-504.
- Kretsinger RH.  
Evolution and function of calcium-binding proteins. *Int Rev Cytol* 1976; 46:323-93.
- Kroll H, Kiefel V, Giers G, Bald R, Hoch J, Hanfland P, Hansmann M, Mueller-Eckhardt C.  
Maternal intravenous immunoglobulin treatment does not prevent intracranial haemorrhage in fetal alloimmune thrombocytopenia. *Tranfus Med* 1994; 4:293-296.
- Kroll H, Santoso S, Böhringer M, Ernst-Schlegel M, Adam K, Mueller-Eckhardt C, Kiefel V.  
Neonatal alloimmune thrombocytopenia caused by immunization against Oe<sup>a</sup>, a new low frequency alloantigen on platelet glycoprotein IIIa. *Blood* 1995; 86:540a
- Kroll H, Kiefel V, Santoso S.  
Clinical aspects and typing of platelet alloantigens. *Vox Sang* 1998; 74:345-354.
- Kuijpers RWAM, Faber NM; Cuypers HTM, Ouwehand WH, Borne AEGK.  
The NH<sub>2</sub>-terminal globular domain of human platelet glycoprotein Ib $\alpha$  has a methionine 145/threonine 145 amino acid polymorphism, which is associated with the HPA-2 (Ko) alloantigens. *J Clin Invest* 1992; 89:381-384.
- Kuijpers RWAM, Simsek S, Faber NM, Goldschmeding R, van Wermerkerken RKV, von dem Borne AEGK.  
Single point mutation in human glycoprotein IIIa is associated with a new platelet-specific alloantigen (Mo) involved in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood* 1993; 81:70-76.
- Kuijpers RWAM, van den Anker JN, Baerts W, von dem Borne AE.  
A case of severe neonatal thrombocytopenia with schizencephaly associated with anti-HPA-1b anti-HPA-2a. *Br J Haematol* 1994; 87:576-579.
- Kunicki TJ, Kritzik M, Annis DS, Nugent DJ.  
Hereditary variation in platelet integrin  $\alpha_2\beta_1$  density is associated with two silent polymorphisms in the  $\alpha_2$  gene coding sequence. *Blood* 1997; 6:1939-1943.
- Kunicki TJ, Nugent DJ, Staats SJ, Orzechowski RP, Wayner EA, Carter WG.  
The human fibroblast class II extracellular matrix receptor mediates platelet adhesion to collagen and is identical to the platelet glycoprotein Ia/IIa complex. *J Biol Chem* 1988; 263: 4516-4519.
- Kunicki TJ, Orzechowski R, Annis D, Honda Y.  
Variability of integrin  $\alpha_2\beta_1$  activity on human platelet. *Blood* 1993; 82:2693-2703.
- Kunicki TJ, Pidard D, Rosa JP, Nurden AT.  
The formation of Ca<sup>++</sup>-dependent complexes of platelet membrane glycoprotein IIb and IIIa in solution as determined by crossed immunoelectrophoresis. *Blood* 1981; 58:268-278.

Kunicki TJ, Newman PJ.

The molecular immunology of human platelet proteins. *Blood* 1992; 80:1386.

Lages B, Weiss HJ.

Evidence for a role of glycoprotein IIb-IIIa, distinct from its ability to support aggregation, in platelet activation by ionophores in the presence of extracellular divalent cations. *Blood* 1994; 83:2549-59.

Lam SC, Plow EF, Smith MA, Andrieux A, Ryckwaert JJ, Marguerie G, Ginsberg MH. Evidence that arginyl-glycyl-aspartate peptides and fibrinogen gamma chain peptides share a common binding site on platelets. *J Biol Chem* 1987; 262:947-50.

Lanza F, Kieffer N, Phillips DR, Fitzgerald LA.

Characterization of the human platelet glycoprotein IIIa gene. Comparison with the fibronectin receptor  $\beta$  subunit gene. *J Biol Chem* 1990; 265:18098-18103.

Law DA, Nannizzi-Alaimo L, Phillips DR.

Outside-in integrin signal transduction.  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -(GPIIb/IIIa) tyrosine phosphorylation induced by platelet aggregation.

*J Biol Chem* 1996; 271:10811-5.

Lefkovits J, Topol EJ.

Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitors in ischemic heart disease. *Curr Opin Cardiol* 1995; 10:420-6.

Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, Castelbaum A, Albelda SM, Buck CA.

Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J Clin Invest* 1992; 90:188-95.

Lessey BA.

The use of integrins for the assessment of uterine receptivity. *Fertil Steril* 1994; 61:812-4.

Lie H.

Thrombocytopenic purpura in baby pigs. *Acta Vet Scand* 1968; 9:285-301.

Linklater KA, McTaggart HS, Imlah P.

Haemolytic disease of the newborn, thrombocytopenic purpura and neutropenia occurring concurrently in a litter of piglets. *Brit Vet J* 1973; 129:36-46.

Linklater KA.

The experimental reproduction of thrombocytopenic purpura in piglets. *Res Vet Sci* 1975; 18:127-133.

Lipscomb D-L, Bourne C, Boudreaux M-K.

DNA sequence of the canine platelet  $\beta_3$  gene from cDNA: comparison of canine and mouse  $\beta_3$  to segments that encode alloantigenic sites and functional domains of  $\beta_3$  in human beings. *J Lab Clin Med* 1999; 134:313-321.

Loftus JC, Plow EF, Frelinger AL 3rd, D'Souza SE, Dixon D, Lacy J, Sorge J, Ginsberg MH. Molecular cloning and chemical synthesis of a region of platelet glycoprotein IIb involved in adhesive function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:7114-8.

Loghem JJ van, Dorfmeijer H, van der Hart M, Schreuder F. Serological and genetical studies on a platelet antigen (Zw). *Vox Sang* 1959; 4:161-169.

Lyman S, Aster RH, Visentin GP, Newman PJ. Polymorphism of human platelet membrane glycoprotein IIb associated with the Bak<sup>a</sup>/Bak<sup>b</sup> alloantigen system. *Blood* 1990; 75:2343-2348.

Marian AJ, Brugada R, Kleiman NS. Platelet glycoprotein IIIa PLA polymorphism and myocardial infarction. *N Engl J Med* 1996; 335:1071-1072.

Malanska K, Yassai M, Gorski J. Molecular identification of T cell that respond in primary bulk culture to a peptide derived from a platelet glycoprotein implicated in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *J Clin Invest* 1996; 98:1802-1808.

McFarland JG. Platelet and neutrophil alloantigen genotyping in clinical practice. *Transfus Clin Biol* 1998; 5:13-21

Mikkelsson J, Perola M, Laippala P, Penttila A, Karhunen PJ. PI (A1/A2) polymorphism and sudden cardiac death. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36:13-23.

Michelson AD, Furman MI, Goldschmidt-Clermont P, Mascelli MA, Hendrix C, Coleman L, Hamlington J, Barnard MR, Kickler T, Christie DJ, Kundu S, Bray PF. Platelet GPIIIa PI(A) polymorphisms display different sensitivities to agonists. *Circulation* 2000; 101:1013-1018.

Morel-Kopp MC, Kaplan C, Proulle V, Jallu V, Melchior C, Peyruchaud O, Arousseau MH, Kieffer N. A three amino acid deletion in glycoprotein IIIa is responsible for type I Glanzmann's thrombasthenia: importance of residues Ile 325 Pro 326 Gly 327 for  $\beta_3$ -integrin subunit association. *Blood* 1997; 90:669-77.

Mueller-Eckhardt C, Kiefel V, Grubert A. High-dose IgG treatment for neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blut* 1989; 59:145-146.

Mueller-Eckhardt C, Gaedicke G, Bartmann P. Perinatale und pädiatrische Transfusionsmedizin. In: C. Mueller-Eckhardt (Hrsg.) *Transfusionsmedizin*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York 1996; 2:455-483.

Newman PJ, Derbes RS, Aster RH. The human platelet alloantigens, PI<sup>A1</sup> and PI<sup>A2</sup>, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest* 1989; 83:1778-1781.



- Newman PJ, Gorski J, White GC II., Gidwitz S, Cretney CJ, Aster RH.  
Enzymatic amplification of platelet-specific messenger RNA using the polymerase chain reaction. *J Clin Invest* 1988; 82:739-743.
- Newman PJ, Valentin N.  
Human platelet alloantigens: Recent findings, new perspectives. *Thromb Haemost* 1995; 74: 234-239.
- Newman PJ.  
Platelet GPIIb/IIIa: molecular variations and alloantigens. *Thromb Haemost* 1991; 66:111-118.
- Nielsen K, Nielsen R, Andersen S, Nansen P.  
Isoimmune purpura thrombocytopenica in piglets. *Folia Vet Lat* 1973; 3:32-51.
- Nordstoga K.  
Thrombocytopenic purpura in baby pigs caused by maternal isoimmunization. *Path Vet* 1965; 2:601-610.
- Noris P, Simsek S, de Bruijne-Admiraal LG, Porcelijn L, Huiskes E, van der Vlist GJ, van Leeuwen EF, van der Schoot CE, von dem Borne AEGK.  
Maxa, a new low-frequency platelet-specific antigen localized on glycoprotein IIb, is associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood* 1995; 86:1019-1026.
- Nurden AT, Caen JP.  
An abnormal platelet glycoprotein pattern in three cases of Glanzmann's thrombasthenia. *Br J Haematol* 1974; 28:253-60.
- Osborn SV, Hampton KK, Smillie D, Channer KS, Daly ME.  
Platelet glycoprotein IIIa gene polymorphism and myocardial infarction. *Lancet* 1996; 348:1309-1310.
- O'Toole TE, Loftus JC, Plow EF, Glass AA, Harper JR, Ginsberg MH.  
Efficient surface expression of platelet GPIIb/IIIa requires both subunits. *Blood* 1989; 74:14-8.
- O'Toole TE, Loftus JC, Du XP, Glass AA, Ruggeri ZM, Shattil SJ, Plow EF, Ginsberg MH.  
Affinity modulation of the  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -integrin (platelet GPIIb/IIIa) is an intrinsic property of the receptor. *Cell Regul* 1990; 1:883-93.
- O'Toole TE, Katagiri Y, Faull RJ, Peter K, Tamura R, Quaranta V, Loftus JC, Shattil SJ, Ginsberg MH.  
Integrin cytoplasmic domains mediate inside-out signal transduction. *J Cell Biol* 1994; 124:1047-59.
- Pierschbacher MD, Ruoslahti E.  
Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81:5985-8.

Peyruchaud O, Bourre F, Morel-Kopp MC, Reviron D, Mercier P, Nurden A, Kaplan C. HPA-10w(b) (La(a)): genetic determination of a new platelet-specific alloantigen on glycoprotein IIIa and its expression in CHO-7 cells. *Blood* 1997; 89:2422-2428.

Phillips DR, Agin PP

Platelet plasma membrane glycoproteins. Evidence for the presence of nonequivalent disulfide bonds using nonreduced-reduced two-dimensional gel electrophoresis. *J Biol Chem* 1977; 252:2121

Phillips DR, Baughan AK

Fibrinogen binding to human platelet plasma membranes. Identification of two steps requiring divalent cations. *J Biol Chem* 1983; 258:10240-10246.

Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA.

The platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex. *Blood* 1988; 71:831-43.

Phillips DR, Charo IF, Scarborough RM.

GPIIb/IIIa: the responsive integrin. *Cell* 1991; 65:359-62.

Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW.

Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* 2000; 275:21785-8.

Poncz M, Eisman R, Heidenreich R, Silver SM, Vilaire G, Surrey S, Schwartz E, Bennett JS.

Structure of the platelet membrane glycoprotein IIb. Homology to the alpha subunits of the vitronectin and fibronectin membrane receptors. *J Biol Chem* 1987; 262:8476-82.

Poncz M, Newman PJ.

Analysis of rodent platelet glycoprotein IIb: evidence for evolutionarily conserved domains and alternative proteolytic processing. *Blood* 1990; 75:1282-1289.

Pongracz E, Tordai A, Csornai M, Nagy Z.

Platelet glycoprotein IIb/IIIa (LeuPro 33) polymorphism in stroke patients. *Orv Heti* 2001; 142:781-5.

Pytela R, Pierschbacher MD, Ginsberg MH, Plow EF, Ruoslahti E.

Platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa: member of a family of Arg-Gly-Asp-specific adhesion receptors. *Science* 1986; 231:1559-62.

Ransom D-G, Hens M-D, DeSimone D-W.

Integrin expression in early amphibian embryos: cDNA cloning and characterization of *Xenopus*  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ , and  $\beta_6$  subunits. *Dev Biol* 1993; 160:265-275.

Santoso S, Zimmermann U, Neppert J, Mueller-Eckhardt C.

Receptor patching and capping of platelet membranes induced by monoclonal antibodies. *Blood* 1986; 67:343-9.

Santoso S, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C.

Immunochemical characterization of the new platelet alloantigen system Br<sup>a</sup>/Br<sup>b</sup>. *Br J Haematol* 1989a; 72:191-198.

- Santoso S, Santoso S, Kiefel V, Masri R, Mueller-Eckhardt C.  
Frequency of platelet-specific antigens among Indonesians. *Transfusion* 1993a; 33:739-741.
- Santoso S, Kalb R, Walka M, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C, Newman PJ.  
The human platelet alloantigens Br<sup>a</sup> and Br<sup>b</sup> Are Associated with a Single Amino Acid Polymorphism on Glycoprotein Ia (Integrin Subunit  $\alpha_2$ ). *J Clin Invest* 1993; 92:2427-2432.
- Santoso S, Kalb R, Kroll H, Walka M, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C, Newman PJ  
A point mutation leads to an unpaired Cysteine residue and a molecular weight polymorphism of a functional platelet  $\beta_3$ -integrin subunit. *J Biol Chem* 1994; 269:8439-8444.
- Santoso S, Böhringer M, Sachs U, Kroll H, Mueller-Eckhardt C, Kiefel V.  
Point mutation in human platelet glycoprotein Ib $\beta$  is associated with the new platelet specific alloantigen Iy(a). *Blood* 1996; 88:319a.
- Santoso S, Amrhein J, Sachs U, Mueller-Eckhardt C, Kiefel V.  
Single point mutation in glycoprotein Ia is responsible for the formation of a new human platelet alloantigen (Sit) involved in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood* 1997; 90: 261a.
- Santoso S, Kiefel V.  
Human platelet-specific alloantigens: Update. *Vox Sang* 1998; 74:249-253.
- Santoso S, Kunicki T.  
Platelet polymorphisms in thrombotic disorders. *Transfus Clin Biol* 2000; 8:1-6.
- Santoso S, Kiefel V, Richter IG, Sachs UJH, Rahman A, Carl B, Kroll H.  
A functional platelet fibrinogen receptor with a deletion in the cysteine-rich repeat region of the  $\beta_3$ -integrin: the Oe<sup>a</sup> alloantigen in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood* 2002; 99: 1205-1214.
- Santoso S.  
Human platelet alloantigens. *Transfus Apheres Sci* (in press) 2002.
- Saunders CN, Kinch DA.  
Thrombocytopenic purpura of pigs. *J Comp Path* 1968; 78:513-523.
- Savage B, Shattil SJ, Ruggeri ZM  
Modulation of platelet function through adhesion receptors. A dual role for glycoprotein IIb/IIIa (integrin- $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) mediated by fibrinogen and glycoprotein Ib-von Willebrand factor. *J Biol Chem* 1992; 267:11300-6.
- Schmidt U, Fiedler HH, Hertrampf B.  
Thrombozytopenische Purpura beim Saugferkel (Pathologisch-anatomische Befunde). *Dtsch Tierärztl Wschr* 1974; 81:530-532.
- Schmidt U, Trautwein G, Hertrampf B, Ehard H, Fiedler HH.  
Thrombozytopenische Purpura beim Saugferkel. *Zbl Vet Med B* 1977; 24:386-397.

Schneider W, Schnaidt M.

The platelet adhesion immunofluorescence test: a modification of the platelet suspension immunofluorescence test. *Blut* 1981; 43:389-392.

Schuh AC, Watkins NA, Nguyen Q, Hammer NJ, Lin M, Prosper JYA, Campbell D, Sutherland R, Metcalfe P, Horsfall W and Ouwehand W.

A tyrosine703serine polymorphism of CD 109 defines the Gov platelet alloantigens. *Blood* 2002; 99:1692-1698.

Shattil SJ, Cunningham M, Wiedmer T, Zhao J, Sims PJ, Brass LF.

Regulation of glycoprotein IIb/IIIa receptor function studied with platelet permeabilized by the pore-forming complement protein C5b-9. *J Biol Chem* 1992; 267:18424-18431.

Shattil SJ.

Regulation of platelet anchorage and signaling by integrin- $\alpha_{IIb}\beta_3$ . *Thromb Haemost* 1993; 70:224-8.

Shattil SJ.

Function and regulation of the  $\beta_3$  integrins in hemostasis and vascular biology. *Thromb Haemost* 1995; 74:149-55.

Shulman NR, Marder VJ, Hiller MC, Collier EM.

Platelet and leucocyte isoantigens and their antibodies: Serologic, physiologic and clinical studies. In: Moore CV, Brown EB (Hrsg.). *Prog Hematol* 1964; 4:222-304.

Simsek S, Faber NM, Bleeker PM, Vlekke AB, Huiskes E, Goldschmeding R, von dem Borne AE.

Determination of human platelet antigen frequencies in the Dutch population by immunophenotyping and DNA (allele-specific restriction enzyme) analysis. *Blood* 1993; 81: 835-840.

Simsek S, Vlekke AB, Kuijpers RW, Goldschmeding R, von dem Borne AE.

A new private platelet antigen, Groa, localized on glycoprotein IIIa, involved in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Vox Sang* 1994; 67:302-6

Simsek S, Folman C, van der Schoot CE, von dem Borne AEG.

The Arg633His substitution responsible for the private platelet antigen Gro<sup>a</sup> unravelled by SSCP analysis and direct sequencing. *Br J Haematol* 1997; 97:330-335.

Sims PJ, Wiedmer T.

The response of human platelets to activated components of the complement system. *Immunol Today* 1991; 12:338-42.

Smith JW, Kelton JG, Horsewood G, Brown C, Giles A, Meyer R, Woods V, Burrows R.

Platelet specific alloantigens on the platelet glycoprotein Ia/IIa complex. *Br J Haematol* 1989; 72:534-538.

Smith JW, Piotrowicz RS, Mathis D.

A mechanism for divalent cation regulation of  $\beta_3$ -integrins. *J Biol Chem* 1994; 269:960-967.

Sosnoski DM, Emanuel BS, Hawkins AL, van Tuinen P, Ledbetter DH, Nussbaum RL, Kaos FT, Schwartz E, Phillips D, Bennett JS.

Chromosomal localization of the genes for the vitronectin and fibronectin receptors  $\alpha$  subunits and for platelet glycoproteins IIb and IIIa. *J Clin Invest* 1988; 81:1993-1998.

Stormorken H, Svenkerud R, Slagsvold P, Lie H.

Thrombocytopenic bleeding in young pigs due to maternal isoimmunization. *Nature* 1963; 198:1116-1117.

Svenkerud R.

Über eine isoimmune thrombocytopenische Purpura bei Saugferkeln. *Wien Tierärztl Mschr* 1972; 59:237-239.

Telen MJT, Rao N, Udani M, Thompson ES, Kaufman RM, Lublin DM

Molecular mapping of the Cromer blood group Cra and Tca epitopes of decay accelerating factor: Toward the use of recombinant antigens in immunhematology. *Blood* 1994; 84:3205-3211.

van der Schoot CE, Wester M, Von Dem Borne AE, Huisman HG.

Characterization of platelet-specific alloantigens by immunoblotting: localization of Zw and Bak antigens. *Br J Haematol* 1986; 64:715-23.

Vijayan KV, Goldschmidt-Clermont PJ, Roos C, Bray PF.

The PI(A2) polymorphism of integrin  $\beta_3$  enhances outside-in signaling and adhesive functions. *J Clin Invest* 2000; 105:793-802.

Wagner CL, Mascelli MA, Neblock DS, Weisman HF, Coller BS, Jordan RE

Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood* 1996; 88:907-14.

Wang L, Juji T, Shibata Y, Kuwata S, Tokunaga K.

Sequence variation of human platelet membrane glycoprotein IIIa associated with the Yuk (a)/Yuk(b) alloantigen system. *Proc Jap Acad* 1991; 67:102-6.

Wang R, Furihata K, McFarland JG, Friedman K, Aster RH, Newman PJ.

An amino acid polymorphism within the RGD binding domain of platelet membrane glycoprotein IIIa is responsible for the formation of Pen<sup>a</sup>/pen<sup>b</sup> alloantigen system. *J Clin Invest* 1992; 90:2038-2043.

Wang R, Mcfarland JG, Kekomäki R, Newman PJ.

Amino acid 489 is encoded by a mutational "hot spot" on the  $\beta_3$  integrin chain: the CA/TU human platelet alloantigen system. *Blood* 1993; 82:3386-3391.

Warkentin TE, Smith JW.

The alloimmune thrombocytopenic syndromes. *Transfus Med Rev.* 1997; 11:296-307.

Weisel JW, Nagaswami C, Vilaire G, Bennett JS. Examination of the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex and its interaction with fibrinogen and other ligands by electron microscopy. *J Biol Chem* 1992; 267:16637-43.

Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, Weiss JL, Gerstenblith G, Goldschmidt-Clermont PJ.

A polymorphism of a platelet glycoprotein IIIa as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med* 1996; 334:1090-1094.

Wencel-Drake JD, Plow EF, Kunicki TJ, Woods VL, Keller DM, Ginsberg MH.

Localization of internal pools of membrane glycoproteins involved in platelet adhesive responses. *Am J Pathol* 1986; 124:324-34.

Wicki AN, Walz A, Gerber-Huber SN, Wenger RN, Vornhagen R, Clemetson KJ.

Isolation and characterization of human blood platelet mRNA and construction of a cDNA library in gammagt11. Confirmation of the platelet derivation by identification of GPIb coding mRNA and cloning of a GPIb coding cDNA insert. *Thromb Haemost* 1989; 61:448-453.

Wilhide CC, Jin Y, Guo Q, Li L, Li SX, Rubin E, Bray PF.

The human integrin  $\beta_3$  gene is 63 kb and contains a 5'-UTR sequence regulating expression. *Blood* 1997; 90:3951-61.

Wippler J, Kouns W-C, Schlaeger E-J, Kuhn H, Hadvary P, Steiner B.

The integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , platelet glycoprotein IIb/IIIa can form a functionally active heterodimer complex without the cysteine-rich repeats of the  $\beta_3$  subunits. *J Biol Chem* 1994; 269:8754-8761.

Woods H.

Megakaryocyte development and function. Proceedings of an international conference. *Prog Clin Biol Res* 1986; 215:1-435.

Yuan W, Lucy MC.

Messenger ribonucleic acid expression for growth hormone receptor, luteinizing hormone receptor, and steroidogenic enzymes during the estrous cycle and pregnancy in porcine and bovine corpora lutea. *Domest Anim Endocrinol* 1996; 13:431-44.

Zimrin AB, Gidwitz S, Lord S, Schwartz E, Bennett JS, White GC 2nd, Poncz M.

The genomic organization of platelet glycoprotein IIIa. *J Biol Chem* 1990; 265:8590-5.

Zola H, McNamara PJ, Beckman IG, Brooks DA, Macardle PJ, Bradley J, Goodall K, Skinner J, Collins R, Berndt MC.

Monoclonal antibodies against antigens of the human platelet surface: preparation and properties. *Pathology* 1984; 16:73-78.

Zotz RB, Winkelmann BR, Nauck M, Giers G, Maruhn-Debowski B, Marz W, Scharf RE. Polymorphism of platelet membrane glycoprotein IIIa: human platelet antigen 1b (HPA-1b/Pl<sup>A2</sup>) is an inherited risk factor for premature myocardial infarction in coronary artery disease. *Thromb Haemost* 1998; 79:731-735.

Zutter MM, Fong AM, Krigman HR, Santoro SA. Differential regulation of the  $\alpha_2\beta_1$  and  $\alpha_{IIb}\beta_3$ -integrin genes during megakaryocytic differentiation of pluripotent K562 cells. *J Biol Chem* 1992; 267:20233-20238.

## 10. Anhang

### 10.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überblick über den Prozeß der Plättchenaktivierung und aggregation	6
Abbildung 2: Modell für den isolierten Plättchenglykoproteinkomplex IIb/IIIa	11
Abbildung 3: GPIIIa Allele die Aminosäuren, die sich bei den verschiedenen Allelen unterscheiden	13
Abbildung 4: Schematische Darstellung des GPIIb/IIIa-Komplexes	20
Abbildung 5: Beziehungen des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins zu anderen Komponenten	26
Abbildung 6: Biosynthese des GPIIb/IIIa-Komplexes	28
Abbildung 7: Schema der Transfektion der Zellen.	51
Abbildung 8: Transfektion der GPIIb- und allelspezifischen GPIIIa-Konstrukte	56
Abbildung 9: Analyse von untransfizierten CHO-Zellen, HPA-1a und HPA-1b Transfektanten mit dem mAk Gi5 in der Durchflußzytometrie	58
Abbildung 10: Analyse von HPA-1a und HPA-1b Transfektanten mit dem Gi5 nach der Klonierung in der Durchflußzytometrie	59
Abbildung 11: Analyse von HPA-1a Transfektanten mit nichtabsorbierten anti-HPA-1a, anti-HPA-1b, AB-Serum und dem mAk Gi14 in der Durchflußzytometrie	61
Abbildung 12: Analyse von HPA-1b Transfektanten mit nichtabsorbierten anti-HPA-1b und anti-HPA-1a, AB-Serum und dem mAk Gi14 in der Durchflußzytometrie	62
Abbildung 13: Reaktion von HPA-1a Transfektanten mit vorabsorbierten mit anti-HPA-1a, anti-HPA-1b, AB-Serum und dem mAk Gi14 in der Durchflußzytometrie	63
Abbildung 14: Reaktion von HPA-1b Transfektanten mit vorabsorbierten mit anti-HPA-1b, anti-HPA-1a, AB-Serum und dem mAk Gi14 in der Durchflußzytometrie	67



- Abbildung 15: Transfektion der GPIIb- und allelspezifischen GPIIIa-Konstrukte in CHO-Zellen, deren Expression und funktionelle Bedeutung 65
- Abbildung 16: Analyse von Oe<sup>a</sup> (+) und Oe<sup>a</sup> (-) Transfektanten nach der Klonierung mit dem monoklonalen Antikörper gegen GPIIb/IIIa (Gi5) in der Durchflußzytometrie 66
- Abbildung 17: Analyse von HPA-1a/Oe<sup>a</sup> (+) Transfektanten nach der Klonierung mit anti-HPA-1a/Oe<sup>a</sup> (-) und anti-HPA-1a/Oe<sup>a</sup> (+) in der Durchflußzytometrie 66
- Abbildung 18: Die Reaktion von CHO-Zellen, HPA-1a/Oe<sup>a</sup> (-) und HPA-1a/Oe<sup>a</sup> (+) Transfektanten mit anti-Oe<sup>a</sup> Serum 67
- Abbildung 19: Analyse von Pro33ΔLys611 (Oe<sup>a</sup>(+)) und Pro33Lys611 (Oe<sup>a</sup>(-)) Transfektanten nach der Aktivierung mit RGDW oder RGEW-Zugabe als negative Kontrolle 69
- Abbildung 20: Analyse von Pro33ΔLys611 (Oe<sup>a</sup>(+)) und Pro33Lys611 (Oe<sup>a</sup>(-)) Transfektanten nach der Aktivierung mit Dithiothreitol (DTT) 70
- Abbildung 21: Adhäsionsfähigkeit des GPIIb/IIIa Pro33 (Wildtyp, durchgezogene Linie) und Pro33ΔLys611 (Mutante; gestrichelte Linie) an Fibrinogen und an Gi5 (anti-GPIIb/IIIa) 71
- Abbildung 22: Tyrosinphosphorylierung von GPIIIa Isoformen. Stabile GPIIb/IIIa Pro33 Lys611 (1. Bahn) und GPIIb/IIIa Pro33ΔLys611 (2. Bahn) Transfektanten wurden an Fibrinogen adhären lassen, lysiert und mit Kaninchen-Antiserum gegen PP125<sup>FAK</sup> präzipitiert 72

## 10.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Plättchenspezifische Alloantigene	9
Tabelle 2: Vertreter der Integrine auf Thrombozyten und ihre bekannten Liganden	15
Tabelle 3: Allele der Plättchenmembranglykoproteine	32

## Danksagung

Herr Professor Dr. med. Gregor Bein danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin durchführen zu können.

Herr Professor Dr. M. Reinacher gilt mein Dank für die großzügig gewährte Freiheit bei der Ausgestaltung des Themas, die umsichtige Betreuung sowie die Vertretung im Fachbereich Veterinärmedizin.

Mein besonderer Dank gilt Herr Dr. Sentot Santoso, der mir das Thema überlassen hat, meine Freude an der Forschung erweckte und für seine wertvolle fachliche Unterstützung und die ausgezeichnete menschliche Betreuung.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre.

Ein besonderes Dankeschön gilt Frau Bettina Carl und Frau Silke Wert für die kompetente Einarbeitung in Arbeitstechniken und die zahlreichen Hilfestellungen bei der Organisation der Laborarbeit und der Durchführung der Versuche.

Meiner lieben Frau Rina danke ich für ihre unermüdliche Unterstützung und ihren aufbauenden Humor; ohne sie wäre die Arbeit nicht zur Vollendung gekommen.



