

In-vitro-Analyse der Anti-HPA-1-abhängigen Thrombozyten-
Phagozytose mit Hilfe eines neuen Vollblut-Phagozytose-Tests

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Ames, Paula

aus Berlin

Gießen 2024

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Institut für Klinische Immunologie, Transfusionsmedizin und Hämostaseologie

Gutachter: Prof. Dr. med. Gregor Bein

Gutachterin: Frau PD Dr. Neumann, Elena

Tag der Disputation: 04.11.2024

Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf dem direkten Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABKÜRZUNGSSVERZEICHNIS.....	IV
1. Einleitung.....	1
1.1. Thrombozytopenie und Blutungen bei Neugeborenen.....	1
1.2. Fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie.....	3
1.2.1. Pathophysiologie.....	3
1.2.2. Thrombozytäre Alloantigene.....	5
1.2.2.1. HPA-Antigene und -Antikörper.....	5
1.2.2.2. HLA-Antigene und -Antikörper.....	8
1.2.3. Mononukläres Phagozyten System (MPS).....	9
1.2.3.1. Phagozytose der antikörperbeladenen Thrombozyten.....	9
1.2.4. Klinische Präsentation der FNAIT.....	10
1.2.5. Diagnostik und Risikostratifizierung.....	11
1.2.6. Prophylaxe und Therapie der FNAIT.....	13
1.3. Fragestellung.....	17
2. Material und Methoden.....	18
2.1. Material.....	18
2.1.1. Geräte und Software.....	18
2.1.2. Verbrauchsmaterial.....	18
2.1.3. Chemikalien.....	18
2.1.4. Antikörper.....	21
2.1.4.1. Monoklonale Antikörper.....	20
2.1.4.2. Humane Seren.....	22
2.1.5. Kits.....	24
2.2. Methode.....	24
2.2.1. Probenmaterial.....	24
2.2.2. Plättchen-Phagozytose Assay im Vollblut (WHOPPA).....	24

2.2.3. Durchflusszytometrie.....	27
2.2.3.1. Analyse der Antikörperbindung an den Plättchen.....	28
2.2.3.2. Bestimmung der Monozytenzahl.....	28
2.2.3.3. Bestimmung der Phagozytoserate.....	28
2.2.3.4. Bindungstest.....	30
2.2.4. Säurebehandlung.....	31
2.2.5. Modifizierte Antikörper.....	31
2.2.5.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	32
2.2.5.1.1. Silberfärbung.....	32
2.2.5.1.2. <i>Westernblotting</i> mit LCA.....	32
2.3. Biostatistik.....	32
3. Ergebnisse.....	33
3.1. Der Anti-HPA-1a-Standard induziert eine allelspezifische und konzentrationsabhängige Phagozytose.....	33
3.2. Monozyten, nicht neutrophile Granulozyten, phagozytieren opsonierte Thrombozyten im Vollblut.....	35
3.3. Mütterliche Anti-HLA-Klasse I-Antikörper induzieren die Phagozytose von opsonierten Thrombozyten.....	37
3.4. Antikörper gegen $\alpha\beta 3$ induzieren keine Phagozytose von Thrombozyten.....	43
3.5. Typ-I und Typ-II-Antikörper induzieren Phagozytose von Thrombozyten.....	45
3.6. Modifizierte Antikörper induzieren keine Phagozytose von Thrombozyten.....	46
3.7. Funktionslose, modifizierte Antikörper können die Phagozytose der Thrombozyten durch native Anti-HPA-Antikörper hemmen.....	49
4. Diskussion.....	51
4.1. Weiterentwicklung und methodische Beurteilung des WHOPPAs.....	51
4.2. Der Einfluss von HLA-Antikörpern.....	53
4.3. Phagozytose-Induktion durch Anti-HPA-1a-Antikörper-Subtypen.....	55
4.4. Modifizierte Antikörper – ein therapeutischer Ansatz der FNAIT.....	56
4.5. Probleme und klinische Relevanz des WHOPPAs.....	60
5. Zusammenfassung.....	62
6. Summary.....	64
7. Veröffentlichungen und Preise, die aus dieser Arbeit hervorgegangen sind.....	65
8. Abbildungsverzeichnis.....	66
9. Tabellenverzeichnis.....	69

DANKSAGUNG	70
LEBENS LAUF	71
LITERATURVERZEICHNIS	72

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACD(A)	<i>Anticoagulant citrate Dextrose Solution A</i>
APC	<i>Allophycocyanin</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
Ctrl	<i>Control</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF-1	<i>Epidermal growth factor 1</i>
Endo S	Endoglykosidase S
FACS	<i>Fluorescence activated cell scanning</i>
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FNAIT	Fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie
GP	Glykoprotein
HBSS	<i>Hanks 'Balanced Salt Solution</i>
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HPA	Humane Plättchenantigen
ICH	Intrakranielle Hämorrhagie
Ig	Immunglobulin
IVIG	Intravenöses Immunglobulin
LCA	<i>Lens culinaris lectin</i>
MAIPA	<i>Monoclonal antibody immobilization of platelet antigens</i>

MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MPS	Mononukleäres Phagozyten System
PBS	Phosphat Buffered Saline
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PEP	PBS-EDTA-Prostaglandin-Puffer
PRP	Plättchen-reiches Plasma
PSI	<i>Plexin-Semaphorin-Integrin</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
WHOPPA	Plättchen Suspension - Phagozytose Assay
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
Tab.	Tabelle

1

Einleitung

1.1. Thrombozytopenie und Blutungen bei Neugeborenen

Mit einer Inzidenz von 1% ist die neonatale Thrombozytopenie eine eher seltene Erkrankung (Uhrynowska et al., 1997). Eine schwere neonatale Thrombozytopenie tritt mit einer Inzidenz von 0,15% auf (Kamphuis et al., 2014). Dennoch zählt die neonatale Thrombozytopenie zu den häufigsten hämatologischen Störungen des Neugeborenen auf den Kinderintensivstationen und kann mit schwerwiegenden Blutungen einhergehen. Definitionsgemäß spricht man ab Werten unter $150 \times 10^9/l$ von einer Thrombozytopenie. Als milde Thrombozytopenie bezeichnet man Thrombozytenwerte zwischen $100 - 149 \times 10^9/l$, eine schwere Thrombozytopenie liegt bei Werten unter $50 \times 10^9/l$ vor. Es gelten, je nach Reifegrad der Neugeborenen adaptierte Referenzwerte (Cremer et al., 2016; Dame, 2018). Eine der schwerwiegendsten klinischen Folgen der Thrombozytopenie ist die durch Beeinträchtigung der primären Hämostase verursachte Blutung. Diese kann sich von Petechien über Hämatome bis hin zu schweren Blutungen innerer Organe präsentieren (Kjeldsen-Kragh, 2020; Uhrynowska et al., 1997).

Thrombozyten werden im Knochenmark aus Megakaryozyten gebildet, deren Produktion und Reifung von Zytokinen und Chemokinen reguliert werden. Einmal aus dem Knochenmark in das periphere Blut übergetreten, überlebt ein Thrombozyt im Durchschnitt 7-10 Tage (Konkle, 2018). Eine Thrombozytopenie des Fetus/Neugeborenen kann verschiedene Ursachen haben. Ähnlich wie bei Erwachsenen können eine Bildungsstörung, ein vermehrter extravasaler Verlust oder intravasaler

Abbau sowie eine Umverteilung der Thrombozyten mögliche Ursachen der Thrombozytopenie sein (Cremer et al., 2016; Sola-Visner et al., 2008).

Neonatale Thrombozytopenien sind häufig durch eine hypoxische oder toxische Genese bedingt. Infektionen, Sepsis und/oder eine disseminierte intravasale Gerinnung können die Ursache sein. Bei länger bestehenden Thrombozytopenien sind auch angeborene Störungen, eine Knochenmarkinsuffizienz oder andere Differentialdiagnose zu berücksichtigen (Morrone, 2018). Eine Fehlverteilung der Thrombozyten mit resultierender Thrombozytopenie wird meistens durch eine vergrößerte Milz verursacht (Konkle, 2018). Der intravasale Abbau kann sowohl immunologisch als auch nicht immunologisch bedingt sein (Schmock & Perkins, 2014). Zu den immunologisch bedingten Ursachen des intravasalen Abbaus gehört die fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT). Sie stellt einer der häufigsten Ursachen einer isolierten Thrombozytopenie bei sonst gesunden Neugeborenen dar (Kamphuis et al., 2014).

Die FNAIT ist Gegenstand der Untersuchung der vorliegenden Doktorarbeit und wird in den folgenden Kapitelabschnitten näher erläutert. Die Untersuchung hat zum Ziel, einen neuen *in vitro* Phagozytose-Assay hinsichtlich seiner Eignung zur Diagnostik und Risikostratifizierung zu evaluieren.

1.2. Fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT)

Bei einer Alloimmunthrombozytopenie kommt es durch Kontakt mit fremden Thrombozytenantigenen zur Immunisierung mit resultierender Antikörperbildung. Die Alloantikörper reagieren mit verschiedenen Glykoprotein-Varianten (GP-Varianten) der Thrombozytenmembran (Sachs et al., 2012). Die fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT) ist eine Blutungsstörung des Fetus und des Neugeborenen. Sie ist der häufigste Grund für eine isoliert auftretende Thrombozytopenie bei sonst gesunden Feten oder Neugeborenen (Burrows RF, 1993). Laut einer Metaanalyse prospektiver Screening- und Interventionsstudien tritt die Immunisierung gegen HPA-1a mit einer Inzidenz von 1 in 500 Schwangeren auf, wobei 40 von 100.000 (1:2500) Neugeborene eine schwere Thrombozytopenie von $<50\text{G/l}$ durch eine FNAIT entwickelten (Kamphuis et al., 2014). Mit circa 75% werden bei Kaukasiern am häufigsten Antikörper gegen das Humane Plättchen Antigen 1a (HPA-1a) gebildet. Frauen mit dem Genotyp HPA-1b/1b tragen das Risiko Anti-HPA-1a Antikörper auszubilden und nachfolgend eine FNAIT zu entwickeln (Sachs et al., 2012). Bei etwa 10% der Kinder mit FNAIT tritt eine intrakranielle Blutungen (ICH) auf (Kamphuis et al., 2014).

1.2.1. Pathophysiologie

Die FNAIT wird durch Immunisierung der Mutter während der Schwangerschaft verursacht. Sie entsteht durch die Inkompatibilität der mütterlichen Thrombozytenantigene mit denen des Fetus. Nach der maternalen Exposition mit dem paternal vererbten Thrombozytenantigen des Fetus kann es zur mütterlichen Antikörperproduktion kommen (Sachs et al., 2014). Es werden verschiedene Hypothesen zur Immunisierung der Mutter während der Schwangerschaft diskutiert. Fetale Thrombozyten können bereits in der 16. Schwangerschaftswoche Glykoproteine aufweisen (Gruel et al., 1986). Der Übertritt fetaler Thrombozyten in die mütterliche Zirkulation könnte durch Traumata, Infektionen und Plazentaanomalien sowie peripartal auftreten. Die Möglichkeit einer Immunisierung über einen fetomaternalen Blutübertritt ist jedoch nicht belegt (Curtis, 2015).

Auch die Mikrovilli der Synzytiotrophoblasten der Plazenta exprimieren ab dem 1. Trimester das Integrin β_3 , welches HPA-1a und andere HPA-Antigene trägt (Kumpel et

al., 2008). Es wird daher eine Immunisierung über den direkten mütterlichen Blutkontakt zu den Synzythiotrophoblasten der fetalen Plazenta vermutet. Ferner wird diskutiert, ob Mikropartikel, ausgelöst durch Regenerationsprozesse der Plazenta, im Stande sind, in das mütterliche Blut zu gelangen und somit die Mutter pränatal zu immunisieren (Kumpel & Manoussaka, 2012). Diese Hypothese könnte eine Erklärung für das häufige Auftreten der FNAIT bereits in der ersten Schwangerschaft sein (Jin et al., 2019; Kumpel et al., 2008).

Die $\beta 3$ -Integrinkette, auf der das HPA-1a-Antigen liegt, bildet Heterodimere mit der αv - sowie der αIIb -Integrinkette. Abb. 1 zeigt die möglichen Wege der mütterlichen Immunisierung gegen das fetale HPA-1a-Antigen.

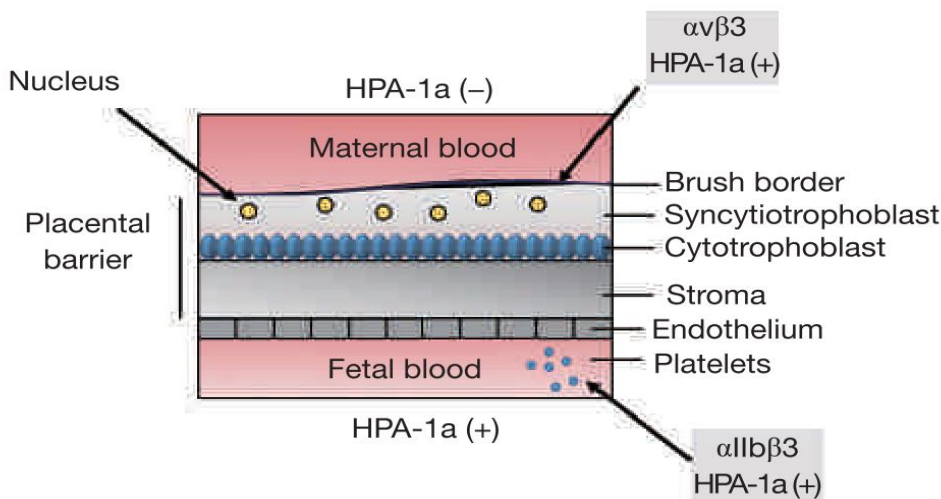


Abb. 1 Schematische Abbildung der Plazenta

Mögliche Alloimmunisierung der HPA-1a-negativen (-) Mutter durch das HPA-1a-Antigen (+) des Fetus über die Plazenta. Man erkennt die Expression des HPA-1a-Antigens auf dem $\alpha v \beta 3$ -Integrin der Synzytiotrophoblasten. Eine Immunisierung der HPA-1a-negativen (-) Mutter kann durch einen direkten Kontakt des mütterlichen Blutes mit dem Synzytiotrophoblasten oder durch Abgabe von Mikropartikeln der Trophoblasten in das mütterliche Blut sowie durch fetomaternalen Übertritt von Thrombozyten in die mütterliche Zirkulation geschehen. Verwendet mit Genehmigung, von (Xu, Fu et al., 2021); die Genehmigung wurde über das Copyright Clearance Center, Inc. erteilt.

Sobald die thrombozytären Antikörper der Mutter der Immunglobulinklasse IgG gebildet sind, können diese über den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) auf Synzythiotrophoblasten in den kindlichen Kreislauf gelangen (Leach et al., 1996; Simister et al., 1996).

Nach Übertritt der Antikörper in den kindlichen Kreislauf kann die Bindung an die kindlichen Thrombozyten zu einer Phagozytose der opsonierten Thrombozyten und somit zu einer Thrombozytopenie führen. Dies kann ein erhöhtes fetales und neonatales

Blutungsrisiko zur Folge haben (Sachs et al., 2012; Vos et al., 2020). Neben der Induktion des Thrombozytenabbaus, können die gebildeten Antikörper auch durch Unterdrückung der Megakaryopoese die Thrombozytopenie verstärken (Liu, Z, Bussel, JB et al., 2015).

Abgesehen von dem Abbau der Thrombozyten, könnten die gebildeten Antikörper auch einen Einfluss auf die fetalen Endothelzellen haben. So kann die Bildung eines speziellen Antikörpersubtyps gegen $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ auf Endothelzellen die kindliche Angiogenese hemmen (Santoso et al., 2016). Antikörper dieses Subtyps sind mit intrakraniellen Blutungen (ICH) assoziiert.

1.2.2. Thrombozytäre Alloantigene

Thrombozyten exprimieren eine Vielzahl von Alloantigenen auf ihrer Membranoberfläche. Neben den auch auf Erythrozyten und Leukozyten exprimierten ABO-Blutgruppen und humanen Leukozyten Antigenen (HLA) tragen Thrombozyten die für die FNAIT bedeutenden und plättchenspezifischen humanen Plättchenantigene (HPA) (Curtis & McFarland, 2013).

1.2.2.1. HPA-Antigene und -Antikörper

Die Ursache der FNAIT ist eine Alloimmunisierung der Mutter gegen plättchenspezifische Antigene (HPA). Die Epitope der Antigene befinden sich auf Glykoproteinen der Thrombozytenmembran. Bisher sind 36 unterschiedliche HPA-Antigene, die auf vier Glykoprotein-Komplexen in Erscheinung treten, beschrieben: GPIIb/IIIa ($\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$), GPIb-V-IX (CD42a-d), GPIa/IIa ($\alpha\text{2}\beta\text{1}$) und CD109. Benannt wurden die HPA-Antigene nach ihrer Entdeckungsreihenfolge (Versiti, 2020; von dem Borne & Décary, 1990). HPA-1 ist neben HPA-2, -3, -4, -5 und -15 eines der sechs biallelischen Antigenensysteme. Hochfrequente HPA-Antigene werden mit dem Buchstaben a, seltenere Antigene mit b bezeichnet (Metcalf et al., 2003; Versiti, 2020). Die Allelfrequenzen der HPA-Antigene zeigen große Unterschiede in verschiedenen ethnischen Populationen. In der europäischen Bevölkerung ist HPA-1a das wichtigste Antigen. Antikörper gegen HPA-1a sind für etwa 80% der FNAIT Fälle verantwortlich. In asiatischen Populationen treten dagegen Anti-HPA-1a-Antikörper sehr selten auf, da

der Genotyp HPA-1bb sehr selten vorkommt (Ghevaert, Campbell, Stafford et al., 2007; Mueller-Eckhardt et al., 1989; Sachs et al., 2014).

System	Antigen	Synonym	Glykoprotein	Aminosäure-austausch	Genhäufigkeit bei Kaukasiern
HPA-1	HPA-1a	Zw ^a , PI ^{A1}	GPIIIa	Leucin33	0,877
	HPA-1b	Zw ^b , PI ^{A2}		Prolin33	0,113
HPA-2	HPA-2a	Ko ^b	GPIb α	Threonin145	0,943
	HPA-2b	Ko ^a , Sib ^a		Methionin145	0,057
HPA-3	HPA-3a	Bak ^a , Lek ^a	GPIIb	Isoleucin843	0,471
	HPA-3b	Bak ^b		Serin843	0,529
HPA-4	HPA-4a	Yuk ^b , Pen ^a	GPIIIa	Arginin143	1,000
	HPA-4b	Yuk ^a , Pen ^b		Glutamin143	0,000
HPA-5	HPA-5a	Br ^b , Zav ^b	GPIa	Glutaminsäure505	0,929
	HPA-5b	Br ^a , Zav ^a		Lysin505	0,071

Tabelle 1 Klassifikation ausgewählter HPA-Antigene (<https://www.versiti.org/products-services/human-platelet-antigen-hpa-database>)

Das HPA-1-System ist durch eine Punktmutation mit konsekutivem Aminosäureaustausch von Leucin zu Prolin an Position 33 der PSI-Domäne der β 3-Untereinheit charakterisiert. Das HPA-1a-Allel (Leucin33) wird zu einem HPA-1b-Allel (Prolin33, biallelischer Polymorphismus) (Newman et al., 1989; Zhou et al., 2018). Einer Metaanalyse zufolge wiesen 2,1 % der europäischen Schwangeren den Genotyp HPA-1b/1b auf, 9,7% ebendieser Schwangeren entwickelten Anti-HPA-1a Antikörper (Kamphuis et al., 2010).

HPA-1a und eine Vielzahl weiterer HPAs werden auf dem α IIB β 3 Integrin (CD41/CD61) auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert. Auf einem Thrombozyten werden etwa 80.000 α IIB β 3-Moleküle detektiert (Wagner et al., 1996). Der α IIB β 3-Komplex fungiert als Rezeptor für Fibrinogen, welcher zur Thrombozytenaggregation erforderlich ist (Bennett, 2005). Während nur wenige hundert α v β 3 Komplexe auf Thrombozyten vorkommen (Coller et al., 1991), exprimieren Endothelzellen mit etwa 50.000 Kopien pro Zelle deutlich mehr α v β 3 Komplexe auf ihrer Oberfläche (Wihadmadyatami et al., 2016; Xu, Chen et al., 2021).

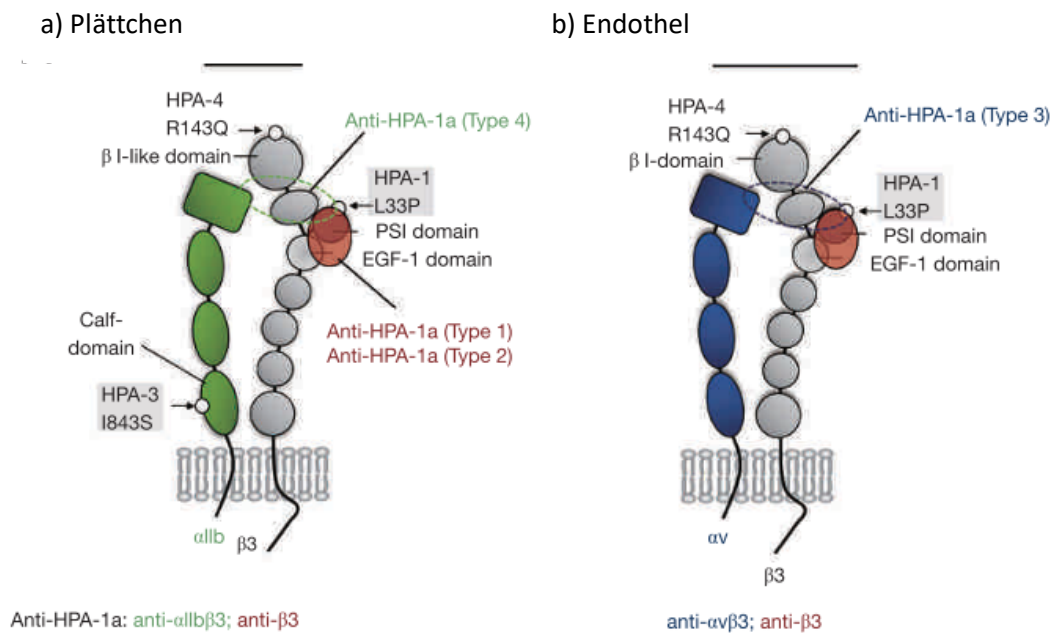


Abb. 2 Schematische Darstellung der HPA-tragenden Integrine und der unterschiedlichen Antikörper

a.) Dargestellt ist das $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Integrin auf Plättchen, das u.a. HPA-1,-3 und -4 trägt. Die jeweiligen Aminosäureaustausche für die HPA-Antigene sind angegeben. b) Dargestellt ist das $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrin auf Endothelzellen, das HPA-1 und -4 trägt. Die jeweiligen Aminosäureaustausche für die HPA-Antigene sind angegeben. Auf beiden Abbildungen sind die unterschiedlichen Antikörpertypen, die bei einer Immunisierung entstehen können, illustriert. Verwendet mit Genehmigung von (Xu, Fu et al., 2021); die Genehmigung wurde über das Copyright Clearance Center, Inc. erteilt.

Aktuelle Studien zeigen, dass es nach Immunisierung der Mutter zur Ausbildung mehrerer Subtypen von Anti-HPA-1a-Antikörper kommen kann. Diese richten sich gegen unterschiedliche Epitope. Der Typ-I-Antikörper reagiert mit der PSI-Domäne der β3 -Untereinheit. Wohingegen der Typ-II-Antikörper gleichzeitig an der PSI- und der epidermalen Wachstumsfaktor-1(EGF-1)-Domäne bindet. Typ-II-Antikörper reagieren somit im Komplex mit der PSI- und EGF-1-Domäne (Holzwarth et al., 2020; Zhi et al., 2018).

Ferner kann es zur Bildung von anti-HPA-1a Antikörpern gegen das Integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ kommen. Dieser Integri-
 komplex-spezifische Antikörper wurde als Typ-III Antikörper bezeichnet (Santoso et al., 2016). Anti-HPA-1a-Antikörper gegen den $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Komplex wurde gehäuft bei Fällen mit FNAIT gefunden, bei denen es zur Ausbildung einer ICH kam. Es wird deshalb ein Zusammenhang des Auftretens von $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Antikörper mit der Blutungskomplikation vermutet. Anti-HPA-1a Antikörper gegen $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ sind in der Lage,

an Endothelzellen zu binden (Kroll et al., 2005; Santoso et al., 2016). Durch eine Integrin $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -vermittelte Adhäsion der Endothelzelle an die extrazelluläre Matrix wird der Angiogenese-Prozess unterstützt. Antikörper gegen $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ auf Endothelzellen können eine endotheliale Apoptose während der Angiogenese induzieren und damit die vaskuläre Integrität beeinträchtigen (Dardik & Salomon, 2021; Erdreich-Epstein et al., 2005). Die aktuellen Daten deuten darauf hin, dass die Beeinträchtigung der Angiogenese eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung einer ICH bei FNAIT spielt, weniger die Thrombozytopenie allein. Ein additiver Effekt ist jedoch plausibel, da eine fetale/neonatale ICH im Rahmen einer FNAIT fast immer mit sehr niedrigen Thrombozytenzahlen ($< 30 \times 10^9/l$) assoziiert ist (Santoso et al., 2016; Xu, Fu et al., 2021; Yougbaré et al., 2015).

1.2.2.2. HLA-Antigene und -Antikörper

Es gibt einzelne Fallberichte, die von einer Assoziation zwischen mütterlichen Antikörpern gegen HLA-Klasse I-Antigene mit FNAIT berichten (Taaning, 2000). Neben den humanen Plättchenantigenen exprimieren Thrombozyten auch humane Leukozyten Antigene. Es werden jedoch nur HLA-Antigene der Klasse I, nicht der Klasse II auf Thrombozyten exprimiert (Curtis & McFarland, 2013). Die Thrombozyten stellen mit etwa 20.000 HLA-Molekülen pro Zelle die größte Anzahl an HLA-Antigenen im Blut dar (Pereira et al., 1988). HLA-Antigene zeigen eine hohe Antigenvariabilität zwischen unterschiedlichen Individuen (Kao et al., 1990). Während der Schwangerschaft kommt es bei 20-46% der schwangeren Frauen zu einer Immunantwort mit Entwicklung von Anti-HLA-Antikörpern (Masson et al., 2013). Die Rolle der Anti-HLA-I-Antikörper in der Pathogenese der FNAIT ist umstritten. Der aktuellen Studienlage nach besteht kein additiver Effekt auf die Schwere der FNAIT durch das zusätzliche Vorhandensein von HLA-Antikörpern (Sachs et al., 2020).

1.2.3. Mononukleäres Phagozyten System (MPS)

Das mononukleäre Phagozyten System (MPS) umfasst eine Vielzahl von Körperzellen, die alle zur Phagozytose und Speicherung von Partikeln befähigt sind. Sie werden im Knochenmark gebildet und als unreife Monozyten ins periphere Blut freigesetzt. Nach einer durchschnittlichen Transitzeit im Kreislauf von 25 Stunden extravasieren sie ins Gewebe, wo sie sich zu residenten Makrophagen differenzieren. Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, Monozyten aus dem peripheren Blut und Makrophagen bilden gemeinsam ein funktionell heterogenes System aus Zellen und stellen einen essenziellen Teil des angeborenen Immunsystems dar (Burke & Lewis, 2002).

1.2.3.1. Phagozytose der antikörperbeladenen Thrombozyten

Der Abbau der antikörperbeladenen Plättchen kann auf verschiedene Weise ausgelöst werden. Zellen besitzen eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen, um Partikel zu internalisieren. Die Aufnahme von Partikeln kann über Pinozytose, rezeptor-vermittelte Endozytose und Phagozytose erfolgen (Aderem & Underhill, 1999). Der Großteil des Plättchenabbaus wird über die Fc-Rezeptor-vermittelte Phagozytose induziert (Norris et al., 2021). Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die Antikörperproduktion als auch der Thrombozytenabbau zu einem großen Anteil in der Milz stattfinden (Kuwana et al., 2002). Trotz der vorherrschenden Meinung, dass der Abbau der Anti-HPA-1a-opsonierten Thrombozyten größtenteils durch die Fc γ -Rezeptoren der Milzmakrophagen stattfindet (McMillan et al., 1974), zeigen sich vermehrt Hinweise, dass auch periphere mononukleäre Zellen eine wichtige Rolle in der antikörpervermittelten Thrombozyteneliminierung spielen (Kuwana et al., 2009; Norris et al., 2021; Wiener et al., 2003). IgG-opsonierte Thrombozyten werden sowohl von den Fc- als auch ggf. von den Komplementrezeptoren des Monozyten-Makrophagen-Systems erkannt und daraufhin phagozytiert (Grozovsky et al., 2010). Die Fc γ -Rezeptor-vermittelte Phagozytose der Makrophagen erfolgt überwiegend über FcRI- und FcRIII-Rezeptoren (Norris et al., 2021).

1.2.4. Klinische Präsentation der FNAIT

Die Klinik der FNAIT kann sich sehr variabel gestalten. Sie reicht von asymptomatischen Fällen bis hin zu schweren Verläufen mit Blutungen innerer Organe und Kindstod. Die am häufigsten auftretenden Symptome des Kindes sind Petechien (90%), Hämatome (66%), Teerstuhl (30%), Hämoptysen (8%) sowie retinale Blutungen (7%) und Hämaturie (3%) (Mueller-Eckhardt et al., 1989).



Abb. 3 Mögliche klinische Präsentation einer FNAIT

Abbildung von generalisierten Blutergüssen, Suffusionsblutungen und Petechien bei einem Neugeborenen. Nachdruck aus (Silva et al., 2011) mit Genehmigung der BMJ Publishing Group Ltd.

Die intrakranielle Blutung (ICH) ist nach den kutanen und mukokutanen Blutungen eine der häufigsten Blutungskomplikationen (Sachs et al., 2021). Die intrauterine oder postnatale ICH stellt, angesichts der damit verbundenen Mortalität sowie dem Risiko lebenslanger Behinderung, eine der gefürchtetsten Komplikationen dar (Bonacossa & Jocelyn, 1996; Vos et al., 2023). Die Wahrscheinlichkeit einer ICH als Folge der Bildung von HPA-1a-Antikörper beträgt etwa 10 bis 20% (Kamphuis et al., 2010; Mueller-Eckhardt et al., 1989).

Studien zufolge treten intrakranielle Blutungen in über 80% der Fälle bereits vor der Geburt des Kindes auf. Zwei Drittel der Blutungen treten am Ende des zweiten Trimesters auf und zeigen darüber hinaus häufig ein schlechtes klinisches Outcome (Bussel et al., 1997; Tiller et al., 2013). Die perinatale Sterblichkeit bei FNAIT-Patienten mit ICH liegt bei 30-50% (Tiller et al., 2013; Winkelhorst et al., 2019). Laut einer Metaanalyse kommt es bei 60% der Kinder mit ICH zu schweren neurologischen Schädigungen (Winkelhorst et al., 2019). Um die schwerwiegenden Komplikationen einer ICH durch frühzeitige Prophylaxe verhindern zu können, müssten Risikoschwangerschaften rechtzeitig identifiziert werden (Sachs et al., 2012; Tiller et al., 2013).

1.2.5. Diagnostik und Risikostratifizierung

In Anbetracht eines fehlenden pränatalen Screenings wird eine FNAIT meist unerwartet, unter der Geburt oder kurz nach der Entbindung diagnostiziert. Der Verdacht auf eine FNAIT manifestiert sich durch klinische und labortechnische Befunde, wobei der Säugling meist eine isolierte Thrombozytopenie und/oder Blutungssymptome aufweist. Bei einem betroffenen Kind mit Blutungsstigmata, asymptomatischer Thrombozytopenie oder bei einem vorher erkrankten Geschwisterkind sollte umgehend eine serologische und molekulare Diagnostik eingeleitet werden (Sachs et al., 2012; Sola-Visner et al., 2008; Winkelhorst et al., 2017).

Die serologische Untersuchung ermöglicht den Nachweis thrombozytenspezifischer Antikörper im mütterlichen Serum. In der Regel wird hierfür der monoklonale antikörperspezifische Immobilisationstest für plättchenspezifische Antigene (MAIPA) eingesetzt (Campbell et al., 2007; Kiefel et al., 1987). Eine serologische Verträglichkeitsprobe (*Crossmatch*) zwischen dem Serum der Mutter und den Thrombozyten des Vaters (oder des Kindes) kann die Diagnostik ergänzen. Dies hilft insbesondere für die Aufklärung einer fetomaternalen Unverträglichkeit durch seltene Antigensysteme (Kroll et al., 2005). Weiterhin gehört eine molekulare Diagnostik der HPA-Antigene der Mutter, des Vaters und des Kindes zur standardmäßigen Diagnostik einer FNAIT. Mögliche Inkompatibilitäten können durch die HPA-Genotypisierung festgestellt werden (Winkelhorst et al., 2017).

FNAIT ist eine unterdiagnostizierte Erkrankung. So bleiben viele Fälle ohne Screeninguntersuchung unentdeckt (Davoren et al., 2002). Laut einer Szenarioanalyse von de Vos et al. könnte ein antenatales Screening auf Anti-HPA-1a Antikörper in den Niederlanden auf lange Sicht kosteneffizient sein. Ein pränatales Screening könnte ein rechtzeitiges, prophylaktisches Eingreifen ermöglichen und das Auftreten von schweren Komplikationen, wie die ICH verhindern (Vos et al., 2022). Zur nicht-invasiven Risikostratifizierung des Schweregrades einer Thrombozytopenie und/oder einer Blutung werden mehrere Faktoren diskutiert (Sachs, 2020). Eine invasive Risikostratifizierung durch Nabelschnurpunktion ist wegen der damit verbundenen Risiken, insbesondere einer Blutung bei fetaler Thrombozytopenie und dem Risiko einer Boosterung des mütterlichen Antikörpers, verlassen worden (Sachs et al., 2021). Der Antikörpertiter wird in vielen Zentren zur Risikostratifizierung verwendet. Eine systematische Untersuchung zeigt,

dass hohe Antikörpertiter mit einem schweren Verlauf assoziiert sind (Kjaer et al., 2019). Die Autorin zeigt jedoch auch, dass aufgrund der geringen positiven Vorhersagewerte der untersuchten Studien der Antikörpertiter kein ausreichender Parameter ist, um eine „schwere FNAIT“ sicher vorherzusagen oder die pränatale Behandlung zu steuern (Ghevaert, Campbell, Stafford et al., 2007; Kjaer et al., 2019). Überdies existieren ferner Berichte von Fällen mit schweren Blutungen, bei denen im mütterlichen Blut kaum Antikörperspiegel nachweisbar waren (Bessos et al., 2005).

Die fetale Thrombozytenzahl scheint ein bedeutender Faktor zur Risikostratifizierung zu sein (Ghevaert, Campbell, Walton et al., 2007). Es sind allerdings Fälle mit ICH beschrieben, bei denen die Thrombozytenzahl im Referenzbereich oder nur gering erniedrigt waren (Bussel et al., 2010; Kamphuis et al., 2014; Vos et al., 2020). Darüber hinaus entwickelt nicht jedes Neugeborene mit niedrigen Thrombozytenwerten eine intrakranielle Blutung (Sachs et al., 2012). Dies lässt den Zusammenhang zwischen der niedrigen Thrombozytenzahl und dem Auftreten von ICH schwach erscheinen (Sachs, 2020).

Santoso et al. konnten 2016 eine Korrelation zwischen der Interaktion der gebildeten Antikörper mit den Endothelzellen und dem Auftreten einer ICH zeigen. Die Bestimmung der Zusammensetzung der Anti-HPA-1a-Antikörper-Subtypen der Mutter könnte daher einen möglichen prädiktiven Faktor darstellen (Santoso et al., 2016).

Als ein weiterer prädiktiver Marker mit Assoziation zum Blutungsrisiko wird das Glykosylierungsmuster des Fc-Teils von Alloantikörpern diskutiert. Das Fehlen eines Fucoserestes auf dem Fc-Teil des Antikörpers beeinflusst die Affinität und die Bindung der Antikörper an die IgG-Fc-Rezeptoren der Phagozyten (Kapur et al., 2014; Sonneveld et al., 2016).

Weiterhin wird der HLA DRB3*01:01 Status der Schwangeren als potenzieller Risikofaktor diskutiert (Kjeldsen-Kragh & Ahlen, 2020). Interessanterweise entwickelte nicht jede HPA-1a-negative Schwangere bei Inkompatibilität des HPA-1a-Antigens des Kindes Antikörper gegen dessen Antigen. Dies deutet darauf hin, dass der immunologische Hintergrund der Mutter eine mögliche Rolle bei der Entwicklung einer FNAIT spielt (Kjeldsen-Kragh et al., 2007). Zwischen dem genannten Genotyp und dem Risiko der Entwicklung von Alloantikörpern bei HPA-1a inkompatiblen Schwangerschaften besteht eine positive Korrelation (Kjeldsen-Kragh & Ahlen, 2020). Die Bestimmung des HPA-1a-Phänotyps scheint jedoch weniger mit dem Schweregrad

der FNAIT, als mit dem Risiko der Entwicklung einer FNAIT assoziiert zu sein (Wienzek-Lischka et al., 2017).

Bis heute ist kein zuverlässiges, nicht-invasives diagnostisches Mittel verfügbar, welches die Risikostratifizierung einer FNAIT und ihrer schwerwiegenden Komplikationen sicher zulässt (Sachs, 2020).

Der bisher zuverlässigste, nicht-invasive Prädiktor für den Schweregrad einer FNAIT und der damit verbundenen ICH ist das Vorhandensein einer *in utero* ICH bei einem Geschwisterkind. Bei dem Auftreten einer ICH bei vorangegangenen Geschwisterkindern besteht ein Risiko von 69-85 % bei nachfolgenden Schwangerschaften erneut eine pränatale ICH zu entwickeln (Bussel et al., 2010; Radder et al., 2003). Darüber hinaus zeigten in einer norwegische Studie 71% der Kinder von Folgeschwangerschaften, bei ausgeprägter Thrombozytopenie in der ersten Schwangerschaft, ebenfalls eine schwere Thrombozytopenie (Tiller et al., 2016).

1.2.6. Prophylaxe und Therapie der FNAIT

Das prophylaktische oder therapeutische Vorgehen ist abhängig vom Zeitpunkt des Verdachts der FNAIT und wird in ein pränatales und ein postnatales Management eingeteilt. Sowohl pränatal als auch postnatal hat die Prophylaxe zum Ziel, das Risiko von schweren Blutungen und einer ICH zu reduzieren (Vos et al., 2020). Die momentan wichtigsten Ansätze der Blutungsprophylaxe umfassen die Gabe von Thrombozytentransfusionen, sowie die mütterliche Verabreichung von intravenösem Immunglobulin (IVIg) (Liebermann et al., 2019; Vos et al., 2020). Invasive Verfahren wie die Ultraschall-gestützte fetale Blutprobe (FBS- *fetal blood sample*) mit anschließender intrauteriner Plättchentransfusion (IUPT) von HPA-kompatiblen Thrombozyten rückten aufgrund der Invasivität und der damit verbundenen Risiken immer mehr in den Hintergrund. Sie sind der Behandlung der betroffenen Feten vorbehalten, welche auf eine nicht-invasive Behandlung nicht ansprechen (Overton et al., 2002; Winkelhorst et al., 2017).

Da die FNAIT aufgrund der fehlenden Screeningprogramme meistens erst perinatal, durch niedrige Thrombozytenzahl des Neugeborenen oder Blutungen, entdeckt wird, zielt die Behandlung hier meist auf die möglichst schnelle Steigerung der Thrombozytenzahl

mit Hilfe von Thrombozytenkonzentraten ab (Baker et al., 2019; Liebermann et al., 2019; te Pas et al., 2007). Ab Thrombozytenwerten unter $30 \times 10^9/l$ ohne Blutungszeichen und bei akuten Blutungszeichen werden dem Neugeborenen Thrombozytenkonzentrate, wenn möglich HPA-kompatibel, verabreicht (Liebermann et al., 2019; Querschnitts-Leitlinie zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten).

Da gegenwärtig kein adäquater Marker zur Vorhersage der Auftretenswahrscheinlichkeit von schweren Blutungen existiert (Sachs, 2020), wird bei Schwangeren mit vorangegangener FNAIT mit bekannten thrombozytenspezifischen Alloantikörpern und/oder einem antigenpositiven Fetus eine prophylaktische Schwangerschaftsbehandlung eingeleitet. Die präventive, antenatale Therapie stützt sich auf die wöchentliche Gabe von IVIG. Die aktuelle Leitlinie empfiehlt die mütterliche Gabe von 1g/kg Körpergewicht pro Woche bis zur Entbindung. Bei Hochrisikoschwangerschaften soll die Behandlung zwischen der 12. und 16. Schwangerschaftswoche, bei Niedrigrisikoschwangerschaften zwischen der 20. und 22. Schwangerschaftswoche begonnen werden (Liebermann et al., 2019).

IVIG ist ein kostenintensives, humanes Blutprodukt (European Commission Research and Innovation DG. Final Report Summary - PROFNAIT, 2022). Die genaue Wirkweise des IVIGs im Rahmen einer FNAIT ist, trotz vieler Hypothesen, bis heute unklar (Wabnitz et al., 2020). Ferner sind dosisabhängig unerwünschte Arzneimittelwirkungen der Mutter, darunter grippeähnliche Symptome und Herzkreislaufstörungen wie Hypotonien oder Arrhythmien, beschrieben (Daniel et al., 2012; Guo et al., 2018; Rossi et al., 2016; Wienzek-Lischka et al., 2020). Hervorzuheben ist, dass die aktuellen Empfehlungen nicht auf placebokontrollierten, doppelverblindeten klinischen Studien, sondern auf Expertenmeinungen und kleinen Fallserien beruhen. Die Anwendung von IVIG bei FNAIT geschieht trotzdem häufig als „*off-label-use*“ (Kjeldsen-Kragh, 2020). Vor dem Hintergrund der unzulänglichen Risikostratifizierung wird IVIG heute vermutlich zu häufig eingesetzt. Die fetale Blutungsprophylaxe mit IVIG ist wahrscheinlich nur bei Hochrisikopatientinnen von Nutzen (Kjeldsen-Kragh et al., 2023).

Die Nachteile der IVIG-Prophylaxe führten zur Suche nach alternativen Therapiemöglichkeiten. Einer der neuen therapeutischen Ansätze befasst sich mit der Verwendung von Alloantikörpern mit fehlender Effektorfunktion. Die IgG-Moleküle

tragen in der schweren Kette der konstanten CH₂-Domäne der Fc-Region eine N-Glykosylierung an der Position 297 (Asn-297) (siehe **Abb. 4**) (Boune et al., 2020).

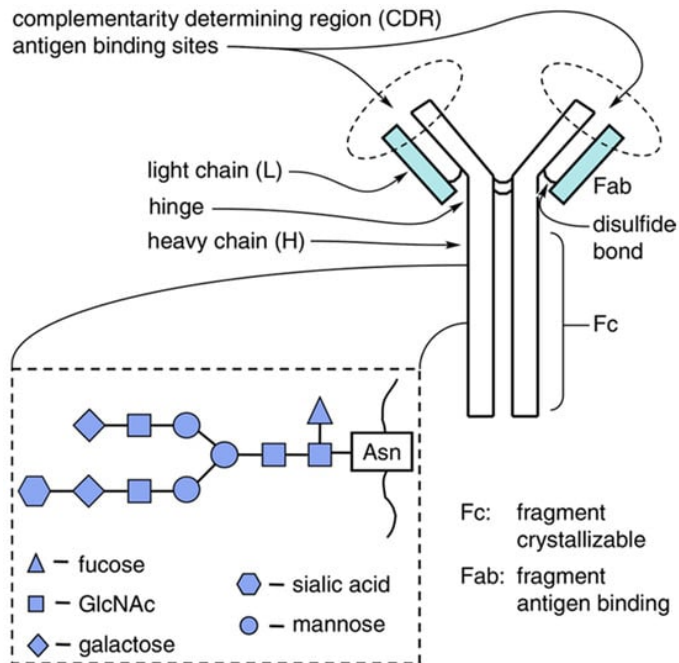


Abb. 4 Schematische Darstellung der Struktur eines nativen Immunglobulins (IgGs)

Dargestellt ist die vereinfachte Struktur eines nativen Immunglobulins (IgG). Abgebildet ist eine Glykankette, die am Asparaginrest der schweren Kette des Fc-Teils gebunden ist. Nachgedruckt aus (Bakhtiar, 2012) mit Genehmigung der American Chemical Society.

Die Modifizierung der Antikörper durch Abspaltung der N-gebundenen Glykane führt zu einer Änderung des Fc-Teils (Feige et al., 2009). Die modifizierten Antikörper sind hierdurch nicht mehr in der Lage, mit dem fetalen Fc γ -Rezeptor auf Makrophagen zu interagieren. Die Effektorfunktion - eine Fc-vermittelte Phagozytose zu induzieren - ist damit erloschen (Feige et al., 2009; Nimmerjahn & Ravetch, 2008). Ghevaert et al. entwickelten einen humanen, rekombinanten Anti-HPA-1a-Antikörper (B2G1 delta nab). Dieser Antikörper trägt eine modifizierte konstante Region, die nicht an die Fc γ -Rezeptoren binden kann (Ghevaert et al., 2013). Ebenfalls kann durch eine Deglykosylierung von Anti-HPA-Antikörpern die Effektorfunktion verändert werden. Durch die unveränderte Fähigkeit der deglykosylierten Antikörper, die Plazenta über den Fc μ -Rezeptor zu passieren, ist es möglich, das Therapeutikum direkt der Mutter zu injizieren (Bakchoul et al., 2013; Nimmerjahn & Ravetch, 2008). Die Antikörper ohne Effektorfunktion könnten die pathogenen mütterlichen Antikörper blockieren. Das

skizzierte Prinzip einer fetalen Blutungsprophylaxe befindet sich noch im Stadium der präklinischen Forschung.

FNAIT wird am häufigsten durch die Bildung maternaler Anti-HPA-1a Alloantikörper verursacht. Die reaktiven Anti-HPA-1a Antikörper binden nach plazentarem Transport in die fetale Zirkulation an die kindlichen Plättchen, welche über das Monozyten-Makrophagen-System über Fc γ R-vermittelte Phagozytose eliminiert werden. Die konsekutive Thrombozytopenie kann schwerwiegende fetale Blutungskomplikationen hervorrufen. Die Bestimmung der Anti-HPA-1a Antikörper im mütterlichen Serum sowie der HPA-1a-Antigene auf väterlichen Thrombozyten dient der Diagnosestellung einer FNAIT. Die Höhe der Anti-HPA-1a-Konzentration lässt jedoch keinen zuverlässigen Rückschluss auf den Schweregrad der FNAIT und das Auftreten schwerwiegender Blutungen zu. Bis heute gibt es keinen verlässlichen diagnostischen Parameter mit dem der Schweregrad der FNAIT sicher vorausgesagt werden kann. Daher gibt es bis heute kein Screeningprogramm für FNAIT im Rahmen der Mutterschaftsvorsorge. Aktuelle Leitlinien empfehlen für das Management einer Folgeschwangerschaft mit FNAIT in der Vorgeschichte eine Blutungsprophylaxe mit IVIG. Der Einsatz von IVIG ist vermutlich nur für einen kleinen Prozentsatz der immunisierten Schwangeren von Nutzen; eine verlässliche Risikostratifizierung könnte Überbehandlung vermeiden.

1.3. Fragestellung

Die fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT) wird durch mütterliche Antikörper gegen fetale humane Plättchen-Antigene (HPA), am häufigsten Anti-HPA-1a-Antikörper, hervorgerufen. Nach Transport der mütterlichen Antikörper in die fetale Zirkulation binden die Alloantikörper an fetale Thrombozyten, die anschließend von Phagozyten eliminiert werden. Schwere Verlaufsformen führen zu einer ausgeprägten Thrombozytopenie mit fetaler intrakranieller Blutung. Bis heute ist die Bestimmung des fetalen Blutungsrisikos bei Vorliegen mütterlicher Anti-HPA-1a-Antikörper nicht möglich. Im Rahmen dieser Arbeit soll ein *in vitro* Phagozytose-Assay von Anti-HPA-1a-opsonierten Thrombozyten im Vollblut (WHOPPA- *whole blood platelet phagocytosis assay*) entwickelt werden. Dieser funktionelle Assay soll den Abbau von opsonierten Thrombozyten *ex vivo* nachstellen. Die Quantifizierung der Thrombozytenphagozytose *ex vivo* könnte den Schweregrad der fetalen Thrombozytopenie vorhersagen und der Therapiesteuerung dienen. Ferner soll diese Methode helfen, die Mechanismen des Thrombozytenabbaus bei der FNAIT besser zu verstehen und mögliche Inhibitoren zu testen.

Ein möglicher und viel diskutierter Ansatz zur fetalen Blutungsprophylaxe ist die Verwendung allospezifischer Antikörper, deren Fc-Teil nicht mehr an die Rezeptoren von Makrophagen binden und somit keine Phagozytose der antikörperbeladenen Thrombozyten auslösen können. Mit dem zu etablierenden Assay soll daher außerdem die Fähigkeit von modifizierten Antikörpern gegen HPA-1a, als kompetitive Inhibitoren die *in vitro* Phagozytose von antikörperbeladenen Thrombozyten zu hemmen, untersucht werden.

2

Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte und Software

Gerät	Typ/Modell	Hersteller/Lieferant
Automatischer Hämatologie Analysator	Sysmex KX21N	Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, D
Elektrophoresesystem	Consort E833 Elektrophoresis Power Supply	Consort, Turnhout, BEL
Blotgerät	Fastblot B34	Biometra, Göttingen, D
Durchflusszytometer	BD FACS Canto II	BD Biosciences, USA
Vortexer	RS-VA15	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, D
Zentrifugen	Rotina 380 Heraeus Pico 17	Hettich, Tuttlingen, D Thermo Scientific, Osterode, D
Proteinbestimmung	Nanodrop ^R ND 1000 Spektralphotometer	Nanodrop Technologies, Wilmington, USA
Dokumentationssystem	Alpha Innotech FluorChem FC2	Biozym scientific, Oldendorf, D

Tabelle 2 Geräte

Software	Hersteller
FACS Diva Software 8.0.1	BD Biosciences, Heidelberg, D
GraphPad Prism 9.1.1	GraphPad Software, Boston, MA , USA

Tabelle 3 Software

2.1.2. Verbrauchsmaterial

Material	Typ	Hersteller/Lieferant
Röhrchen für WHOPPA	FACS-Röhrchen Konisch, 4,5 ml PP Röhrchen	Sarstedt, Nürnberg, D
Reagiergefäße	Micro tube 0,5ml/ 1.5 ml/ 2ml	Sarstedt, Nürnberg, D
Probenröhrchen	13ml-Röhrchen Falcon Röhrchen (15ml,50ml)	Sarstedt, Nürnberg, D Greiner Bio-One, Kremsmünster, A
Dialysekassetten	Slide-A-Lyzer ^R Dialysis Casette 0.5-3 ml /3.500 MWCO 0.1-0-5 m/ 7.000 MWCO	Thermo Scientific, Rockford, USA
Filter	0,45µm Minisart	Sartorius, Göttingen, D
PVDF-Membran	Immobilon-P	Merck Millipore, Carrigtwohill, Ireland

Tabelle 4 Verbrauchsmaterial

2.1.3. Chemikalien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller/Lieferant
<i>Anticoagulant citrate Dextrose Solution Ph EUR (ACD) Solution A</i>	Terumo BCT, München, D
PBS 1x w/o Calcium, w/o Magnesium	Anprotec, Bruckberg, D
PBS 10x w/o Calcium, w/o Magnesium	Anprotec, Bruckberg, D
EDTA, Titriplex ^R III	Merck, Darmstadt, D
<i>SYTOX^R blue dead cell stain</i>	In Vitrogen, Paisley, UK
pHrodo Red, SE	Life Technologies, Darmstadt, D
Endoglycosidase S	New England Biolabs, Frankfurt, D
<i>10x GlycoBuffer</i>	New England Biolabs, Frankfurt, D

<i>Page Ruler Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania
<i>Biotinylated Lens culinaris lectin (LCA)</i>	Vector Laboratories, Burlingame, USA
<i>Peroxidase labelled streptavidin</i>	Vector Laboratories, Burlingame, USA
<i>ECL^R Prime Western Blotting Detection Reagent</i>	Millipore Corporation, Billerica, USA
Prostaglandin E1	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
HBSS + Ca + Mg	PAN Biotech, Aidenbach, D
Ammoniumchlorid	AppliChem, Darmstadt, D
Kaliumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe, D
96% Eisessig	Merck, Darmstadt, D
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
100% Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
25% Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Na ₂ S ₂ O ₃ + 5H ₂ O	Roth, Karlsruhe, D
2,5 M Na-Acetat	Roth, Karlsruhe, D
Silbernitrat	Merck, Darmstadt, D
37% Formaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Na ₂ CO ₃	Roth, Karlsruhe, D
SDS	Roth, Karlsruhe, D
TRIS-Puffer	Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumpersulfat	Sigma Aldrich, Taufkirchen, D
Temed	SERVA Elektrophoresis, Heidelberg, D
37% HCL	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Rotiphorese 10x SDS-PAGE	SERVA Elektrophoresis, Heidelberg, D
<i>Albumin bovine Fraction V</i>	SERVA Elektrophoresis, Heidelberg, D
<i>DL-Dithiothreitol (DTT)</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
<i>MagStrep „type3“ XT beads</i>	Iba GmbH, Göttingen, D
<i>Buffer BXT; Strep-Tactin^RXT Elution Buffer</i>	Iba GmbH, Göttingen, D
VE-Wasser	Hausanlage
Zitronensäure, >99,5%	Roth, Karlsruhe, D

Tabelle 5 Chemikalien

2.1.4. Antikörper

2.1.4.1. Monoklonale Antikörper

Die monoklonalen Antikörper SZ21 und 26.4 wurden vor dem Deglykosylieren und der Verwendung im WHOPPA mit Hilfe des Melon Kits aufgereinigt. Alle weiteren monoklonalen Antikörper konnten ohne vorherige Reinigung verwendet werden.

Antikörper	Hersteller/Lieferant
<i>APC Anti-human CD14 (clone HCD14)</i>	Biolegend, London, UK
<i>Pacific Blue Anti-CD16 (clone 3G8)</i>	Biolegend, London, UK
<i>FITC- Polyclonal rabbit anti-human IgG (Rabbit F(ab)2)</i>	Dako, Glostrup, DNK
AP3	Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Gießen, D
SZ21	Immunotech SAS, Marseille, F
B2G1	Department of Medical Biology, University of Tromsø, NOR
B2G1 delta nab	Department of Medical Biology, University of Tromsø, NOR
26.4	NHS Blood and Transplant, Cambridge, UK
<i>Purified mouse IgG1</i>	Ancell Corporation, Bayport, USA
<i>Purified mouse IgG2a</i>	BioCytex, Marseille, France
<i>Alexa FluorTM488 donkey Anti-mouse IgG</i>	Life technologies Corporation, Eugene, OR
<i>Peroxidase-AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L)</i>	Jackson, ImmunoResearch, PA, USA

Tabelle 6 Monoklonale Antikörper

2.1.4.2. Humane Seren

Es wurde ein Standard aus humanen polyklonalen Anti-HPA-1a Antikörpern verwendet. Das Standardserum wurde vom Nationalen Institut für biologische Standards und Kontrollen (NIBSC 03/152, Potters Bar Hertfordshire, UK) erworben. Der Anti-HPA-1a-Standard wurde aus Seren von sechs verschiedenen mit HPA-1a immunisierten Frauen hergestellt.

Acht unterschiedliche Spenderseren mit HLA-Antikörpern mit breiter Panel Reaktivität (PRA > 40%) wurden für die Herstellung eines polyklonalen Anti-HLA Klasse-I Standards gepoolt. Die Abwesenheit von Anti-HPA-1a-Alloantikörpern in den verwendeten Seren wurde durch den MAIPA bestätigt. Hierzu wurden phänotypisierte Thrombozyten als Testzellen verwendet. Als negative Kontrolle wurden Seren von drei unterschiedlichen männlichen Spendern mit der Blutgruppe AB zusammengefügt.

Ferner wurden zwei Gruppen von Seren von verschiedenen Frauen mit FNAIT untersucht. Die Seren beider Gruppen beinhalteten Anti-HPA-1a-Antikörper. Die erste Serumgruppe enthielt HPA-1a-Antikörper ohne HLA-Klasse I Antikörper (N=7), die zweite Gruppe mit HLA-Klasse I Antikörper (N=8). Das Vorhandensein der Antikörper in den verschiedenen Seren wurde zuvor im Routinelabor getestet. Darüber hinaus wurde das Serum einer Mutter getestet, deren Kind an einer ICH erkrankte.

Laufende Nummer	Serum	HPA-1a Antikörper (Screening; CM) ¹	HLA Class I Antikörper Panel Reactive Antibodies (PRA in LCT) or OD's
1	61853/19	+ (0.165; 0.086)	-
2	46771/15	+ (2.653; n.t)	-
3	56843/18	+ (1.913; 1.285)	-
4	43086/14	+ (2.937; 1.285)	-
5	62921/19	+ (2.909; n.t)	-
6	43277/14	+ (1.170; n.t)	-
7	53860/17	+ (1.582; n.t)	-
8	61602/19	+(2,372)	+ (0,342)
9	61453/19	+ (1,477)	+ (0,359)
10	65313/20	+ (2,924)	+ (0,825)
11	64657/20	+(2,561)	+(1,232)
12	65545/20	+(3,011)	+(0,369)
13	64275/20	+(0,599)	+ (1,915)
14	62537/19	+(2,422)	+(0,268)
15	56522/20	+(2,861)	+(0,265)
16	1959/18	-	+ (84%; not tested)
17	556/20	-	+ (47%; 44% ²)
18	124/19	-	+ (49%; 67% ²)
19	170/19	-	+ (36%; 41% ²)
20	201/19	-	+ (36%; 48% ²)
21	1223/16	-	+ (85%; not tested)
22	2800/17	-	+ (98%; not tested)
23	150/19	-	+ (72%; 82% ²)
31	Serum einer Mutter mit Kind mit ICH		

Tabelle 7 Seren mit Ergebnissen aus dem Routine Labor

1) OD in MAIPA obtained by screening and crossmatch (CX); 2) DTT treated

2.1.5. Kits

Zweck	Kit-Name	Hersteller/Lieferant
IgG-Isolierung	<i>Melon Gel IgG spin purification Kit</i>	Thermo Scientific, Langensebold, D

Tabelle 8 Kits

2.2. Methode

2.2.1. Probenmaterial

Blutproben von Spendern und Spenderinnen mit ausgewählten Blutgruppenmerkmalen wurden in der Blutbank in Gießen gewonnen und mit 1,6 ml ACDA Antikoagulant versetzt. Alle Blutspender und Blutspenderinnen wurden über die Verwendung ihres Blutes zu wissenschaftlichen Zwecken aufgeklärt und erteilten ihr schriftliches Einverständnis. Eine Bewilligung der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der JLU liegt vor (21.07.2009, 82/09). Die Proben wurden noch am selben Tag analysiert.

2.2.2. Plättchen-Phagozytose-Assay im Vollblut

(WHOPPA – *whole blood platelet phagocytosis assay*)

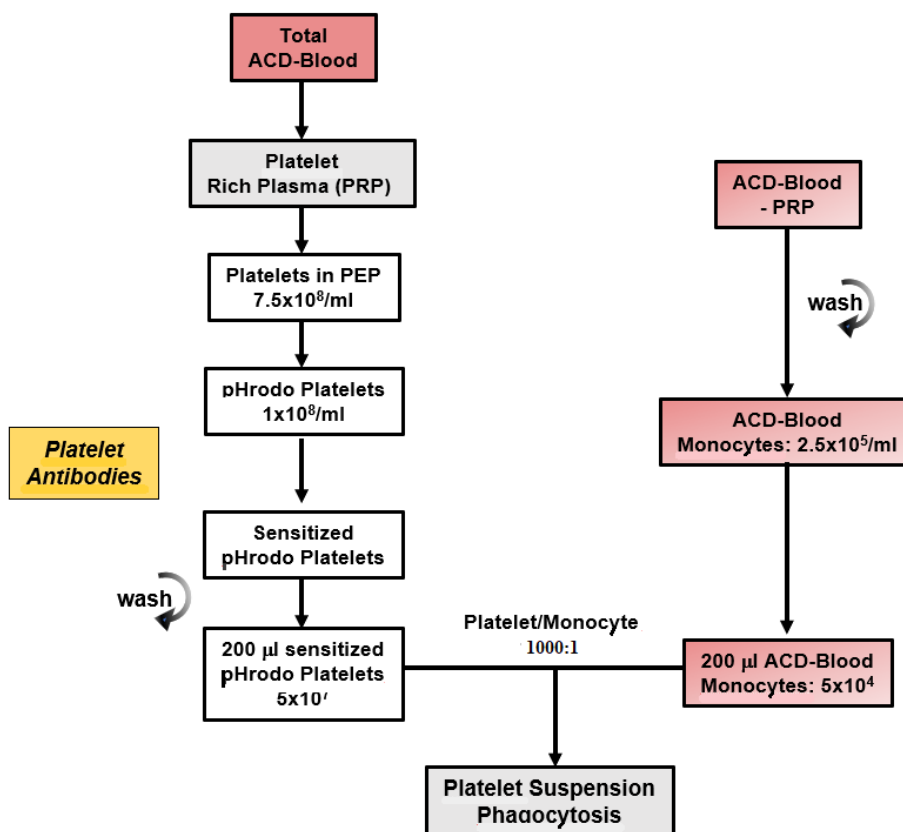


Abb. 5 Vereinfachtes Flow-Chart der WHOPPA Methode

Isolation und Färbung der Thrombozyten

Zunächst wurde mit der Isolierung von plättchenreichem Plasma (PRP) begonnen. Für die Isolierung wurde 10 ml des mit ACD antikoagulierten Bluts für fünf Minuten bei 450 x g ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Entnahme des plättchenreichen Überstandes wurde die Konzentration der Thrombozyten mit Hilfe des Sysmex Analysators bestimmt. Zum Waschen der Thrombozyten wurden das PRP mit PEP-Puffer (pH = 7,4) versetzt und für zehn Minuten bei 800 x g zentrifugiert.

Das gewaschene PRP wurde mit dem pH-sensitiven Farbstoff pHrodo Red gefärbt. Durch die Eigenschaften des Farbstoffes, bei abnehmendem pH-Wert stärker zu fluoreszieren, war es möglich, die phagozytierten Thrombozyten in der durch die Lysosomen sauren Umgebung nachzuweisen.

Basierend auf den Untersuchungen von Takahashi et al. von 2017 zu der Färbung der Thrombozyten mit pHrodo wurde, ausgehend von der gemessenen Thrombozytenkonzentration, eine Konzentration von $7,5 \times 10^8$ Thrombozyten/ml mit dem PEP-Puffer eingestellt (Takahashi et al., 2017). Der Farbstoff wurde in einer Endkonzentration von 1:3000 zu dem PRP hinzugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die gefärbten Plättchen zehn Minuten bei 800 x g mit PEP-Puffer gewaschen und auf eine Konzentration von 1×10^8 Thrombozyten/ml eingestellt. Das restliche Vollblut wurde als Quelle für die Monozyten im Phagozytose Assay verwendet.

Sensibilisierung der pHrodo gefärbten Plättchen mit Antikörpern

450µl der gefärbten Thrombozyten ($4,5 \times 10^7$ Thrombozyten) wurden mit 50µl Serum (Endkonzentration 1:10) versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Für die Opsonierung mit monoklonalen Antikörpern wurde ein Aliquot von 500µl gefärbter Thrombozyten (5×10^7 Thrombozyten) verwendet und mit der jeweiligen Antikörpermenge versetzt. Als Isotyp-Kontrolle wurde AB-Seren oder IgGs, als positive Kontrolle Anti-HPA-1a-Standard oder AP3 verwendet.

Nach zweimaligem Waschen mit der doppelten Menge (1000µl) an PEP-Puffer wurden die Plättchen mit 210µl des HBSS-Puffers aufgefüllt. Diesem Ansatz wurde ein Aliquot von 10µl entnommen, um ihn für die durchflusszytometrische Analyse der

Antikörperbindung zu verwenden (siehe **Abb. 8**). Die restlichen 200µl des Ansatzes wurden im Phagozytose-Assay eingesetzt (siehe unten).

Einstellen der Monozytenkonzentration im Vollblut

Um annähernd physiologische Bedingungen nachzuahmen, wurden 50.000 Monozyten für die Phagozytose von 45.000.000 Plättchen vorbereitet (1 Monozyt/900 Thrombozyten).

Zu diesem Zweck wurde die Konzentration der Leukozyten im Vollblut mit Hilfe des Sysmex gemessen und der Anteil der Monozyten durchflusszytometrisch bestimmt. Hierfür wurde 200µl des Vollbluts mit 1,25µl APC konjugiertem monoklonalem Antikörper gegen CD14 versetzt und im Dunkeln für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Erythrozyten mit 4,5ml des Lyse-Puffers für sechs Minuten bei Raumtemperatur unter Schwenken lysiert. Die Erythrozytenlyse erfolgte mittels hypotonem Schock. Die roten Blutkörperchen nehmen durch die niedrige Salzkonzentration im Lysepuffer Wasser aus der Umgebung auf. Die Erythrozyten schwellen daraufhin an und werden zerstört. Die Reste der Erythrozyten sind von ihrer Größe vernachlässigbar, sodass sie die Analyse nicht weiter stören.

Nach Zentrifugation (fünf Minuten, 450 x g) wurden die Zellen mit 4,5ml PBS gewaschen (fünf Minuten, 450 x g). Anschließend wurde der Ansatz mit 100µl PBS aufgefüllt und der prozentuale Anteil an CD14-positiven Monozyten durchflusszytometrisch bestimmt. Die absolute Monozytenzahl wurde anhand der mit dem Sysmex gemessenen Leukozytenzahl berechnet. Basierend auf der absoluten Monozytenzahl wurden die Monozyten auf eine Konzentration von $2,5 \times 10^5$ /ml eingestellt. Die berechnete Menge an Vollblut wurde, um Störfaktoren wie Komplement zu entfernen, mit 10ml PBS gewaschen (fünf Minuten, 450 x g). Der Überstand wurde abgesaugt und mit HBSS-Puffer auf das berechnete Endvolumen aufgefüllt.

Phagozytose und durchflusszytometrische Messung phagozytischer Monozyten

Die 200µl der Antikörper-beladenen und pHrodo-gefärbten Thrombozyten ($4,5 \times 10^7$ Thrombozyten) wurden mit dem 200µl-Ansatz des gewaschenen Bluts zusammengefügt. Anschließend wurde der Phagozytoseansatz für 60 Minuten bei 37°C

und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurde der Überstand nach fünfminütiger Zentrifugation bei 450 x g entfernt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Zur weiteren Analyse der Monozyten wurde der Phagozytoseansatz mit 3µl APC-konjugierten monoklonalen Antikörpern gegen CD14 versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Erythrozyten wurden, wie bereits beschrieben, lysiert. Nach Zugabe von 1µl SytoxBlue wurde die Prozentzahl der Monozyten, die Thrombozyten phagozytiert haben, mit dem Durchflusszytometer bestimmt.

2.2.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur qualitativen und quantitativen Untersuchung unterschiedlicher Zellpopulationen. Die Probe wird durch hydrodynamische Fokussierung in einem feinen Flüssigkeitsstrahl durch den Messkanal geleitet. Die einzelnen Zellen durchlaufen in sehr hoher Geschwindigkeit mehrere Laserstrahlen. Hierbei streuen die Zellen das Licht. Dies erlaubt die gleichzeitige Messung verschiedener physikalischer Parameter. Die Durchflusszytometrie wird oft auch als FACS (*Fluorescence activated cell scanning*) bezeichnet. So messen die Detektoren einerseits die Lichtstreuung und andererseits die Fluoreszenz-Emission der zellgebundenen Fluoreszenzfarbstoffe. Die Streuung des Lichtes wird durch einen *Forward Scatter Detektor (FSC)*, der die Zellgröße detektiert, und durch einen *Side Scatter Detektor (SSC)*, der die Granularität der Zellen misst, erfasst. Die Fluoreszenzfarbstoffe sind in der Regel an Antikörper gebunden und gegen hochspezifische Oberflächenantigen („*Cluster of Differentiation*“ - CD-Marker) gerichtet. Die Kombination mehrerer Fluoreszenzfarbstoffe mit unterschiedlichem Emissionsspektrum ermöglicht die simultane Messung verschiedener Antigenmuster. Voraussetzung ist die getrennte Detektion der Fluoreszenzemission.

Zusammenfassend ermöglicht die Durchflusszytometrie eine Untersuchung verschiedener Zellen anhand ihrer Größe, der Struktur ihres Zellkerns, ihrer Granularität sowie ihrer Oberflächeneigenschaften.

Die Färbung der Zellen für die durchflusszytometrische Untersuchung erfolgte immer nach dem gleichen Protokoll.

2.2.3.1. Analyse der Antikörperbindung an den Plättchen

An Thrombozyten gebundene Antikörper wurden mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen. Zu diesem Zweck wurden 10µl der sensibilisierten, pHrodo-markierten und mit HBSS verdünnten Plättchen (siehe oben) entnommen. Je nach verwendetem Primärantikörper wurden 10µl des Ansatzes mit 1µl des Sekundärantikörpers, FITC-konjugierter rabbit Fab₂ Anti-human IgG oder Alexa FluorTM488 donkey Anti-mouse IgG versetzt. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.3.2. Bestimmung der Monozytenzahl

Zur annähernden Nachbildung des physiologischen Verhältnisses musste der Anteil an Monozyten am Vollblut bestimmt werden. Hierfür wurde 200µl Vollblut mit 1,25µl APC konjugiertem monoklonalem Antikörper gegen CD14 inkubiert. Anschließend wurden die Erythrozyten lysiert. Der prozentuale Anteil an CD14 positiven Monozyten an allen weißen Blutkörperchen wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

2.2.3.3. Bestimmung der Phagozytoserate

Die Monozyten im Phagozytoseansatz wurden mit 3µl APC-konjugierten monoklonalen Antikörpern gegen CD14 markiert. Die im Vollblut noch enthaltenen Erythrozyten wurden, um die durchflusszytometrische Messung nicht zu stören, lysiert. Anschließend wurde durch die Zugabe von 1µl SytoxBlue, einem blauen Nukleinsäure-Farbstoff, welcher problemlos in Zellen mit beschädigter Zellmembran eindringt, tote Zellen markiert. Nur lebende Monozyten wurden mit Hilfe des Durchflusszytometers gezählt. Alle CD14-positiven Zellen, die ebenfalls pHrodo-positiv waren, wurden als lebende Monozyten, welche opsonisierte Thrombozyten phagozytierten, definiert. Es wurde 2.000 - 20.000 Zellen ausgewertet. Die Phagozytoserate wurde anhand des prozentualen Anteils an Monozyten, welche pHrodo gefärbte Thrombozyten phagozytierten, bestimmt. Die Phagozytoserate von dem AB-Serum (negative Kontrolle) wurde auf 5% ± 0,1%, die der monoklonalen Isotypkontrolle auf 1,5% ± 0,1% eingestellt. Jeder Wert über 5,1% bzw. 1,6% wurde als positive Phagozytose definiert.

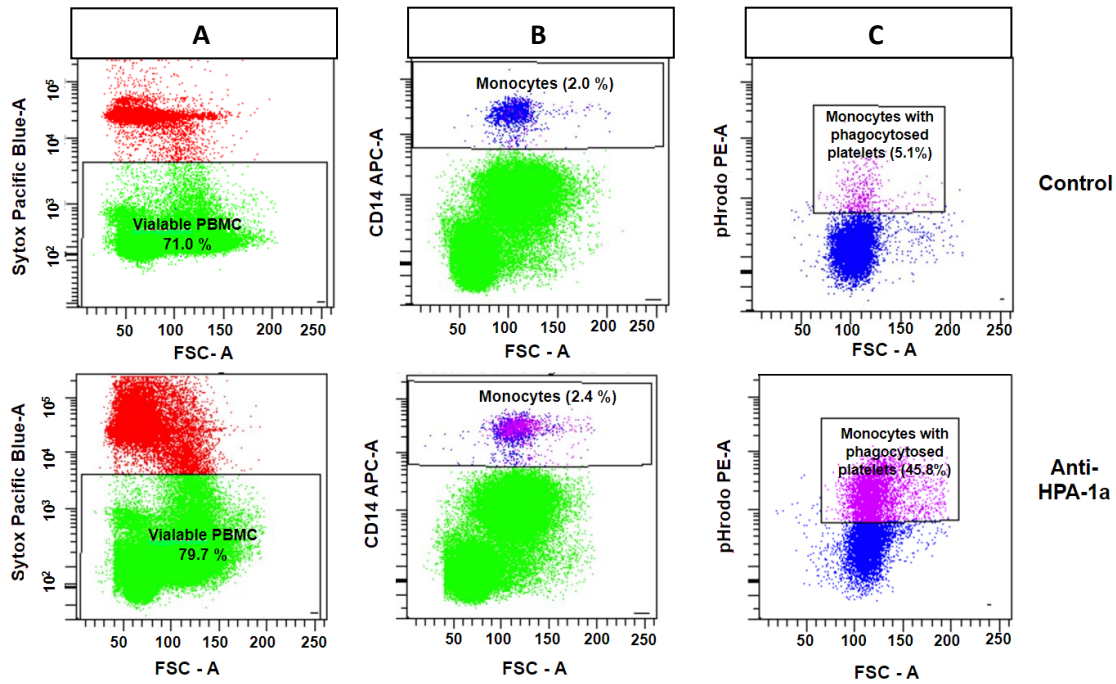


Abb. 6 Gatingstrategie der phagozytierenden Monozyten

Dargestellt ist die Identifizierung der Monozyten in der durchflusszytometrischen Analyse einer negativen (AB-Serum; obere Zeile) und einer positiven Kontrolle (Anti-HPA-1a Standard, untere Zeile).

A) Färbung der Zellen mit Sytox Blue, um die lebenden Zellen (grün) zu erfassen. B) Identifizierung der lebenden Monozyten (Blau) durch Färbung mit APC konjugierten CD14 Antikörper. C) Analyse der lebenden Monozyten, welche pHrodo gefärbte Thrombozyten phagozytiert haben (lila).

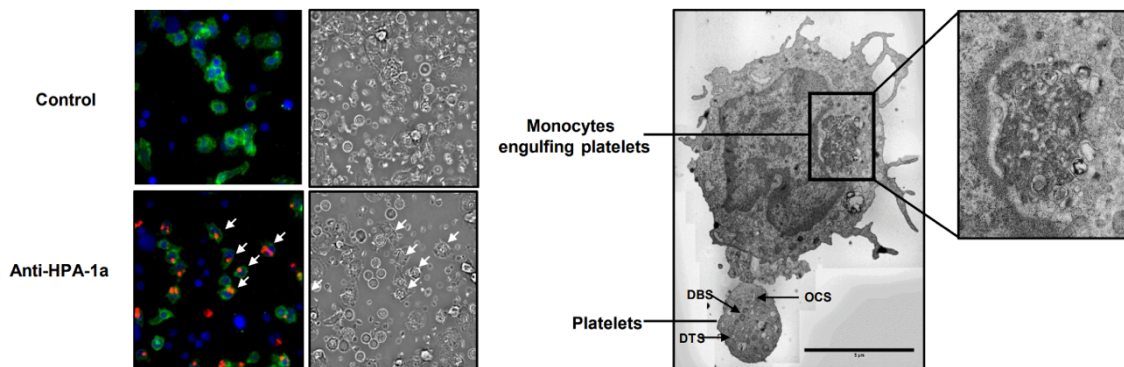


Abb. 7 Mikroskopische Analyse der Phagozytose von Thrombozyten durch Monozyten (Wiedergegeben mit Genehmigung des Urheberrechtsinhabers Frau Rohr, Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Gießen)

2.2.3.4. Bindungstest

An Thrombozyten gebundene Antikörper wurden durchflusszytometrisch nachgewiesen. Zu diesem Zweck wurden 10µl der opsonierten Thrombozyten entnommen und mit 1µl des fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörpers versetzt (siehe Kapitel 2.2.3., S. 25). Nach fünfzehnminütiger Inkubation wurde die Probe durchflusszytometrisch analysiert. Die Thrombozyten wurden im Vorwärts/Seit-*Scatter* gated und die an Thrombozyten gebundenen Antikörper durch Erfassung des bindenden Sekundärantikörpers (siehe **Abb. 8**) gemessen. Die Quantifizierung der Antikörperbindung wurde auf der Grundlage der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) durchgeführt.

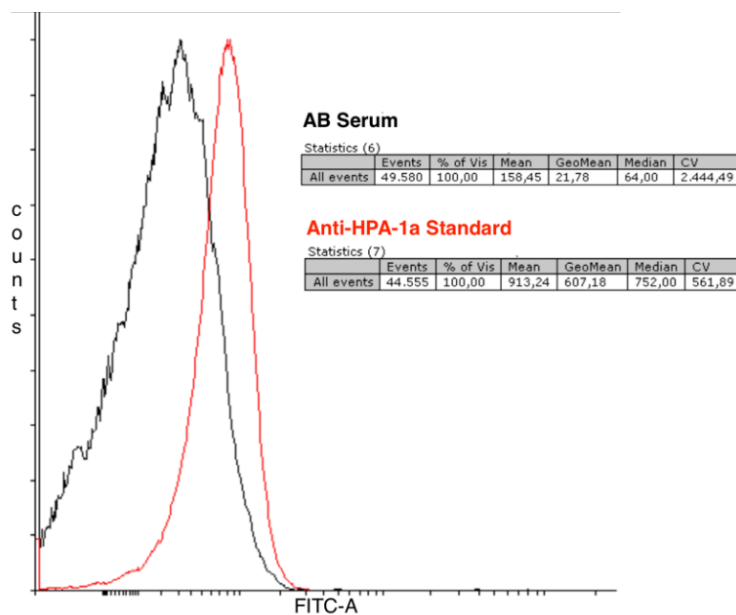


Abb. 8. Overlay Histogramm der gebundenen Antikörper

Menge an gebundenen Antikörpern an Thrombozyten der negativen (AB Serum, schwarz) und der positiven Kontrolle (Anti-HPA-1a-Standard, rot). Die mittlere Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity) wurde berechnet.

2.2.4. Säurebehandlung

HLA-Klasse I-Antigene setzen sich aus einer schweren Kette, einem transmembranen und einem zytoplasmatischen Anteil sowie einem extrazellulären nicht-kovalent gebundenen β 2-Mikroglobulin, zusammen. Die Behandlung von Thrombozyten mit Zitronensäure (pH 3) führt zu einer Abspaltung des β 2-Mikroglobulins von der Zelloberfläche. Die meisten polyklonalen Antikörper erkennen das Antigen nur im Heterodimer, was den Verlust der HLA-Antigenität zur Folge hat (Neumüller et al., 1993).

Das isolierte PRP wird mit dem PEP-Puffer gewaschen. Daraufhin wird mit kalter Zitronensäure (4 °C, pH 2,9 - 3) eine Konzentration von 2×10^9 Thrombozyten/ml hergestellt. Als negative Kontrolle wird das PRP mit 4 °C kaltem PEP-Puffer in einer Konzentration von 2×10^9 /ml mitgeführt. Nach Inkubation (zehn Minuten, auf Eis) werden die Ansätze mit der 20-fachen Menge an PEP-Puffer bei Raumtemperatur neutralisiert und zentrifugiert (zehn Minuten, 800 x g). Nach dem Entfernen des Überstandes wurde mit PEP-Puffer eine Konzentration von $7,5 \times 10^8$ hergestellt. Anschließend wurde nach dem oben beschriebenen Protokoll weiterverfahren. Verglichen wurde die Phagozytoserate und die Antikörperbindung von dem Serum 10 sowie dem monoklonalen Antikörper w6/32 vor und nach Säurebehandlung.

2.2.5. Modifizierte Antikörper

Verschiedene monoklonale Antikörper gegen β 3-Integrin (SZ21, B2G1, 26.4) sowie Seren mit Anti-HLA- und Anti-HPA-Antikörpern wurden mit Hilfe der Endoglykosidase S (Endo S) verdaut. Ferner wurden Immunglobuline (IgG) der entsprechenden IgG-Subklasse sowie Serum der Blutgruppe AB als Isotypkontrolle deglykosyliert. Die in dem Anti-HLA-Standard, Anti-HPA-Standard sowie AB-Serum befindlichen IgGs wurden zuvor mit der HighTrap™ Protein G Säule isoliert. 100µg der nativen IgGs wurde mit 1µl des 10-fach GlycoBuffers und 1µl Endo S bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Hierbei entfernt das Enzym Endo S das N-gebundene Glykane der schweren Kette des IgGs.

Der rekombinante Antikörper delta B2G1 wurde uns freundlicherweise von Dr. Skogen und Dr. Stuge aus Norwegen, sowie Dr. Ghevaert und Dr. Lau aus Großbritannien zur Verfügung gestellt. Der Fc-Teil dieses Antikörpers ist so modifiziert, dass er nicht mehr in der Lage ist, eine Fc γ -vermittelte Phagozytose zu induzieren.

2.2.5.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2.2.5.1.1. Silberfärbung

Der Nachweis der erfolgreichen Abspaltung des Zuckers (Deglykosylierung) erfolgte mit 7,5%-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) sowie nachfolgender Silberfärbung. Unter reduzierten Bedingungen wurden zwei Banden, die schwere und die leichte Kette der IgGs, aufgetrennt und mittels Silberfärbung sichtbar. Durch die Abspaltung des Zuckers ist die schwere Kette des deglykosylierten IgGs etwas kleiner als die schwere Kette des naiven IgGs. Nach Deglykosylierung laufen die Antikörper somit schneller im Gel.

2.2.5.1.2. *Western-Blot mit LCA (Lens Culinaris Agglutinin)*

Zum direkten Nachweis des N-Glykans wurden die zuvor mit der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine PVDF(*Polyvinylidendifluorid*)-Membran überführt. Nach dem Transfer der Proteine konnte das N-Glykan mithilfe des *Lens Culinaris Agglutinins* unter der Verwendung des Biotin-Avidin/Streptavidin-Systems nachgewiesen werden. Bei Fehlen des N-Glykans nach Abspaltung durch das Enzym Endoglykosidase S ist kein Signal im LCA-Blot mehr nachweisbar.

2.3. Biostatistik

Die Dotplots wurden mit Hilfe der FACS Diva Software 8.0.1 erstellt. Die deskriptive Statistik wurde unter Verwendung von GraphPad (GraphPad Software, Boston, MA, USA, Version 9.1.1, 2021) durchgeführt und die Daten in Form von Histogrammen visualisiert. Lagemaß und Streuung wurden ebenfalls unter Verwendung von GraphPad Prism berechnet und graphisch dargestellt. Es wurde der einseitige und zweiseitige t-Test mit Einteilung des Signifikanzniveaus gemäß den Konventionen als * ($p \leq 0,05$), ** ($p \leq 0,01$) und *** ($p \leq 0,001$) verwendet. Ferner wurden Korrelationsanalysen nach Pearson angewandt. Die zugrunde liegende Grundgesamtheit wurde mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft.

3

Ergebnisse

3.1. Der Anti-HPA-1a-Standard induziert eine allelspezifische und konzentrationsabhängige Phagozytose

Es wurde zunächst die Spezifität und Sensitivität der zuvor neu entwickelten WHOPPA Methode untersucht. Hierzu wurden unterschiedliche Verdünnungen eines Standards (NIBSC 03/152, 1:16 - 1:1024), der ausschließlich thrombozytenreaktive Antikörper gegen HPA-1a beinhaltet, verwendet. Die unterschiedlichen Verdünnungen wurden mit vier HPA-1bb- sowie fünf HPA-1aa-Spendern getestet. Erwartungsgemäß zeigt sich, dass die Phagozytoserate der HPA-1aa-Thrombozyten nach Opsonierung mit HPA-1a-Antikörper signifikant höher ausfiel als die Phagozytoserate von HPA-1bb-Thrombozyten. Ein signifikanter Unterschied der Phagozytoserate war bis zu einer Verdünnung von 1:32 nachweisbar.

Die WHOPPA Methode wurde durch einen durchflusszytometrischen Bindungstest mithilfe eines Sekundärantikörpers ergänzt. Hier konnte ein signifikanter Unterschied der Antikörperbindung zwischen HPA-1a-positive und HPA-1a-negative Thrombozyten bis zu einer Verdünnung von 1:128 nachgewiesen werden.

Die Menge der gebundenen Antikörper (MFI) korrelierte stark mit der gemessenen Phagozytose-Rate (%) ($r=0,9256$; $p < 0,0001$).

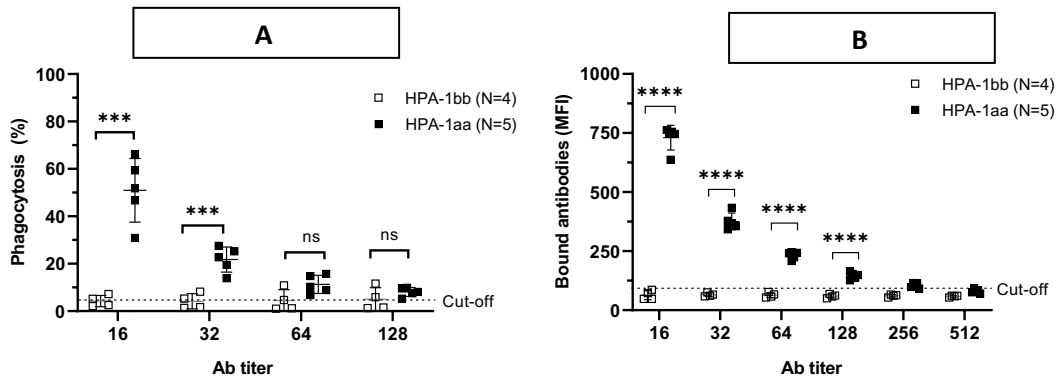


Abb. 9. Antigen-spezifische Induktion der Phagozytose und antigen-spezifische Bindung des Anti-HPA-1a-Standards

Darstellung der Phagozytoserate (A) sowie der an Thrombozyten gebundenen Antikörper (MFI, mean fluorescence intensity) (B) nach Opsonierung von Thrombozyten mit Anti-HPA-1a-Standard in unterschiedlichen Verdünnungstufen (1:16 – 1:128/1:512). Phagozytoserate: Anteil pHrodo-positiver Monozyten nach Ingestion pHrodo-gefärbter Thrombozyten in %. Die Untersuchung wurde mit HPA-1aa und -1bb Thrombozyten (n≥4) durchgeführt. Ab, antibody. *p<0,05; **p<0,01; *** p< 0,001; ns – not significant.

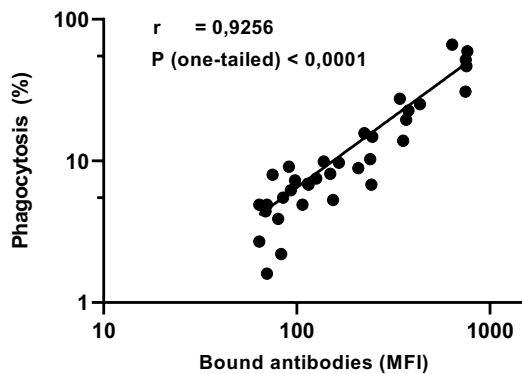


Abb. 10. Korrelation der Phagozytoserate mit der Menge gebundener Anti-HPA-1a-Antikörper

Darstellung der Korrelation der Phagozytoserate Anti-HPA-1a-opsonierter Thrombozyten mit der Menge an thrombozytär gebundenen Anti-HPA-1a-Antikörpern (MFI, mean fluorescence intensity). Phagozytoserate: Anteil pHrodo-positiver Monozyten nach Ingestion pHrodo gefärbter Thrombozyten in %.

3.2. Monozyten, nicht neutrophile Granulozyten, phagozytieren opsonierte Thrombozyten im Vollblut

Um zu überprüfen, ob neben Monozyten auch neutrophile Granulozyten opsonierte Thrombozyten phagozytieren, wurde ein weiterer Versuch angeschlossen. Hierzu wurden nach Abschluss der Phagozytose fluoreszenzmarkierte Anti-CD14-Antikörper sowie fluoreszenzmarkierte Anti-CD16-Antikörper verwendet. Als negative Kontrolle wurden die Thrombozyten mit Serum von männlichen AB-Spendern beladen. Als Positivkontrolle, wurde ein weiterer Kontrollversuch mit pHrodo-markierten E. coli Bakterien bei 0 °C und bei 37 °C mitgeführt.

Es zeigte sich, dass nur Monozyten die Anti-HPA-1a-beladenen Thrombozyten phagozytiert haben (siehe **Abb. 11**). Die neutrophilen Granulozyten zeigten in unserem Testsystem keine Phagozytose von antikörperbeladenen Thrombozyten (siehe **Abb. 12**). Während die pHrodo gefärbten E. coli auch von Granulozyten phagozytiert wurden (siehe **Abb. 13**).

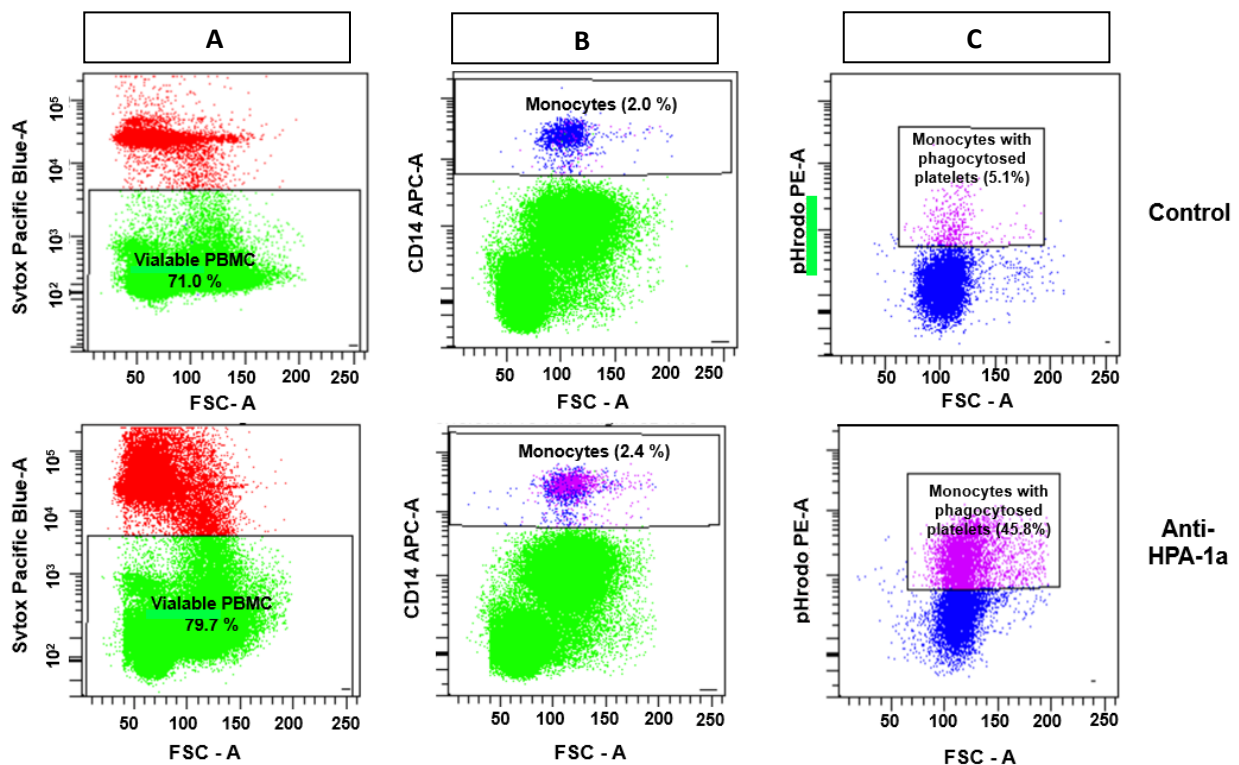


Abb. 11 Phagozytose der Thrombozyten durch Monozyten nach Opsonierung mit AB-Serum (Control) im Vergleich zu Anti-HPA-1a-Standard (Anti-HPA-1a)

A) Anteil der lebenden mononukleären Zellen des peripheren Blutes (viable PBMC) im Forward-Side-Scatter (FSC) und mit SytoxBlue in %.

B) Anteil aller lebenden Monozyten im Forward-Side Scatter (FSC) und mit CD14-APC-Antikörpern in %.

C) Anteil aller lebenden Granulozyten im Forward-Side Scatter (FSC) und mit CD16-APC-Antikörpern in %.

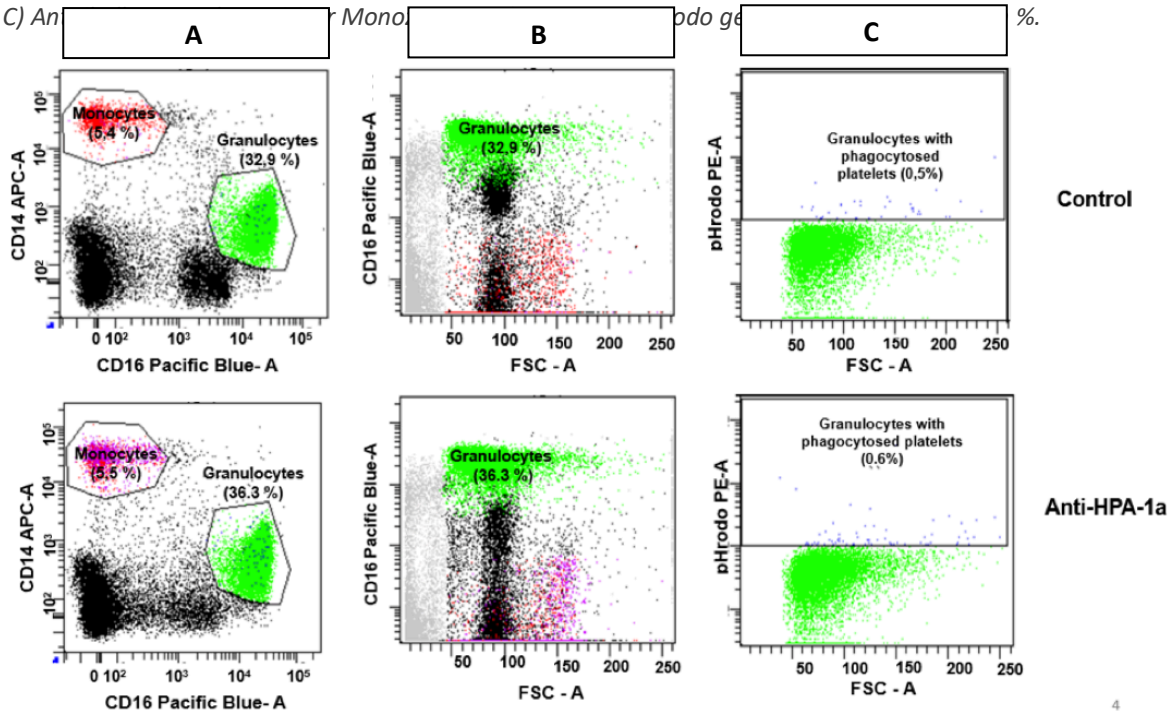


Abb. 12 Phagozytose von Thrombozyten durch Granulozyten nach Opsonierung mit AB-Serum (Control) im Vergleich zu Anti-HPA-1a-Standard (Anti-HPA-1a)

A) Anteil der Monozyten und Granulozyten durch Gating mit CD14 APC- und CD16 Pacific Blue-Antikörpern in %.

B) Anteil aller lebenden Granulozyten im Forward-Side-Scatter (FSC) und mit CD16 Pacific Blue-Antikörpern in %.

C) Anteil aller pHrodo-positiven Granulozyten nach Ingestion pHrodo gefärbter Thrombozyten in %

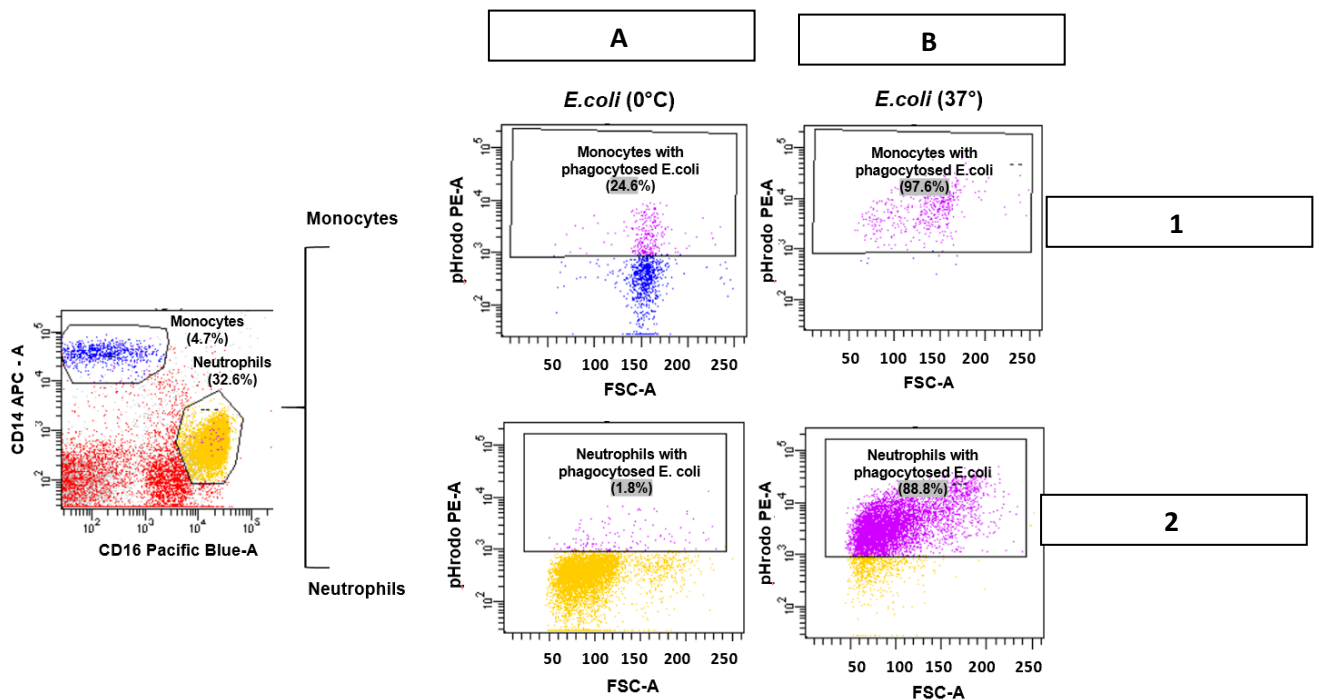


Abb. 13 Phagozytose von pHrodo-markierten *Escherichia coli* (*E. coli*) bei 0° C (A) und 37° C (B)

1) Anteil aller pHrodo-positiven Monozyten nach Ingestion pHrodo-markierter *E. coli* bei 0° C (A) oder 37° C (B) in %.

2) Anteil aller pHrodo-positiven Neutrophilen nach Ingestion pHrodo-markierter *E. coli* bei 0° C (A) oder 37° C (B) in %.

3.3. Mütterliche Anti-HLA-Klasse I-Antikörper induzieren die Phagozytose von opsonierten Thrombozyten

30-50 % aller Schwangeren bilden Anti-HLA-Klasse I-Antikörper gegen kindliche, vom Vater ererbte, HLA-Klasse I Antigene. In den Seren vieler schwangerer Frauen mit FNAIT lassen sich daher neben HPA-1a- auch HLA-Klasse I-Antikörper nachweisen. Da HLA-Klasse I Antigene auch auf Thrombozyten exprimiert sind, könnten Anti-HLA-Antikörper einen Einfluss auf die Phagozytose haben und die Messung der Phagozytose durch Anti-HPA-1a beeinflussen.

Um diese Frage zu prüfen, wurde zunächst die allgemeine Fähigkeit von Anti-HLA-Antikörpern, die Phagozytose opsonierter Thrombozyten zu induzieren, geprüft. Zu diesem Zweck wurden Seren von acht Spendern gepoolt. Alle acht Seren beinhalten Anti-HLA-Antikörper mit einer breiten Panel-Reaktivität. Die gepoolten HLA-Seren wurden in unterschiedlichen Verdünnungen (1:16 – 1:1024) getestet. Es zeigte sich, dass Anti-HLA-Klasse I-Antikörper generell befähigt waren, in dem Testsystem eine Phagozytose von Thrombozyten auszulösen.

Die Phagozytoserate der gepoolten Seren zeigte einen signifikanten Unterschied zur Negativkontrolle bis zu der Verdünnung von 1:512. Ein signifikanter Unterschied der Antikörperbindung in der Durchflusszytometrie konnte hier jedoch nur bis zu einer Verdünnungsstufe von 1:256 nachgewiesen werden. Auch hier wies die Menge der gebundenen Antikörper eine starke Korrelation mit der Phagozytoserate auf.

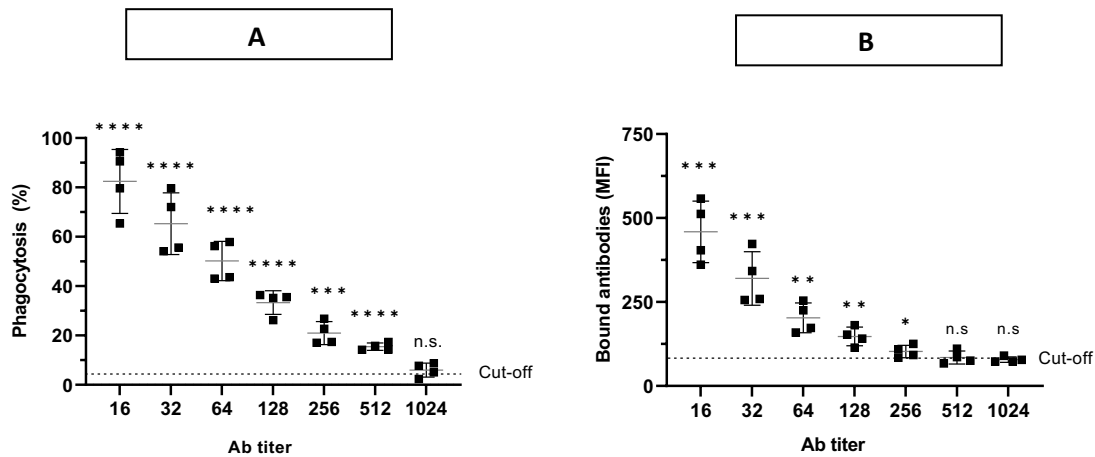


Abb. 14. Induktion der Phagozytose opsonierter Thrombozyten durch einen gepoolten Anti-HLA-Standard im Vergleich zur Antikörperbindung

Darstellung der Phagozytoserate (A) sowie der thrombozytär gebundenen Antikörper (MFI, mean fluorescence intensity) (B) nach Opsonierung von Thrombozyten mit gepooltem Anti-HLA-Klasse I Serum in unterschiedlichen Verdünnungsstufen (1:16 – 1:1024) (n=4). Phagozytoserate: Anteil pHrodo-positiver Monozyten nach Ingestion pHrodo gefärbter Thrombozyten in %. Ab, antibody. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns - not significant.

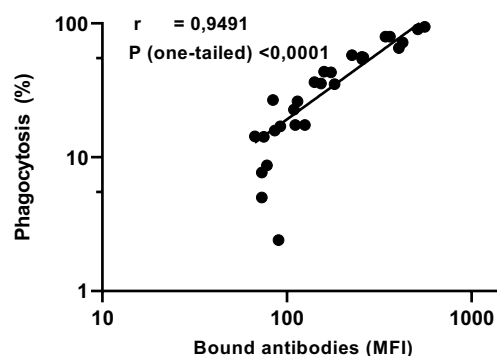


Abb. 15 Korrelation der Phagozytoserate mit der Menge gebundener Anti-HLA-Klasse I Antikörper

Darstellung der Korrelation der Phagozytoserate Anti-HLA-Klasse I-opsonierter Thrombozyten mit der Menge an thrombozytär gebundenen Anti-HLA-Klasse I-Antikörpern (MFI, mean fluorescence intensity). Phagozytoserate: Anteil pHrodo-positiver Monozyten nach Ingestion pHrodo gefärbter Thrombozyten in %.

Um den Einfluss der Anti-HLA-Klasse I-Antikörper in maternalen FNAIT-Seren auf die Phagozytoserate der Thrombozyten zu untersuchen, wurden zwei Gruppen von Seren verschiedener Fälle von FNAIT untersucht. Alle Seren enthielten Anti-HPA-1a-Antikörper. Die erste Kohorte enthielt keine (n=7) und die zweite Kohorte (n=8) enthielt zusätzlich Anti-HLA-Klasse I Antikörper. Bei der Testung der Anti-HPA-1a-Seren ohne Anti-HLA-Klasse I-Antikörper ließ sich, den Erwartungen entsprechend, eine allelspezifische Phagozytose opsonierter Thrombozyten erkennen. Während die opsonierten HPA-1aa-Thrombozyten phagozytiert wurden, blieb die Phagozytose der HPA-1bb-Thrombozyten aus (siehe **Abb. 16**). Diese Gruppe wies, ähnlich wie der Anti-HPA-Standard, eine starke Korrelation der Menge der gebundenen Antikörper mit der nachgewiesenen Phagozytoserate auf ($r= 0,9214$, $p < 0,001$) (**Abb. 18**). Interessanterweise zeigten bei der Testung der Seren mit zusätzlichen Anti-HLA-Antikörpern nur zwei der acht Seren keine allelspezifische Phagozytose. So lösten Serum 10 und Serum 13 zusätzlich eine Phagozytose von HPA-1bb Thrombozyten aus (**Abb. 17**). Die Korrelation der durchflusszytometrisch bestimmten Antikörperbindung mit der Phagozytoserate war bei zusätzlicher Anwesenheit von HLA-Antikörpern weiterhin gut ($r= 0,7897$, $p < 0,001$) (**Abb. 19**), jedoch deutlich schwächer, als bei alleiniger Anwesenheit von Anti-HPA-1a-Antikörpern ($r= 0,9214$, $p < 0,001$) (**Abb. 18**). Beide Kohorten wurden zuvor auf Anti-HPA-1a-Antikörper mit dem in der Routine gebräuchlichen MAIPA getestet. In der ersten Kohorte (ohne HLA-Antikörper) war die Korrelation der Phagozytoserate mit den gebundenen Antikörpern bei der Messung durch MAIPA deutlich schwächer ($r=0,7692$, $p<0,0001$) als bei der Messung mit WHOPPA ($r=0,9214$, $p<0,0001$) (**Abb. 18**). Ferner zeigten die Messergebnisse des MAIPAs bei den Seren mit HLA-Antikörpern keine Korrelation ($r=0,4931$, $p=0,06$) (**Abb.19**).

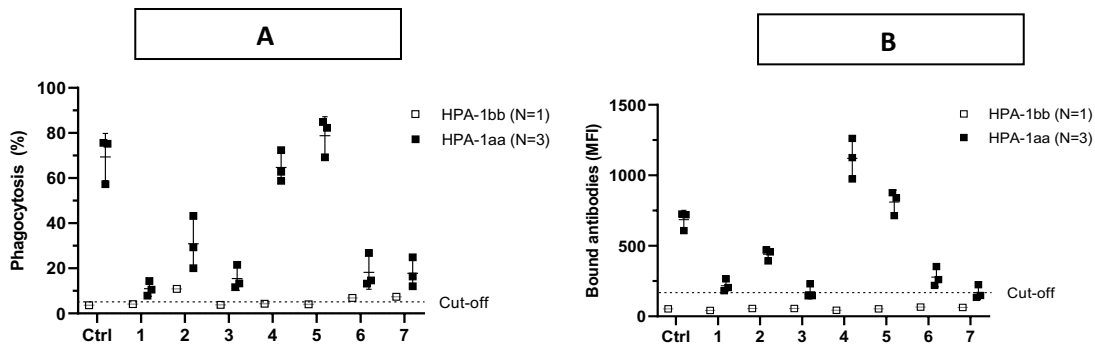


Abb. 16. Induktion der Phagozytose opsonierter Thrombozyten durch Anti-HPA-1a-Seren ohne zusätzliche Anti-HLA-Klasse I-Antikörper im Vergleich zur Antikörperbindung

Darstellung der Phagozytoserate (A) sowie der thrombozytär gebundenen Antikörper (MFI, mean fluorescence intensity) (B) nach Opsonierung mit Anti-HPA-1a-Seren von FNAIT Patientinnen ohne HLA-Antikörper. Die Analyse wurde mit HPA-1aa (n=3) und -1bb Thrombozyten(n=1) durchgeführt. Phagozytoserate: Anteil pHrodo-positiver Monozyten nach Ingestion pHrodo gefärbter Thrombozyten in %. X-Achse: Serum-Nr. Ctrl, AB-Serum.

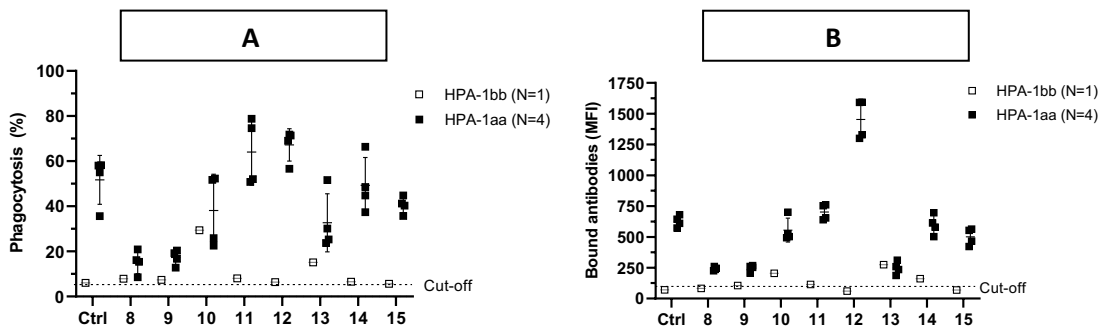


Abb. 17. Induktion der Phagozytose opsonierter Thrombozyten durch Anti-HPA-1a-Seren mit zusätzlichen Anti-HLA-Klasse I-Antikörpern im Vergleich zur Antikörperbindung

Darstellung der Phagozytoserate (A) sowie der thrombozytär gebundenen Antikörper (MFI, mean fluorescence intensity) (B) nach Opsonierung mit Anti-HPA-1a-Seren von FNAIT Patientinnen mit Anti-HLA-Antikörpern. Die Untersuchung wurde mit HPA-1aa (n=3) und -1bb-Thrombozyten (n=1) durchgeführt. Phagozytoserate: Anteil pHrodo-positiver Monozyten nach Ingestion pHrodo gefärbter Thrombozyten in %. X-Achse: Serum-Nr. Ctrl, AB-Serum.

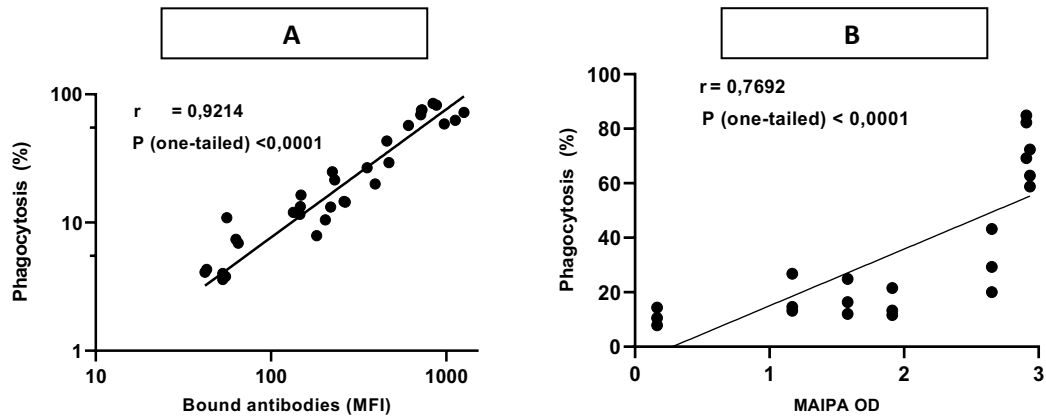


Abb. 18 Korrelation der Phagozytoserate mit der Menge gebundener Antikörper und den OD-Werten im MAIPA. Anti-HPA-1a-Seren ohne HLA-Klasse I-Antikörper

Darstellung der Korrelation der Phagozytoserate Anti-HPA-1a-opsonierter Thrombozyten mit der Menge an thrombozytär gebundenen Antikörpern (MFI, mean fluorescence intensity) (A) und der Optical Density (OD) im Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigens-Test (MAIPA) (B). Anti-HPA-1a-Seren ohne Anti-HLA-Klasse I-Antikörper. Phagozytoserate: Anteil pHrodo-positiver Monozyten nach Ingestion pHrodo gefärbter Thrombozyten in %.

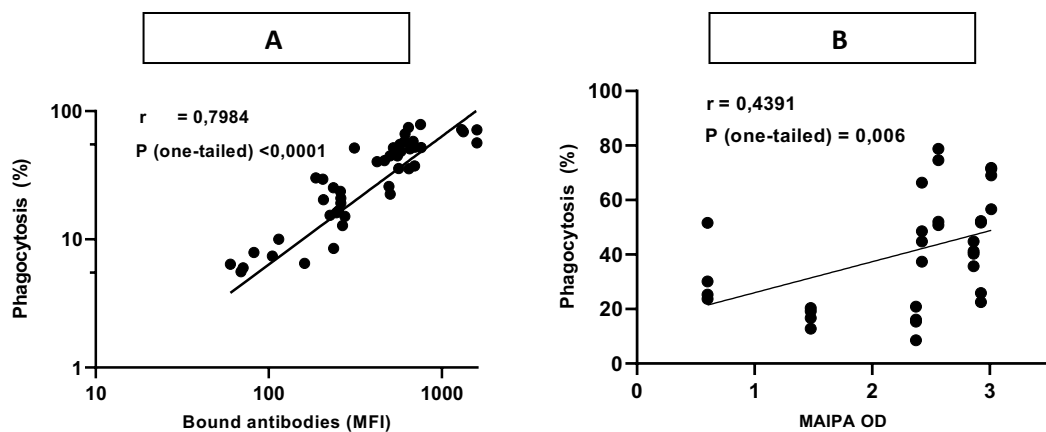


Abb. 19 Korrelation der Phagozytoserate mit der Menge gebundener Antikörper und den OD-Werten im MAIPA. Anti-HPA-1a-Seren mit HLA-Klasse I-Antikörpern

Darstellung der Korrelation der Phagozytoserate Anti-HPA-1a-opsonierter Thrombozyten mit der Menge an thrombozytär gebundenen Antikörpern (MFI, mean fluorescence intensity) (A) und der Optical Density (OD) im Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigens-Test (MAIPA) (B). Anti-HPA-1a-Seren mit Anti-HLA-Klasse I-Antikörpern. Phagozytoserate: Anteil pHrodo-positiver Monozyten nach Ingestion pHrodo gefärbter Thrombozyten in %.

In einem der Anti-HPA-1a-Seren mit Anti-HLA-Klasse I-Antikörpern (Serum 10) störte die Anwesenheit von Anti-HLA-Antikörpern den Nachweis von Anti-HPA-1a-Antikörpern: eine Differenzierung der Phagozytoserate nach Opsonierung von HPA-1aa- und HPA-1bb-Thrombozyten war nicht möglich (**Abb. 17**).

Die Phagozytoserate der HPA-1aa- und HPA-1bb-Thrombozyten nach Opsonierung mit dem Serum 10 konnte durch Säurebehandlung der Thrombozyten erfolgreich reduziert werden (**Abb. 20**). Als positive Kontrolle wurde der monoklonale Antikörper w6/32 gegen HLA-Klasse I-Antigene eingesetzt. Hier lässt sich eine komplette Hemmung der Phagozytose durch eine Säurebehandlung erkennen (**Abb. 21**).

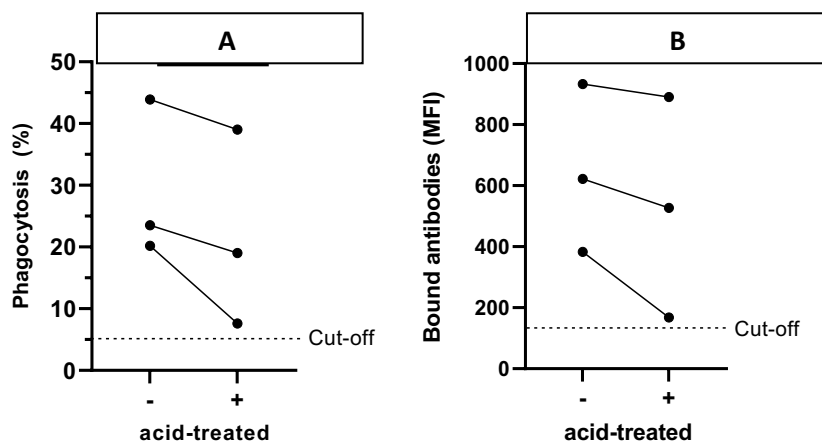


Abb. 20 Induktion der Phagozytose opsonierter Thrombozyten durch Serum 10 im Vergleich zur Antikörperbindung vor und nach Säurebehandlung der Thrombozyten.

Darstellung der Phagozytoserate opsonierter Thrombozyten (A) und der Menge thrombozytär gebundener Antikörper (B) (MFI, mean fluorescence intensity) nach Opsonierung mit dem Serum 10 vor (-) und nach (+) Säurebehandlung (n=3). Phagozytoserate: Anteil pHrodo-positiver Monozyten nach Ingestion pHrodo gefärbter Thrombozyten in %.

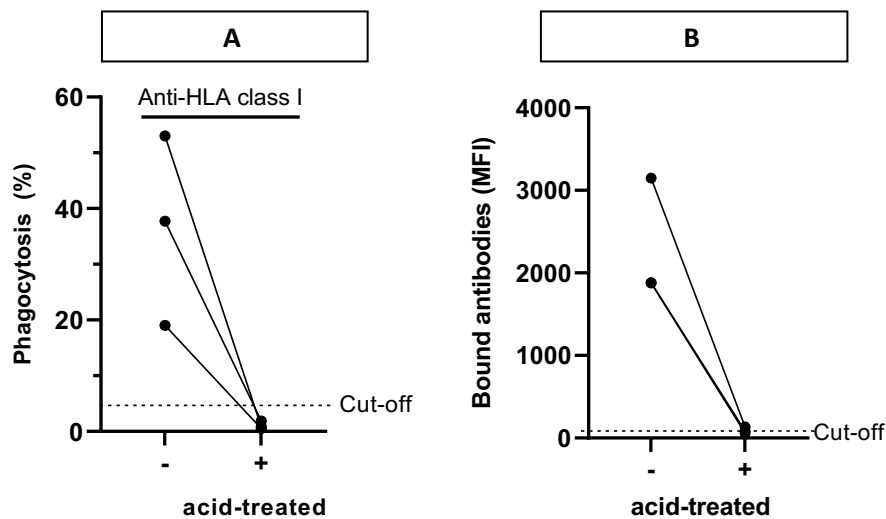


Abb. 21 Induktion der Phagozytose opsonierter Thrombozyten durch den monoklonalen Anti-HLA-Klasse I-Antikörper w6/32 im Vergleich zur Antikörperbindung vor und nach Säurebehandlung der Thrombozyten

Darstellung der Phagozytoserate opsonierter Thrombozyten (A) und der Menge thrombozytär gebundener Antikörper (B) (MFI, mean fluorescence intensity) nach Opsonierung mit dem monoklonalen Anti-HLA-Klasse I-Antikörper w6/32 vor (-) und nach (+) Säurebehandlung ($n \geq 2$). Phagozytoserate: Anteil pHrodo-positiver Monozyten nach Ingestion pHrodo-gefärbter Thrombozyten in %.

3.4. Antikörper gegen $\alpha\beta 3$ induzieren keine Phagozytose von Thrombozyten

Das HPA-1a-Antigen liegt auf der $\beta 3$ -Integrin-Kette, die mit der αv - und der αIIb -Integrinkette ein Heterodimer bilden kann. Daher wurde die Fähigkeit von Anti- $\alpha\beta 3$ - und Anti- $\beta 3$ -Antikörpern, eine Phagozytose von Thrombozyten zu induzieren, verglichen. Es werden hierzu einerseits monoklonale Antikörper (Anti- $\beta 3$: Klon AP3; Anti- $\alpha\beta 3$: Klon 23C6) und andererseits das Serum einer Mutter, deren Kind eine ICH infolge einer Anti-HPA-1a-induzierten FNAIT erlitt, getestet. Vor der Verwendung des kindlichen Serums wurden die Anti- $\beta 3$ -Antikörper mit $c\beta 3$ absorbiert; nach Absorption sollten nur komplexspezifische, mit $\alpha\beta 3$ -reaktive Antikörper verbleiben. Erwartungsgemäß zeigte sich bei der Verwendung des monoklonalen Anti- $\beta 3$ -Antikörpers AP3 und des Anti-HPA-Standards eine spezifische Induktion der Phagozytose. Polyklonale und monoklonale Anti- $\alpha\beta 3$ -Antikörper induzierten in dem vorliegenden Testsystem keine Phagozytose (**Abb. 22 und Abb. 23**).

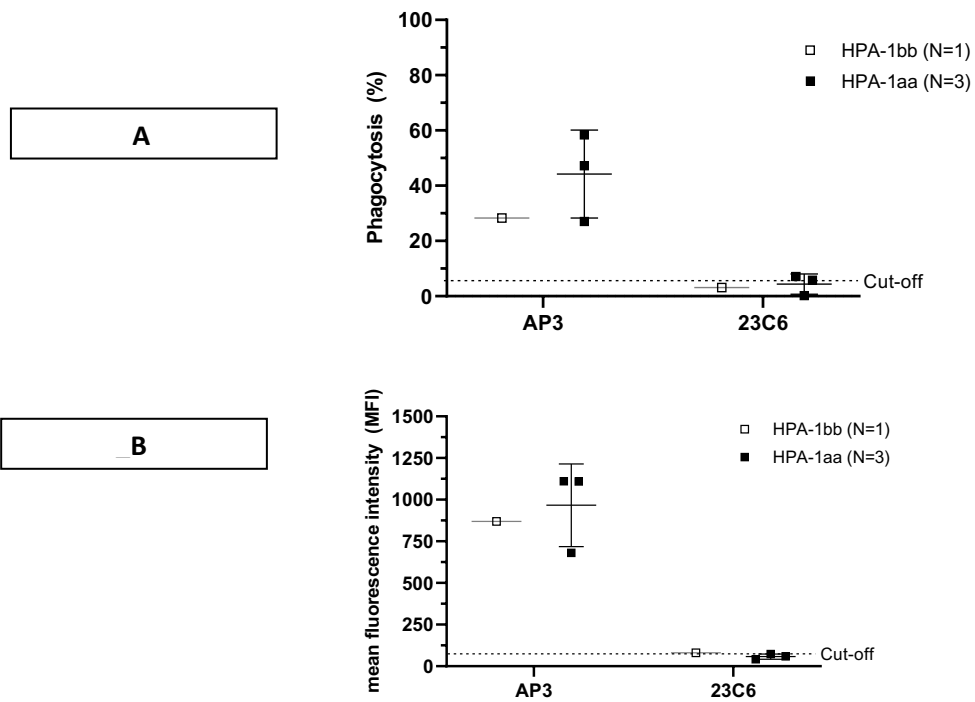


Abb. 22 Induktion der Phagozytose opsonierter Thrombozyten durch Anti- β 3-Antikörper und Anti- α β 3-Antikörper im Vergleich zur Antikörperbindung.

Darstellung der Phagozytoserate opsonierter Thrombozyten (A) sowie der Menge thrombozytär gebundener Antikörper (B) (MFI, mean fluorescence intensity) nach Opsonierung mit monoklonalen Antikörpern gegen β 3 (AP3) und α β 3 (23C6). Die Untersuchung wurde mit HPA-1aa (n=3) und -1bb Thrombozyten (n=1) durchgeführt. Phagozytoserate: Anteil pHrodo-positiver Monozyten nach Ingestion pHrodo gefärbter Thrombozyten in %.

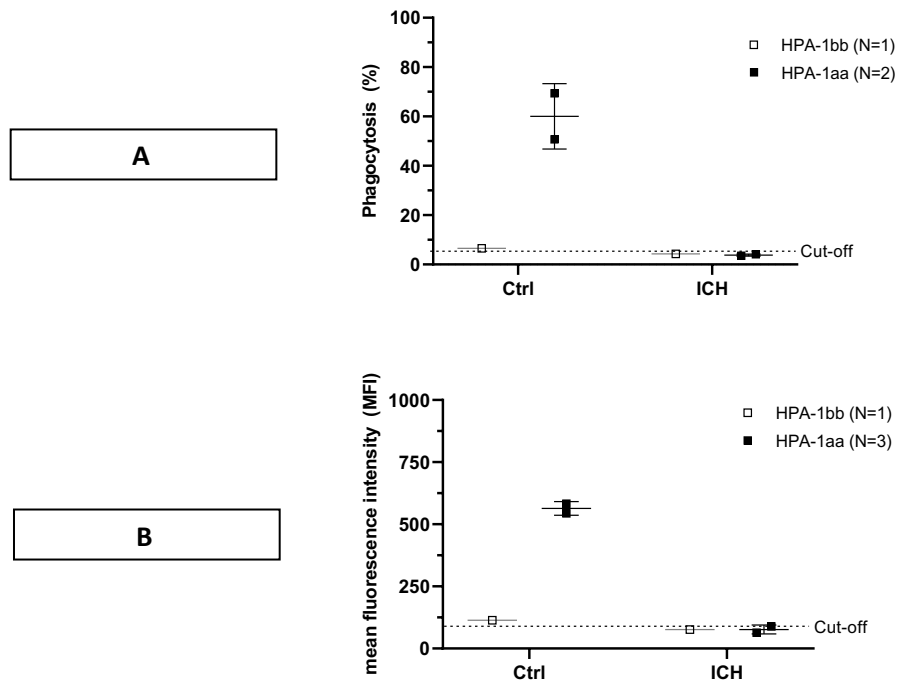


Abb. 23 Induktion der Phagozytose opsonierter Thrombozyten durch ein Anti-HPA-1a-Serum nach Absorption mit $\alpha\beta 3$ im Vergleich zur Antikörperbindung.

Darstellung der Phagozytoserate opsonierter Thrombozyten (A) sowie der thrombozytär gebundenen Antikörper (B) (MFI, mean fluorescence intensity) nach Opsonierung mit einem Anti-HPA-1a-Serum von einem Patienten mit intrakranieller Hämorrhagie (ICH) nach Absorption mit $\alpha\beta 3$. Das Serum sollte nach Absorption nur komplexspezifische Anti- $\alpha\beta 3$ -Antikörper enthalten. Ctrl, Polyklonaler Anti-HPA-1a-Standard. Phagozytoserate: Anteil pHrodo-positiver Monozyten nach Ingestion pHrodo gefärbter Thrombozyten in %. Die Untersuchung wurde mit HPA-1aa (n=3) und -1bb Thrombozyten (n=1) durchgeführt.

3.5. Typ-I- und Typ-II-Antikörper induzieren Phagozytose von Thrombozyten

Zum jetzigen Zeitpunkt unterscheidet man zwei verschiedene Typen von Anti-HPA-1a-Antikörpern, Typ I und Typ II. Der Typ-I Anti-HPA-1a-Antikörper (als Vertreter: SZ21) reagiert ausschließlich mit dem HPA-1a-Epitop auf der polymorphen PSI-Domäne. Der Typ-II Anti-HPA-1a-Antikörper (als Vertreter: 26.4 und B2G1) benötigt für seine Bindung nicht nur die PSI-, sondern auch die benachbarte EGF-1-Domäne der $\beta 3$ -Untereinheit.

Es wurden die drei unterschiedlichen Antikörper in aufsteigender Konzentration von 0.1 bis 10 $\mu\text{g/ml}$ getestet. Deutlich wurde, dass sowohl Typ-I- als auch Typ-II-Antikörper in der Lage sind eine Phagozytose der Thrombozyten zu induzieren. Interessanterweise konnte SZ21 in hoher Konzentration auch die Phagozytose von HPA-1bb-Thrombozyten induzieren. 26.4 und B2G1 reagierten im Gegensatz dazu trotz hoher Konzentration allelspezifisch (**Abb. 24**).

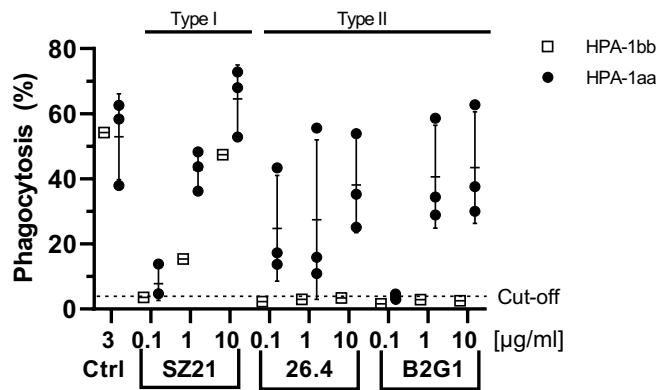


Abb. 24 Induktion der Phagozytose opsonierter Thrombozyten durch unterschiedliche Anti-HPA-1a-Subtypen

Darstellung der Phagozytoserate opsonierter Thrombozyten nach Opsonierung mit Anti-HPA-1a-Subtypspezifischen monoklonalen Antikörpern. Phagozytoserate: Anteil pHrodo-positiver Monozyten nach Ingestion pHrodo-gefärbter Thrombozyten in %. Die Untersuchung wurde mit HPA-1aa (n=3) und -1bb Thrombozyten (n=1) durchgeführt. 26.4 (human IgG1), B2G1 (human IgG1), and B2G1 delta nab (human IgG1), SZ21 (mouse IgG1).

3.6. Modifizierte Antikörper induzieren keine Phagozytose von Thrombozyten

Für die Interaktion des Fc-Teils von IgG-Antikörpern mit Fc-Rezeptoren auf Phagozyten ist die N-Glykosylierung am Asparagin 297 des Antikörpermoleküls entscheidend. Daher wurde die Induktion der Phagozytose nach Opsonierung von Thrombozyten mit deglykosylierten monoklonalen und polyklonalen Antikörpern, dem modifizierten Antikörper B2G1 delta nab, sowie deren Isotypkontrollen untersucht. Die erfolgreiche Deglykosylierung der Antikörper sowie deren Isotypkontrollen wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung mit einer Silberfärbung und einem *Lens culinaris Agglutinin* (LCA)-Blot nachgewiesen. Nach der Deglykosylierung des N-Glykans vom Fc-Teil der schweren Kette (deg-IgG (H)) läuft die schwere Kette etwas schneller als deren native schwere Kette (IgG (H)) (Abb.25).

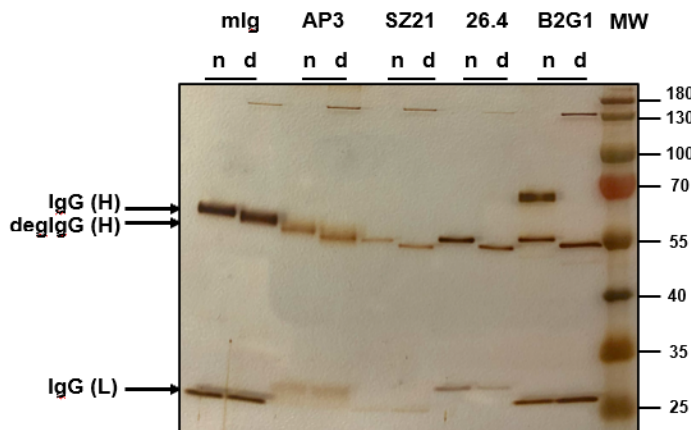


Abb. 25 Exemplarische Darstellung der Deglykosierung monoklonaler Antikörper mit SDS-PAGE und Silberfärbung

Dargestellt sind unterschiedliche native (n) und deglykosylierte (d) monoklonale Antikörper im silbergefärbten Gel. Die Antikörper wurden unter reduzierenden Bedingungen in eine leichte (L) und schwere (H) Kette aufgetrennt. MW, molecular weight. Deg, deglykosyliert.

Darüber hinaus konnte nach *Westernblotting* mit *Lens-culinaris-Agglutinin* (LCA) keine Bande bei den deglykosylierten Antikörpern nachgewiesen werden (**Abb. 26**). Sowohl das Silbergel als auch das *LCA-Blotting* zeigten, dass die Deglykosylierung erfolgreich war (**Abb. 25** und **Abb. 26**).

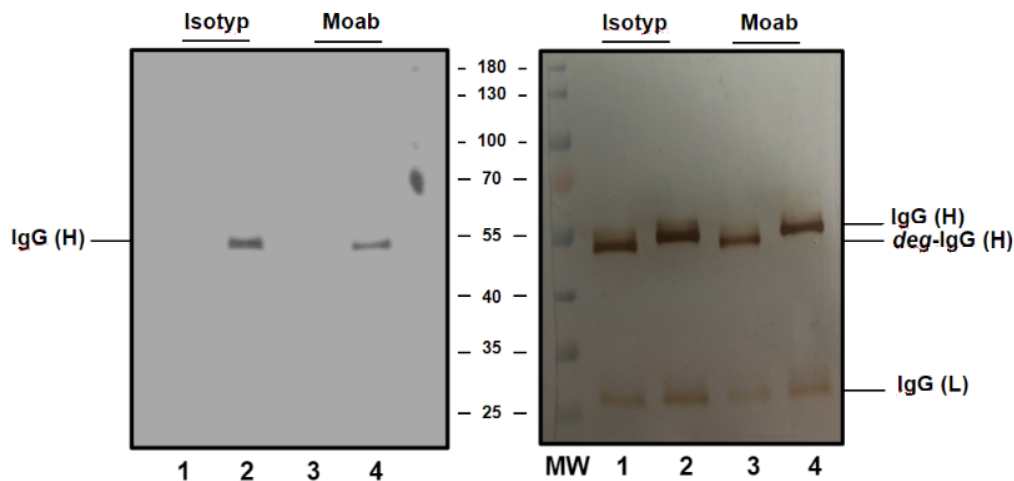


Abb. 26 Exemplarische Darstellung der Deglykosylierung mit *Lens Culinaris Agglutinin* (LCA)- Blot und Silberfärbung

Abbildung der deglykosylierten (Spalte 1 und 3) und nativen (Spalte 2 und 4) Antikörper (Moab), die durch 7,5% SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen analysiert wurden. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran wurden das verbliebene N-Glykan unter Verwendung des Biotin-Avidin-/Streptavidin-Systems mit *Lens-culinaris-Agglutinin* (LCA) nachgewiesen. MW, molecular weight.

Im Einklang mit derzeitigen wissenschaftlichen Erkenntnissen konnte demonstriert werden, dass nach Abspaltung des N-Glykans am Fc-Teil des Antikörpers alle Antikörper signifikant weniger Phagozytose auslösen (**Abb. 27 und Abb. 28**). Als Isotypkontrolle wurden deglykosylierte monoklonale Antikörper und deglykosylierte AB-Seren mitgeführt. Auch der modifizierte Antikörper B2G1 delta nab ließ eine deutlich geringere Phagozytoserate als dessen nativer Antikörper erkennen (**Abb. 28**).

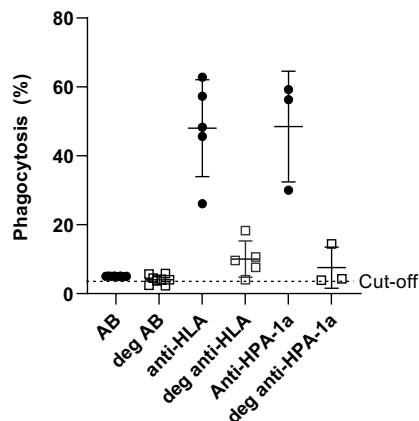


Abb. 27 Induktion der Phagozytose opsonierter Thrombozyten durch native und deglykosylierte polyklonale Antikörper

Darstellung der Phagozytoserate opsonierter Thrombozyten nach Opsonierung mit unterschiedlichen nativen und deglykosylierten Antikörpern. Deg, deglykosyliert. Phagozytoserate: Anteil pHrodo-positiver Monozyten nach Ingestion pHrodo gefärbter Thrombozyten in %. Die Untersuchung wurde mit HPA-1aa ($n \geq 3$) und -1bb Thrombozyten ($n \geq 3$) durchgeführt.

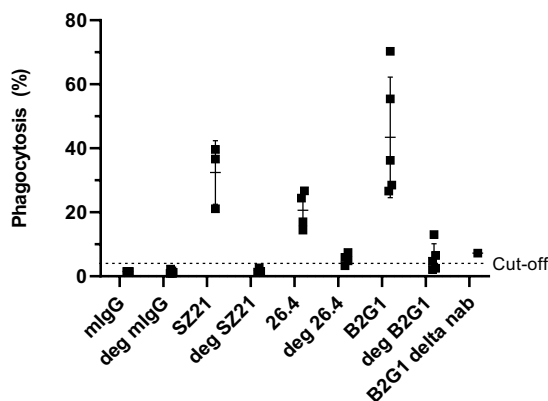


Abb. 28 Induktion der Phagozytose opsonierter Thrombozyten durch native und deglykosylierte monoklonalen Antikörper sowie durch einen genetisch modifizierten Antikörper

Darstellung der Phagozytoserate opsonierter Thrombozyten nach Opsonierung mit unterschiedlichen monoklonalen nativen Antikörpern, deren deglykosylierter Form sowie eines genetisch modifizierten monoklonalen Antikörpers (B2G1 delta nab). Deg, deglykosyliert. Phagozytoserate: Anteil pHrodo-positiver Monozyten nach Ingestion pHrodo gefärbter Thrombozyten in %. Die Untersuchung wurde mit HPA-1aa ($n \geq 3$) und -1bb Thrombozyten ($n=1$) durchgeführt.

3.7. Funktionslose, modifizierte Antikörper können die Phagozytose der Thrombozyten durch native Anti-HPA-Antikörper hemmen

Ferner wurde untersucht, ob funktionslose deglykosylierte und modifizierte Antikörper in der Lage sind, die Phagozytoserate der mit nativen Anti-HPA-1a-Antikörpern beladenen Thrombozyten zu reduzieren.

Zu diesem Zweck wurde die sechsfache Menge an deglykosylierten sowie modifizierten Antikörpern eingesetzt. Es erfolgte zunächst eine Inkubation der Thrombozyten mit den deglykosylierten Antikörpern. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurden die nativen Antikörper hinzugeführt. Die Phagozytose wird, wie weiter oben beschrieben, nach Protokoll gemessen (siehe Kapitel 2.2.2., S.22-24).

Sichtbar wurde, dass die durch monoklonale Anti-HPA-1a-Antikörper induzierte Phagozytoserate mit der sechsfachen Menge an deglykosylierten oder modifizierten Antikörpern signifikant reduziert werden konnte (**Abb. 29**). Unter diesen Versuchsbedingungen war es nicht möglich, eine komplette Hemmung der Phagozytose zu erreichen.

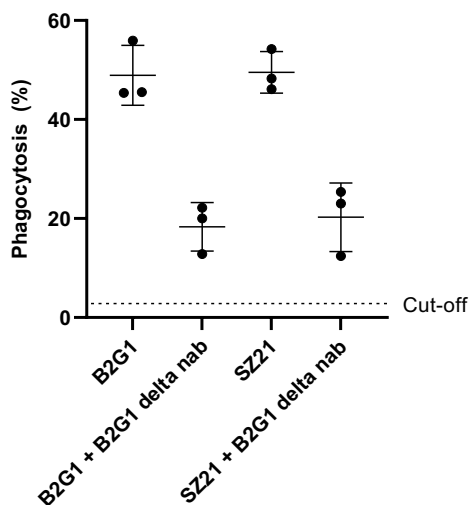


Abb. 29 Hemmung der durch monoklonale Antikörper induzierten Phagozytose opsonierter Thrombozyten durch einen genetisch modifizierten funktionslosen Antikörper

Hemmung der durch monoklonale Anti-HPA-1a-Antikörper (B2G1 und SZ21, 5 µg/ml) induzierten Phagozytose opsonierter Thrombozyten durch den genetisch modifizierten Antikörper B2G1 delta nab (30 µg/ml). Phagozytoserate: Anteil pHrodo-positiver Monozyten nach Ingestion pHrodo gefärbter Thrombozyten in %. Die Untersuchung wurde mit HPA-1aa (n=3) durchgeführt.

Ferner wurde die gleiche Menge an deglykosylierten Antikörpern eingesetzt, um die durch polyklonalen Anti-HPA-1a-Standard induzierte Phagozytose zu hemmen. Bei der Hemmung mit deglykosyliertem SZ21 ($p=0,453$, *), deglykosyliertem 26.4 ($p=0,0184$, *) und deglykosyliertem B2G1 ($p=0,0433$, *) zeigte sich eine signifikante Hemmung (**Abb. 30**). Eine gleichzeitige Hemmung mit deglykosyliertem SZ21 und 26.4 schien keine signifikante Hemmung der Phagozytose hervorzurufen ($p=0,1054$, ns).

Es ist festzuhalten, dass sich die Phagozytose der Thrombozyten nach Opsonierung mit polyklonalen Antikörpern im Vergleich zu monoklonalen Antikörpern deutlich weniger stark hemmen ließ.

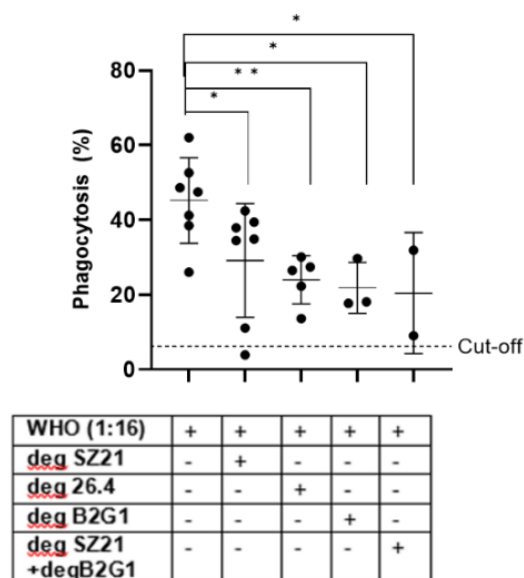


Abb. 30 Hemmung der durch polyklonale Anti-HPA-1a-Antikörper induzierten Phagozytose opsonierter Thrombozyten durch deglykosylierte Antikörper

Hemmung der durch polyklonale Anti-HPA-1a-Antikörper (WHO, WHO Anti-HPA-1a-Standard) induzierten Phagozytose opsonierter Thrombozyten durch deglykosylierte Antikörper. Phagozytoserate: Anteil pHrodo-positiver Monozyten nach Ingestion pHrodo gefärbter Thrombozyten in %. Die Untersuchung wurde mit HPA-1aa Thrombozyten ($n \geq 2$) durchgeführt. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Deg, deglykosyliert.

4

Diskussion

In der Diagnostik der FNAIT steht bisher kein nicht-invasives Verfahren zur Verfügung, mit dem der Schweregrad der FNAIT sowie das Auftreten von Blutungskomplikationen abgeschätzt werden kann (Sachs, 2020). Es wurde untersucht, inwieweit die entwickelte WHOPPA Methode ein wertvolles Mittel in der Diagnostik der FNAIT sowie der Vorhersage des Schweregrades sein könnte.

4.1. Weiterentwicklung und methodische Beurteilung des WHOPPAs

WHOPPA ist eine Weiterentwicklung des von Takahashi et al. (2017) entwickelten *flow cytometric based-monocyte phagocytosis assay* (FMPA). Hier wurde die Antikörper-vermittelte Phagozytose von Thrombozyten durch adhärenente Monozyten mit Hilfe eines pH-sensitiven Farbstoffs durchflusszytometrisch erfasst (Takahashi et al., 2017).

Um die Methode besser an *in vivo*-Bedingungen anzupassen und damit ggf. besser zu standardisieren, wurde die Phagozytose von opsonierten Thrombozyten in Vollblutsuspension durchgeführt, statt mit auf Zellkulturplatten adhärenenten Monozyten (Takahashi et al., 2017). Diese Modifikation erleichterte die Einstellung eines konstanten Verhältnisses von einem Monozyten zur Phagozytose von neunhundert Thrombozyten.

Neben der verbesserten Standardisierung der Methode diene diese Modifikation auch der Annäherung der Testbedingungen an die physiologischen Verhältnisse (siehe **Abb. 5**). Ferner konnte durch die Untersuchung im Vollblut geprüft werden, ob neutrophile Granulozyten ebenfalls opsonierte Thrombozyten phagozytieren können. Im Rahmen dieser Arbeit konnte, im Gegensatz zu früheren Beobachtungen (Kapur et al., 2014) keine Phagozytose von antikörperbeladenen Thrombozyten durch neutrophile Granulozyten nachgewiesen werden. Wohingegen neutrophile Granulozyten pHrodo-markierte *Escherichia coli* Bakterien im gleichen Testansatz stark phagozytierten (siehe **Abb. 12 und 13**). Monozyten dagegen phagozytierten sowohl pHrodo markierte *Escherichia coli* Bakterien als auch pHrodo-markierte und opsonierte Thrombozyten (siehe **Abb. 11 und 13**). Mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die Thrombozyten erst fluoreszieren, wenn sie von den Monozyten internalisiert wurden (siehe **Abb. 7**).

Es ist unter Umständen möglich, dass in geringem Maße auch defekte - nicht opsonierte - Fragmente der Thrombozyten von Monozyten internalisiert wurden und somit ein falsch hohes Ergebnis erzeugt haben könnten. Dagegen sprechen die konzentrationsabhängige Phagozytose der Thrombozyten, sowie die fehlende Phagozytose von HPA-1bb-Thrombozyten nach Opsonierung mit Anti-HPA-1a-Standard unterschiedlicher Verdünnungen (siehe **Abb. 9**). Nach Opsonierung mit dem Anti-HPA-1a-Standard wurden lediglich die HPA-1aa-Thrombozyten phagozytiert, wohingegen die HPA-1bb-Thrombozyten nicht phagozytiert wurden (siehe **Abb. 9**). Man kann also davon ausgehen, dass der WHOPPA bei Verwendung von Anti-HPA-1a-Seren antigenspezifisch die Phagozytose von HPA-1aa-Thrombozyten erfasst. Zusammenfassend gesagt, ist WHOPPA ein Testsystem, welches spezifisch die Monozyten-vermittelte Phagozytose von antikörperbeladenen Thrombozyten im Vollblut detektiert.

Um die Sensitivität des WHOPPA zu prüfen, wurden der HPA-1a-Standard sowie die gepoolten Anti-HLA-Klasse I-Seren von unterschiedlichen polytransfunden Patienten in unterschiedlichen Verdünnungsstufen untersucht. Zusätzlich wurde durchflusszytometrisch die Menge an thrombozytär gebundenen Antikörpern gemessen. Sowohl der HPA-1a-Standard als auch die gepoolten Anti-HLA-Klasse I-Seren waren in der Lage, eine konzentrationsabhängige Phagozytose zu induzieren.

Anti-HPA-1a-Antikörper waren bis zu einer Konzentration von 1:32, Anti-HLA-Klasse I-Poolserum bis zu einer Konzentration von 1:256 in der Lage, eine signifikante

Phagozytose auszulösen (siehe **Abb. 9** und **Abb. 14**). Darüber hinaus wurde eine starke Korrelation der Phagozytose mit der Menge an thrombozytär gebundenen Antikörpern gefunden (siehe **Abb. 10** und **Abb. 15**).

Zusammenfassend kann man daher festhalten, dass WHOPPA eine sensitive und spezifische Methode zur Untersuchung der Fc γ -vermittelte Thrombozyteneliminierung durch mononukleäre Zellen darstellt.

Auffällig ist, dass, obwohl die Antikörperbindung von Anti-HPA-1a-Antikörpern bis zu einer Verdünnung von 1:256 messbar war, die Anti-HPA-1a-Antikörper in dieser Konzentration keine Phagozytose mehr zeigten (siehe **Abb. 9**). Im Gegensatz dazu zeigten Anti-HLA-Klasse I-Antikörper, trotz fehlenden signifikanten Nachweises der Antikörperbindung, eine signifikante Phagozytose bis zu einer Verdünnung von 1:512 (siehe **Abb. 14**). Das lässt vermuten, dass im Vergleich zu Anti-HLA-Klasse I-Antikörpern, eine größere Menge an Anti-HPA-1a-Antikörpern zur Phagozytose von Plättchen benötigt werden. Diesbezüglich wurde gezeigt, dass einige Subtypen von Anti-HLA-Klasse I-Antikörpern die Fähigkeit besitzen, über Quervernetzung von HLA-Klasse I-Molekülen und Fc γ RIIa, Thrombozyten zu aktivieren und hierüber die Phagozytose zu verstärken (Rijkers et al., 2018).

4.2. Der Einfluss von HLA-Antikörpern

Ausgehend von den Ergebnissen mit gepoolten Anti-HLA-Klasse I-Seren, kann man annehmen, dass die Anti-HLA-Antikörper, welche häufig in maternalen Seren vorhanden sind (Masson et al., 2013), ebenfalls zur Phagozytose der kindlichen Thrombozyten sowie der Thrombozyten in dem *in vitro*-Test beitragen könnten.

Dem entgegen steht, dass in klinischen Studien kein Zusammenhang zwischen dem zusätzlichen Vorhandensein von Anti-HLA-Klasse I-Antikörpern und der Anzahl der neonatalen Blutplättchen, dem Geburtsgewicht sowie dem Auftreten von intrakraniellen Blutungen nachgewiesen werden konnte (Sachs et al., 2020).

Es stellt sich die Frage, inwiefern Anti-HLA-Klasse I-Antikörper aus maternalen Seren das WHOPPA Testsystem stören und zu falsch positiven Ergebnissen führen könnten. Um dieser Frage nachzugehen, wurden zwei Kohorten von FNAIT Fällen mit nachgewiesenen Anti-HPA-1a-Antikörpern untersucht. Die erste Kohorte enthielt, neben Anti-HPA-1a-Antikörpern, keine zusätzlichen Anti-HLA-Klasse I-Antikörper. Wohingegen in der zweiten Gruppe überdies Anti-HLA-Klasse I-Antikörper

nachgewiesen wurden (siehe **Tabelle 7**). Die Ergebnisse der Untersuchung veranschaulichen, dass sechs von acht Seren, trotz Anwesenheit von Anti-HLA-Klasse I-Antikörpern, eine allelspezifische Phagozytose durch Anti-HPA-1a-Antikörper zeigten (siehe **Abb. 17**). Dass die HLA-Antikörper in maternalen Seren in einzelnen Fällen einen Einfluss auf das Testergebnis mit dem WHOPPA haben könnten, ist jedoch wahrscheinlich. Bei der Untersuchung der Seren wurden randomisierte Thrombozyten eingesetzt; der HLA-Phänotyp der Thrombozytenspender repräsentierte somit nur zufällig die paternalen HLA-Klasse I-Antigene, gegen die die maternalen Anti-HLA-Klasse I-Antikörper gerichtet waren. Es ist daher möglich, dass die Anti-HLA-Klasse I-Antikörper nicht mit den Testthrombozyten reagierten, da die korrespondierenden HLA-Klasse I-Antigene fehlten und daher keine Phagozytose von HPA-1bb-Thrombozyten auslösten. Man kann jedoch festhalten, dass Serum 10 und 13 durchaus eine Phagozytose von HPA-1bb-Thrombozyten hervorgerufen haben. Dies lässt vermuten, dass hier ein korrespondierendes HLA-Klasse I-Antigen vorhanden war. Darüber hinaus konnte die Phagozytose durch Serum 10 nach Abspaltung der HLA-Antigene der Thrombozyten mittels Säurebehandlung reduziert werden (siehe **Abb. 20**). Säurebehandlung führt zur Dissoziation der β 2-Moleküle von der schweren Kette der HLA-Klasse I-Antigene, so dass Anti-HLA-Klasse I-Antikörper nicht mehr binden können. Die Wirksamkeit der Säurebehandlung konnte durch die Untersuchung der Phagozytose und der Anzahl gebundener Antikörper nach Opsonierung mit dem monoklonalen Antikörper gegen ein monomorphes Epitop auf HLA-Klasse I-Antigenen (w6/32) gezeigt werden (siehe **Abb. 21**).

Maternale Anti-HLA-Klasse I-Antikörper kommen bei Schwangeren sehr häufig vor, haben jedoch im Rahmen der FNAIT vermutlich keine klinische Bedeutung, da HLA-Klasse I-Antigene auch ubiquitär auf allen kernhaltigen Zellen vorkommen (Sachs et al., 2020). *In vitro* binden Anti-HLA-Klasse I-Antikörper jedoch an Thrombozyten und können Phagozytose induzieren. Dieser Störfaktor könnte bei Nachweis von Anti-HLA-Klasse I-Antikörpern im maternalen Serum durch Säurebehandlung ausgeschaltet werden. Um eine generelle Aussage über den Einfluss von Anti-HLA-Klasse I-Antikörpern in der *in vitro* Untersuchung machen zu können, sollte jedoch der Versuch mit Thrombozyten von Spendern mit inkompatiblen HLA-Antigenen wiederholt werden.

4.3. Phagozytose-Induktion durch Anti-HPA-1a-Antikörper-Subtypen

Studien zeigen, dass bei der FNAIT heterogene Antikörper gegen verschiedene Epitope entstehen können. Die Zusammensetzung der Antikörpersubtypen kann von Fall zu Fall variieren. Dies könnte einer der Gründe für das vielfältige klinische Erscheinungsbild der FNAIT sein (Kroll et al., 2005; Santoso et al., 2016). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit, die Phagozytose-Induktion der unterschiedlichen Anti-HPA-1a-Antikörper-Subtypen experimentell untersucht. Drei Antikörpersubtypen gegen das α IIb β 3- und α v β 3-Integrin werden unterschieden. Typ-I und -II Antikörper reagieren mit dem β 3-Integrin, wobei Typ-I die PSI-Domäne und Typ-II die PSI- im Komplex mit der EGF-1-Domäne erkennt (Thinn et al., 2018; Zhi et al., 2018). Festzuhalten ist, dass beide Subtypen, sowohl Typ-I als auch Typ-II-Antikörper, in der Lage sind, eine allelspezifische Phagozytose von Thrombozyten auslösen (siehe **Abb. 24**).

Der monoklonale Antikörper SZ21, ein Vertreter der Typ-I Antikörper, war in hohen Konzentrationen in der Lage, eine Phagozytose von HPA-1bb-Thrombozyten zu induzieren (siehe **Abb. 24**). Auch die im Rahmen einer Studie gemessene Antikörperbindung des Antikörpers SZ21 mittels Oberflächenplasmonresonanz konnte dies bestätigen. Bakchoul et al. demonstrierten, dass SZ21 in hoher Konzentration immobilisiertes HPA-1b-Antigen binden kann. Die Bindung war jedoch deutlich geringer als die Bindung an das HPA-1a-Antigen (Bakchoul et al., 2013).

Der Typ-III Antikörper hingegen reagiert im Komplex mit α v β 3-Integrin, welches vorwiegend auf Endothelzellen zu finden ist (Bennett et al., 2009; Santoso et al., 2016). Es gibt Berichte von Fällen, in denen es zur FNAIT mit schwerer Blutungskomplikation gekommen ist, obwohl die Thrombozytenzahl im Referenzbereich lag (Bussel et al., 2010). Santoso et al. berichteten darüber hinaus von einem Zusammenhang zwischen der Bildung von Anti-HPA-1a-Antikörpern gegen den α v β 3-Komplex und dem Auftreten einer ICH des Fetus/Neugeborenen. Das α v β 3-Integrin ist, neben dem überwiegenden Vorkommen auf Endothelzellen, auch auf Thrombozyten zu finden (Santoso et al., 2016). Es stellt sich daher die Frage, ob α v β 3-Antikörper eine Phagozytose von Thrombozyten induzieren können. Sowohl der monoklonale Anti- α v β 3-Antikörper 23C6 als auch Anti- α v β 3-Antikörper aus dem Serum einer Patientin mit FNAIT, deren Neugeborenes eine ICH erlitt, zeigten in dem WHOPPA keine Phagozytose von Thrombozyten (siehe **Abb. 22** und **23**). Dies deutet darauf hin, dass Anti- α v β 3-Antikörper keine Rolle

bei der Phagozytose von Thrombozyten spielen. Dennoch gibt es Hinweise, dass das Vorhandensein der Anti- $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Antikörper zu einem vermehrten Blutungsrisiko des Kindes bei FNAIT führt. So zeigten Santoso et al. 2016, dass die Antikörper einen Einfluss auf die endotheliale Apoptose und somit auf die kindliche Angiogenese haben (Santoso et al., 2016). Man kann festhalten, dass die Thrombozytenzahl allein kein sicherer Indikator für das Auftreten von Hirnblutungen bei der FNAIT ist.

Eine umfangreiche retrospektive Studie zeigt jedoch, dass eine fetale/neonatale ICH infolge einer maternalen Immunisierung gegen HPA-1a in der Regel mit sehr niedrigen Thrombozytenzahlen beim Fetus/Neugeborenen assoziiert ist (Vos et al., 2021). Eine nicht-invasive Bestimmung der Phagozytose-induzierenden Wirkung mütterlicher Antikörper könnte daher für die Therapiesteuerung bei Schwangeren mit Immunisierung gegen HPA-1a nützlich sein. Zusätzlich könnte eine Bestimmung der Antikörper-Subtypen zur Bestimmung des Blutungsrisikos dienlich sein.

4.4. Modifizierte Antikörper - ein therapeutischer Ansatz der FNAIT

In den letzten Jahren gibt es vermehrt Bemühungen eine neue und zielgerichtete fetale Blutungsprophylaxe für das Management von Schwangeren mit FNAIT zu finden. Die standardisierte fetale Blutungsprophylaxe mit IVIG erfolgt *off-label*, ist nicht in allen Fällen wirksam, und ist mit unerwünschten Arzneimittelwirkungen bei der Mutter assoziiert. Darüber hinaus ist die Therapie mit IVIG sehr kostenintensiv (Guo et al., 2018). Als eine viel diskutierte therapeutische Option hat sich in jüngster Zeit eine spezifische Blockade mütterlicher Antikörper mit modifizierten Antikörpern aufgezeigt. Modifizierte Antikörper, die nicht mit den klassischen Fc-Rezeptoren interagieren, haben die gleiche Spezifität wie der pathogene Antikörper. Beide Antikörper konkurrieren daher um dieselbe Bindungsstelle. Die Antikörper behalten trotz der Modifikation die Fähigkeit, über den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) in die kindliche Zirkulation transportiert zu werden, wodurch sie zur vorgeburtlichen Therapie geeignet wären (Bakchoul et al., 2013; Ghevaert et al., 2013; Nimmerjahn & Ravetch, 2008).

Im Zuge dieser Arbeit wurde geprüft, inwiefern die modifizierten Antikörper in der Lage sind, in dem *in vitro* Testsystem „WHOPPA“ eine Phagozytose der Thrombozyten zu induzieren. Als modifizierte Antikörper wurden mit Endo S deglykosylierte monoklonale und polyklonale Anti-HPA-1a- und Anti-HLA-I-Antikörper sowie der rekombinant

modifizierte Antikörper B2G1 delta nab verwendet. Es konnte nachgewiesen werden, dass alle modifizierten Antikörper signifikant weniger Phagozytose induzierten als der korrespondierende native Antikörper (siehe **Abb. 27** und **28**).

Anzumerken ist, dass sich die Handhabung der deglykosylierten Antikörper als schwierig gestaltete. Die Deglykosylierung der Antikörper war nicht dauerhaft stabil. Nach zwei bis drei Tagen wurde die Beobachtung gemacht, dass die deglykosylierten Antikörper eine höhere Phagozytoserate induzierten als an den ersten Tagen nach Deglykosylierung. Ein Grund dafür könnten die im Ansatz noch enthaltenen abgespalteten Zucker sowie das im Ansatz verbliebene Enzym sein. Die im Ansatz verbliebenen Zucker könnten im Laufe der Zeit die Deglykosylierung rückgängig gemacht oder anderweitig gestört haben. Da die verwendeten Antikörpermengen sehr gering waren, war das Problem bei zu hohem Antikörperverlust durch Dialyse mit PBS nicht zu beheben. Eine Deglykosylierung macht IgG-Antikörper anfälliger für Aggregation, Entfaltung und deren Abbau (Alsenaidy et al., 2013). Auch dies kann ein weiterer Grund für die schwierige Handhabung der Antikörper sein. Die Deglykosylierung wurde daher täglich frisch vorgenommen. Deutlich einfacher in der Handhabung und stabiler in der Haltbarkeit war dagegen der rekombinant hergestellte modifizierte Antikörper B2G1 delta nab. Für zukünftige experimentelle und therapeutische Ansätze sollte daher aufgrund der leichteren Handhabung erwogen werden, genetisch modifizierte Antikörper zu bevorzugen.

Um einen möglichen therapeutischen Ansatz der modifizierten Antikörper mit der WHOPPA Methode zu prüfen, wurde untersucht, ob die modifizierten Antikörper befähigt sind, die durch native Antikörper ausgelöste Phagozytose *in vitro* zu hemmen. Hierfür wurden Versuche zur Hemmung der Phagozytose, ausgelöst durch monoklonale Anti-HPA-1a-Antikörper oder Anti-HPA-1a-Standard, durchgeführt. Die Untersuchungen zeigten, dass die modifizierten Antikörper *in vitro* durchaus befähigt waren, die durch ihre nativen Gegenspieler ausgelöste Phagozytose signifikant zu hemmen. Die stärkste Hemmung konnte mit dem rekombinant modifizierten Antikörper B2G1 bei der Phagozytose, ausgelöst durch den monoklonalen Antikörper B2G1, beobachtet werden. Es konnte hier eine mehr als fünfzigprozentige Reduzierung des Ausgangswertes erreicht werden. Es gelang jedoch in keinem der oben genannten Versuche eine komplette Hemmung der Phagozytose hervorzurufen (siehe **Abb. 29**).

Erwähnt werden sollte, dass die modifizierten Antikörper in einem Verhältnis von sechs deglykosylierten zu einem nativen Antikörper eingesetzt wurden. Trotz sechsfacher Menge an modifizierten Antikörpern konnte die Phagozytose nicht komplett gehemmt werden. Die Glykosylierung kann die Bioaktivität und molekulare Stabilität der Antikörper beeinflussen (Wei et al., 2017). Am häufigsten wird die Rolle der Deglykosylierung im Zusammenhang mit der in dieser Arbeit untersuchten Fc-Effektor-Funktion und der IgG-Rezeptoren beschrieben. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Glykosylierung darüber hinaus eine weitere Bedeutung für die Bindungskapazität, Verteilung und Stabilität der Antikörper hat (Boune et al., 2020). Studien zeigten, dass die Deglykosylierung von Antikörpern diese thermisch instabiler macht. Die CH₂-Domäne ist bei nativen Antikörpern durch die Glykankomponente maskiert. Durch die Deglykosylierung kommt es zur Destabilisierung der CH₂-Domäne, was die Immunglobuline anfälliger für die Aggregation, Entfaltung und den Abbau machen (Alsenaidy et al., 2013; Kayser et al., 2011). Man kann daher die Hypothese aufstellen, dass es durch die große Menge an modifizierten Antikörpern zu einer vermehrten Aggregation der Immunglobuline kommen könnte. Dies könnte ein Grund für die fehlende komplette Hemmung der Phagozytose *in vitro* sein. Fraglich ist auch, inwiefern die Modifizierung der Antikörper die Bindungsstärke zum Epitop verändert und somit zu einem Vorteil der nativen Antikörper in der Bindung der Epitope beiträgt. Hier sollten weitere Studien angeschlossen werden, um die Affinität zum Antigen von modifizierten und nativen Antikörpern zu vergleichen. Für zukünftige Untersuchungen wäre in Betracht zu ziehen, die Antikörper in Hinblick auf ihre Affinität zu modifizieren, um damit eine stärkere Affinität zum Antigen hervorzurufen (Edwards et al., 2022).

Die Proben wurden im Versuchsablauf zunächst allein mit den modifizierten Antikörpern inkubiert. Erst nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurden die nativen Antikörper hinzugegeben. Man könnte argumentieren, dass dies nicht den *in vivo* Bedingungen entspricht.

Ferner wurde geprüft, ob die unterschiedlichen deglykosylierten Antikörper auch in der Lage sind, polyklonale Seren wie den Anti-HPA-1a-Standard, zu hemmen. Es lässt sich feststellen, dass es möglich ist, mit deglykosyliertem Antikörper 26.4, deglykosyliertem Antikörper B2G1 sowie deglykosyliertem Antikörper SZ21 eine signifikante Hemmung der Phagozytose hervorzurufen (siehe **Abb. 30**). Die *in vitro* Untersuchungen zeigten jedoch auch, dass die Hemmung der Phagozytose die durch polyklonalen Seren induziert

war, geringer ausfiel als die Hemmung nach Opsonierung mit den monoklonalen Antikörpern (siehe **Abb. 29**). Der Anti-HPA-1a-Standard besteht aus gepoolten maternalen Seren von sechs Spenderinnen, die gegen HPA-1a immunisiert waren. Daher kann vermutet werden, dass die Variabilität der durch die Antikörper registrierten Epitope sehr hoch ist. Hierdurch besteht eine größere Varianz an möglichen Bindungsstellen und somit hat der Anti-HPA-1a-Standard mehr Optionen, eine Phagozytose auszulösen. Möglicherweise ist dies einer der Gründe für die deutlich geringere Hemmung polyklonaler Antikörper durch die modifizierten Antikörper. Durch die gleichzeitige Verwendung zweier unterschiedlicher deglykosylierter Anti-HPA-1a-Antikörper (Typ I: degSZ21; Typ II: deg26.4), konnte keine stärkere Hemmung hervorgerufen werden (siehe **Abb. 30**). Grund dafür kann die zu hohe Konzentration der Antikörper sein. Es könnte möglich sein, dass die modifizierten Antikörper sich sterisch behindern und nicht mehr optimal binden können.

Die Arbeitsgruppe um Herrn Bakchoul konnte in einer *in vivo* Studie mit Mäusen zeigen, dass die Bindung der mütterlichen Anti-HPA-1a-Antikörper an infundierte humane Thrombozyten nach Injektion des deglykosylierten Antikörpers SZ21 deutlich gehemmt werden konnte. Die Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass die Phagozytose der Thrombozyten durch Makrophagen *in vivo* verringert werden konnte (Bakchoul et al., 2013). Auch eine kürzlich veröffentlichte Studie demonstriert in einem Mausmodell, dass bei der häufig in Asien und Afrika auftretenden CD36-vermittelten FNAIT die Sterblichkeit durch Injektion von deglykosylierten Anti-CD36-Antikörper deutlich (von 40% auf 2% Sterblichkeit) reduziert werden konnte (Xu, Chen et al., 2021). Daher stellt sich die Frage, inwieweit die *in vitro* Ergebnisse im WHOPPA Rückschluss auf die Wirksamkeit blockierender Antikörper *in vivo* geben kann. Es war zwar möglich, mit den modifizierten Antikörpern die *in vitro* Phagozytose durch monoklonale Antikörper stark und durch polyklonale Seren weniger stark zu hemmen, jedoch war es nicht möglich, eine komplette Hemmung zu induzieren. Es ist denkbar, dass weitere *in vivo* Faktoren, die mit dem *in vitro* Test nicht nachgebildet werden können, eine Rolle spielen.

4.5. Probleme und klinische Relevanz des WHOPPA

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass WHOPPA als funktioneller Test ein guter Indikator für die Fähigkeit der untersuchten Antikörper ist, eine *ex vivo* Phagozytose von opsonierten Thrombozyten zu messen. In den in der Routinediagnostik etablierten Tests, wie MAIPA, wird allein die Menge der gebildeten Antikörper bestimmt, ohne deren tatsächliche Fähigkeit eine Phagozytose auszulösen, zu untersuchen. Es stellt sich jedoch die Frage, inwieweit von dem *in vitro* Assay auf die *in vivo* Bedingungen geschlossen werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Blutproben von erwachsenen Spenderinnen und Spendern verwendet. Es ist möglich, dass die Phagozytoseaktivität der fetalen oder neonatalen Makrophagen sich durchaus von denen der Erwachsenen unterscheidet. Um dies zu prüfen, sollten Versuche mit Nabelschnurblut angeschlossen werden. Die Phagozytoseaktivität der fetalen oder neonatalen Monozyten sollte mit der Phagozytoseaktivität der Monozyten Erwachsener verglichen werden. Zudem wurden die Versuche vorwiegend mit homozygoten HPA-1aa Spenderinnen und Spendern durchgeführt. Tatsächlich haben jedoch alle Kinder von HPA-1a-negativen Müttern mit FNAIT den Genotyp HPA-1ab. Um ein besseres Abbild der Realität zu schaffen, sollten in den nachfolgenden Studien bevorzugt heterozygote Thrombozytenspenderinnen und Spender verwendet werden.

Um WHOPPA in der Routine verwenden zu können, sind noch weitere Anstrengungen notwendig, um die Methode zu optimieren. Momentan benötigt die Durchführung der Methode, je nach Menge der Versuchsansätze, vier bis fünf Stunden. Um die Gesamtzeit der Versuche zu verringern, könnten einzelne Inkubationsschritte, wie die einstündige Phagozytosezeit, verkürzt werden. Trotz der Standardisierung der Methode durch ein festes Verhältnis von einem Monozyten zu neunhundert Thrombozyten, ist aufgefallen, dass die Werte, vor allem bei Verwendung von monoklonalen Antikörpern, spenderabhängig zu schwanken scheinen. Dies könnte an der unterschiedlichen Phagozytoseaktivität der Monozyten einzelner Spenderinnen und Spender liegen. Mit der Einführung einer monozytären Zelllinie könnte dieses Problem behoben und der Test weiter standardisiert werden.

Die Methode zeigte eine sehr gute Korrelation zwischen der Menge der gebundenen HPA-1a-Antikörper und der Stärke der *in vitro* Phagozytose von Thrombozyten (siehe

Abb. 10). Es stellt sich daher die Frage, ob die Ergebnisse der Phagozytoserate im WHOPPA mit der tatsächlichen Schwere der Thrombozytopenie des Kindes einhergehen. Ein systematisches Review konnte demonstrieren, dass die Menge der gebildeten Antikörper, gemessen mit MAIPA, kein ausreichender Parameter ist, um die Schwere der FNAIT und die Wahrscheinlichkeit der gefürchteten ICH vorherzusagen (Ghevaert, Campbell, Stafford et al., 2007; Kjaer et al., 2019). Die in dieser Arbeit präsentierten Untersuchungen zeigen, dass die Korrelation der Phagozytoserate mit der Menge an thrombozytär gebundenen Antikörper mittels WHOPPA deutlich stärker ist, als die Korrelation mit den OD-Werten des MAIPA (siehe **Abb. 18 und Abb. 19**). Die schwächere Korrelation mit den Ergebnissen des MAIPAs suggeriert, dass zur Vorhersage der Schwere einer FNAIT die WHOPPA Methode besser geeignet sein könnte. Die OD-Werte des MAIPA sind Ergebnis einer enzymatischen Endpunktreaktion und daher für die Quantifizierung der Antikörperbindung ggf. weniger geeignet. Aufgrund der starken Korrelation der Phagozytoserate im WHOPPA mit der durchflusszytometrischen Quantifizierung der thrombozytär gebundenen Antikörper, könnte man jedoch auch argumentieren, dass ein geeigneter Bindungstest für die Vorhersage der Thrombozytopenie *in vivo* reichen könnte. Um die Vorhersage der fetalen Thrombozytopenie bei FNAIT mithilfe der WHOPPA Methode zu evaluieren, sollten weitere klinische Studien angeschlossen werden. Die durch mütterliche Antikörper induzierte *in vitro*-Phagozytoserate sollte mit den tatsächlichen Thrombozytenzahlen der betroffenen Kinder korreliert werden. Dies kann einen Rückschluss darüber geben, inwiefern die *in vitro* gemessenen Phagozytoseraten mit der Phagozytose *in vivo* korreliert. Bei Nachweis einer starken Korrelation könnte davon ausgegangen werden, dass die WHOPPA Methode einen hohen diagnostischen Wert für die Vorhersage der Thrombozytopenie hat.

5

Zusammenfassung

Ziel dieser Doktorarbeit war es, einen *in vitro*-Phagozytostest für Anti-HPA-1a opsonierte Thrombozyten zu entwickeln und dessen Fähigkeit zur Quantifizierung der Thrombozytenphagozytose *ex vivo* zu überprüfen. Ferner sollten alternative therapeutische Ansätze durch kompetitive inhibitorische Antikörper untersucht werden.

WHOPPA ist eine spezifische und sensitive Methode, um die Phagozytose von antikörperbeladenen Thrombozyten durch Monozyten zu detektieren. Der WHOPPA-Test ermöglicht die Detektion der tatsächlichen Fähigkeit von Antikörpern eine Phagozytose von Thrombozyten zu induzieren. Im Gegensatz zu Anti- $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Antikörpern waren Anti-HPA-Antikörper vom Typ I und Typ II in der Lage, eine Phagozytose von Thrombozyten zu induzieren. Ferner führten mütterliche Anti-HLA-Klasse I Antikörper *ex vivo* zu einer Phagozytose von opsonierten Thrombozyten. Diese Reaktion konnte durch vorherige Säurebehandlung der Thrombozyten eliminiert werden. Kompetitive inhibitorische, funktionslose Anti-HPA-1a-Antikörper konnten *in vitro* keine Phagozytose auslösen. Unter Verwendung des WHOPPA-Tests konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der Phagozytose durch deglykosylierte oder modifizierte Antikörper erreicht werden konnte. Eine vollständige Hemmung der Phagozytose konnte nicht erzielt werden. Angesichts der Instabilität von deglykosylierten Antikörpern sollten in späteren Studien rekombinante, modifizierte Antikörper, z.B. mit fehlender N-Glykosylierung, eingesetzt werden.

Im Hinblick auf die routinemäßige Anwendung von WHOPPA in der Diagnostik und Prävention der FNAIT sollten jedoch weitere Modifikationen vorgenommen werden, um eine weitere Standardisierung der Methode zu erreichen und diese zeitlich effizienter zu gestalten. Bei hoher Korrelation zwischen der Menge gebundener Antikörper im

Bindungstest mit der *ex vivo* Phagozytoserate kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Schwere der Thrombozytopenie des Fetus mit Hilfe des WHOPPAs abgeschätzt werden kann. Die alleinige Anwendung des WHOPPAs zur prädiktiven Einschätzung schwerwiegender fetaler Komplikationen bei FNAIT erscheint jedoch unzureichend, da der heterogene Pathomechanismus der FNAIT nicht ausschließlich auf der Phagozytose von Thrombozyten beruht. WHOPPA könnte hier jedoch als nützliches Instrument dienen, zukünftige Forschung hinsichtlich der zugrundeliegenden Pathomechanismen der FNAIT sowie potenzieller therapeutischer Ansätze voranzutreiben.

6

Summary

The aim of this doctoral thesis was to develop an *in vitro* phagocytosis test for anti-HPA-1a opsonized platelets and to test its ability to quantify platelet phagocytosis *ex vivo*. Furthermore, alternative therapeutic approaches using competitive inhibitory antibodies were investigated.

WHOPPA is a specific and sensitive method to detect phagocytosis of antibody-loaded platelets by monocytes. The WHOPPA test enables the detection of the actual ability of antibodies to induce phagocytosis of platelets. In contrast to anti- $\alpha v \beta 3$ antibodies, type I and type II anti-HPA antibodies were able to induce phagocytosis of platelets. In addition, maternal anti-HLA class I antibodies induced phagocytosis of opsonized platelets *ex vivo*. This reaction could be eliminated by acid treatment.

Competitive inhibitory anti-HPA-1a antibodies were unable to induce phagocytosis *in vitro*. Using the WHOPPA test, it was demonstrated that inhibition of phagocytosis can be obtained by deglycosylated or modified antibodies. A complete inhibition of phagocytosis could not be achieved. In view of the instability of independently deglycosylated antibodies, recombinantly modified antibodies should increasingly be used in later studies.

However, with regard to the routine use of WHOPPA in the diagnosis and prevention of FNAIT, further modifications should be made in order to achieve further standardization of the method and to make it more efficient in terms of time. Since there is a strong correlation between the amount of loaded antibodies and the *ex vivo* phagocytosis rate, it can be theorized that the severity of the child's thrombocytopenia can be estimated using the WHOPPA. However, the sole use of WHOPPA for predictive assessment of severe complications in FNAIT seems insufficient, as the heterogeneous pathomechanism of FNAIT is not exclusively based on platelet phagocytosis. However, WHOPPA could serve as a useful tool to enhance future studies and research into the underlying mechanisms and potential therapeutic approaches.

7

Veröffentlichungen und Preise

- Vortrag auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie 2021 „Functional Analysis of Different Anti-HPA-1a Antibody Types by Whole Blood Phagocytosis Assay“
- Vortrag in der Plenarsitzung der Jahrestagung 2021 der AABB (Association for the Advancement of Blood & Biotherapies, Bethesda, USA) „Functional Analysis of Different Anti-HPA-1a Antibody Types By Whole Blood Phagocytosis Assay“
- AABB Outstanding Abstract Award for Trainees in the Medical/Graduate Student category
- Publikation “*In vitro* analysis of anti-HPA-1a dependent platelet phagocytosis and its inhibition using a new whole blood phagocytosis assay (WHOPPA)”, Front Immunol., 21. November 2023, Autoinflammatory Disorders Volume 14

8

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schematische Abbildung der Plazenta.....	4
Abb. 2 Schematische Darstellung der HPA-tragenden Integrine und der unterschiedlichen Antikörper	7
Abb. 3 mögliche klinische Präsentation einer FNAIT.....	10
Abb. 4 Schematische Darstellung der Struktur eines nativen Immunglobulins (IgG)....	15
Abb. 5 vereinfachtes <i>Flow-Chart</i> der WHOPPA Methode.....	24
Abb. 6: Gatingstrategie der phagozytierenden Monozyten.....	29
Abb. 7 mikroskopische Analyse der Phagozytose von Thrombozyten durch Monozyten	29
Abb. 8 <i>Overlay</i> Histogramm der gebundenen Antikörper.....	30
Abb. 9 Antigen-spezifische Induktion der Phagozytose und antigen-spezifische Bindung des Anti-HPA-1a-Standards.....	34
Abb. 10 Korrelation der Phagozytoserate mit der Menge gebundener Anti-HPA-1a-Antikörper.....	34
Abb. 11 Phagozytose der Thrombozyten durch Monozyten nach Opsonierung mit AB-Serum (Control) im Vergleich zu Anti-HPA-1a-Standard (Anti-HPA-1a).....	35
Abb. 12 Phagozytose von Thrombozyten durch Granulozyten nach Opsonierung mit AB-Serum (Control) im Vergleich zu Anti-HPA-1a-Standard (Anti-HPA-1a).....	36

Abb. 13 Phagozytose von pHrodo-markierten Escherichia coli (E.coli) bei 0° C (A) und 37° C (B).....37

Abb. 14 Induktion der Phagozytose opsonierter Thrombozyten durch einen gepoolten Anti-HLA-Standard im Vergleich zur Antikörperbindung..... 38

Abb. 15 Korrelation der Phagozytoserate mit der Menge gebundener Anti-HLA-Klasse I Antikörper.....38

Abb. 16 Induktion der Phagozytose opsonierter Thrombozyten durch Anti-HPA-1a-Seren ohne zusätzliche Anti-HLA-Klasse I-Antikörper im Vergleich zu Antikörperbindung40

Abb. 17 Induktion der Phagozytose opsonierter Thrombozyten durch Anti-HPA-1a-Seren mit zusätzliche Anti-HLA-Klasse I-Antikörper im Vergleich zu Antikörper.....40

Abb. 18 Korrelation der Phagozytoserate mit der Menge gebundener Antikörper und den OD-Werten im MAIPA. Anti-HPA-1a-Seren ohne HLA-Klasse I-Antikörper.....41

Abb. 19 Korrelation der Phagozytoserate mit der Menge gebundener Antikörper und den OD-Werten im MAIPA. Anti-HPA-1a-Seren mit HLA-Klasse I-Antikörper.....41

Abb. 20 Induktion der Phagozytose opsonierter Thrombozyten durch Serum 10 im Vergleich zur Antikörperbindung vor und nach Säurebindung der Thrombozyten.....42

Abb. 21 Induktion der Phagozytose opsonierter Thrombozyten durch den monoklonalen Anti-HLA-Klasse I-Antikörper w6/32 im Vergleich zur Antikörperbindung vor und nach Säurebehandlung der Thrombozyten.....43

Abb. 22 Induktion der Phagozytose opsonierter Thrombozyten durch Anti-β3-Antikörper und Anti-avβ3-Antikörper im Vergleich zur Antikörperbindung.....44

Abb. 23 Induktion der Phagozytose opsonierter Thrombozyten durch ein Anti.HPA-1a-Serum nach Absorption mit cβ3 im Vergleich zur Antikörperbindung.....45

Abb. 24 Induktion der Phagozytose opsonierter Thrombozyten durch unterschiedliche Anti-HPA-1a-Subtypen.....46

Abb. 25 Exemplarische Darstellung der Deglykosylierung monoklonaler Antikörper mit SDS-PAGE und Silberfärbung.....47

Abb. 26 Exemplarische Darstellung der Deglykosylierung mit *Lens Cullinaris*
Agglutinin (LCA)-Blot und Silberfärbung.....47

Abb. 27 Induktion der Phagozytose opsonierter Thrombozyten durch native und
deglykosylierte polyklonale Antikörper.....48

Abb. 28 Induktion der Phagozytose opsonierter Thrombozyten durch native und
deglykosylierte monoklonale Antikörper sowie durch einen genetisch modifizierten
Antikörper.....48

Abb. 29 Hemmung der durch monoklonale Antikörper induzierten Phagozytose
opsonierter Thrombozyten durch einen genetisch modifizierten funktionslosen
Antikörper.....49

Abb. 30 Hemmung der durch polyklonale Anti-HPA-1a-Antikörper induzierten
Phagozytose opsonierter Thrombozyten durch deglykosylierte Antikörper.....50

9

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation ausgewählter HPA-Antigene.....	6
Tabelle 2: Geräte.....	18
Tabelle 3: Software.....	19
Tabelle 4: Verbrauchsmaterial.....	19
Tabelle 5: Chemikalien.....	19
Tabelle 6: Monoklonale Antikörper.....	21
Tabelle 7: Seren mit Ergebnissen aus dem Routinelabor.....	23
Tabelle 8: Kits.....	24

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Gregor Bein möchte ich mich für dieses spannende und vielseitige Forschungsthemas sowie die hervorragende wissenschaftlichen Zusammenarbeit bedanken. Ferner bedanke ich mich für die Schaffung bester Bedingungen zur Durchführung dieser Arbeit. Vielen Dank die Vielzahl wissenschaftlicher Anregungen, das entgegengebrachte Vertrauen und das aufbauende Lob.

Herrn Dr. Santoso danke ich für die kompromisslose Unterstützung und seinen zu jeder Zeit motivierenden und fachkundigen Rat beim Bewältigen meines Promotionsprojektes. Er hat mir stets als begeisterter Wissenschaftler und als ein wunderbares Vorbild gegolten. Für die Möglichkeit der Präsentation unserer Ergebnisse auf unterschiedlichsten Kongressen, danke ich beiden, Prof. Dr. Bein und Dr. Santoso. Dies war ein guter Einblick in die Welt der Wissenschaft und für mich persönlich eine gute Erfahrung und hervorragende Übung.

Mein ganz besonderer Dank geht an Gaby Michel und Silke Schmidt. Beide haben mich während meiner gesamten Zeit als Doktorandin zu jeder Zeit unterstützt und motiviert. Ich möchte mich bei ihnen für die unzähligen Stunden der Zusammenarbeit und Geduld bei der Einarbeitung bedanken. Ich konnte sie jederzeit um Hilfe bitten und mit jeder Frage zu ihnen kommen. Ihre aufmunternden Worte haben mich immer aufgebaut.

Auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die technische Hilfe und die immer freundliche Zusammenarbeit.

Ebenfalls möchte ich mich von Herzen bei meinen Eltern für die bedingungslose Unterstützung in allen Lebenslagen danken. Meiner Schwester Rebecca, meinen kleinen Neffen Luca, Mattis und Finn sowie meinem Lebenspartner Bennie möchte ich für die motivierenden Worte und daumendrückenden Unterstützungen danken. Danke, dass ihr immer an mich glaubt und jederzeit für mich da seid.

Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis

- Aderem, A. & Underhill, D. M. (1999). Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*, 17, 593–623.
- Alsenaidy, M. A., Kim, J. H., Majumdar, R., Weis, D. D., Joshi, S. B., Tolbert, T. J., Middaugh, C. R. & Volkin, D. B. (2013). High-throughput biophysical analysis and data visualization of conformational stability of an IgG1 monoclonal antibody after deglycosylation. *J Pharm Sci*, 102(11), 3942–3956.
- Bakchoul, T., Greinacher, A., Sachs, U. J., Krautwurst, A., Renz, H., Harb, H., Bein, G., Newman, P. J. & Santoso, S. (2013). Inhibition of HPA-1a alloantibody-mediated platelet destruction by a deglycosylated anti-HPA-1a monoclonal antibody in mice: toward targeted treatment of fetal-alloimmune thrombocytopenia. *Blood*, 122(3), 321–327.
- Baker, J. M., Shehata, N., Bussel, J., Murphy, M. F., Greinacher, A., Bakchoul, T., Massey, E., Lieberman, L., Landry, D., Tanael, S., Arnold, D. M., Baidya, S., Bertrand, G., Kjaer, M., Kaplan, C., Kjeldsen-Kragh, J., Oepkes, D., Savoia, H., Ryan, G. & Hume, H. (2019). Postnatal intervention for the treatment of FNAIT: a systematic review. *J Perinatol*, 39(10), 1329–1339.
- Bakhtiar, R. (2012). Therapeutic recombinant monoclonal antibodies. *J Chem Educ*, 89(12), 1537–1542.
- Bennett, J. S., Berger, B. W. & Billings, P. C. (2009). The structure and function of platelet integrins. *J Thromb Haemost*, 7 Suppl 1, 200–205.
- Bennett, J. S. (2005). Structure and function of the platelet integrin alphaIIb beta3. *J Clin Invest*, 115(12), 3363–3369.
- Bessos, H., Turner, M. & Urbaniak, S. J. (2005). Is there a relationship between anti-HPA-1a concentration and severity of neonatal alloimmune thrombocytopenia? *Immunohematology*, 21(3), 102–109.
- Bonacossa, I. A. & Jocelyn, L. J. (1996). Alloimmune thrombocytopenia of the newborn: neurodevelopmental sequelae. *Am J Perinatol*, 13(4), 211–215.
- Boune, S., Hu, P., Epstein, A. L. & Khawli, L. A. (2020). Principles of N-linked glycosylation variations of IgG-based therapeutics: pharmacokinetic and functional considerations. *Antibodies (Basel)*, 9(2), 22.
- Burke, B. & Lewis, C. E. (Hrsg.). (2002). *The macrophage*. Oxford University Press.
- Burrows RF, K. J. G. (1993). Fetal thrombocytopenia and its relation to maternal thrombocytopenia. *N Engl J Med*, 329(20), 1463–1466.
- Bussel, J. B., Zabusky, M. R., Berkowitz, R. L. & McFarland, J. G. (1997). Fetal alloimmune thrombocytopenia. *N Engl J Med*, 337(1), 22–26.
- Bussel, J. B., Berkowitz, R. L., Hung, C., Kolb, E. A., Wissert, M., Primiani, A., Tsaur, F. W. & Macfarland, J. G. (2010). Intracranial hemorrhage in alloimmune thrombocytopenia:

- stratified management to prevent recurrence in the subsequent affected fetus. *Am J Obstet Gynecol*, 203(2), 135.e1-14.
- Campbell, K., Rishi, K., Howkins, G., Gilby, D., Mushens, R., Ghevaert, C., Metcalfe, P., Ouwehand, W. H. & Lucas, G. (2007). A modified rapid monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigen assay for the detection of human platelet antigen (HPA) antibodies: a multicentre evaluation. *Vox sang*, 93(4), 289–297.
- Coller, B. S., Cheresch, D. A., Asch, E. & Seligsohn, U. (1991). Platelet vitronectin receptor expression differentiates Iraqi-Jewish from Arab patients with Glanzmann thrombasthenia in Israel. *Blood*, 77(1), 75–83.
- Cremer, M., Sallmon, H., Kling, P. J., Bühner, C. & Dame, C. (2016). Thrombocytopenia and platelet transfusion in the neonate. *Semin fetal neonatal med*, 21(1), S. 10–18.
- Curtis, B. R. & McFarland, J. G. (2013). Human platelet antigens. *Vox sang*, 106(2), 93–102.
- Curtis, B. R. (2015). Recent progress in understanding the pathogenesis of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Br J Haematol*, 171(5), 671–682.
- Dame, C. (2018). Neonatale Thrombozytopenie. *Monatsschr Kinderheilkd*, 166, 959–967.
- Daniel, G. W., Menis, M., Sridhar, G., Scott, D., Wallace, A. E., Ovanesov, M. V., Golding, B., Anderson, S. A., Epstein, J., Martin, D., Ball, R. & Izurieta, H. S. (2012). Immune globulins and thrombotic adverse events as recorded in a large administrative database in 2008 through 2010. *Transfusion*, 52(10), 2113–2121.
- Dardik, R. & Salomon, O. (2021). Maternal anti-HPA-1a antibodies increase endothelial cell apoptosis and permeability. *J Vasc Res*, 58(5), 321–329.
- Davoren, A., McParland, P., Barnes, C. A. & Murphy, W. G. (2002). Neonatal alloimmune thrombocytopenia in the Irish population: a discrepancy between observed and expected cases. *J Clin Pathol*, 55(4), 289–292.
- Edwards, E., Livanos, M., Krueger, A., Dell, A., Haslam, S. M., Mark Smales, C. & Bracewell, D. G. (2022). Strategies to control therapeutic antibody glycosylation during bioprocessing: Synthesis and separation. *Biotechnol Bioeng*, 119(6), 1343–1358.
- Erdreich-Epstein, A., Tran, L. B., Cox, O. T., Huang, E. Y., Laug, W. E., Shimada, H. & Millard, M. (2005). Endothelial apoptosis induced by inhibition of integrins alphavbeta3 and alphavbeta5 involves ceramide metabolic pathways. *Blood*, 105(11), 4353–4361.
- European Commission Research and Innovation DG. Final Report Summary - PROFNAIT. (2022, 23. Februar). *Development of a prophylactic treatment for the prevention of fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia (FNAIT)*.
<https://cordis.europa.eu/project/id/305986>
- Feige, M. J., Nath, S., Catharino, S. R., Weinfurter, D., Steinbacher, S. & Buchner, J. (2009). Structure of the murine unglycosylated IgG1 Fc fragment. *J Mol Biol*, 391(3), 599–608.
- Ghevaert, C., Campbell, K., Stafford, P., Metcalfe, P., Casbard, A., Smith, G. A., Allen, D., Ranasinghe, E., Williamson, L. M. & Ouwehand, W. H. (2007). HPA-1a antibody potency and bioactivity do not predict severity of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*, 47(7), 1296–1305.
- Ghevaert, C., Campbell, K., Walton, J., Smith, G. A., Allen, D., Williamson, L. M., Ouwehand, W. H. & Ranasinghe, E. (2007). Management and outcome of 200 cases of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*, 47(5), 901–910.
- Ghevaert, C., Herbert, N., Hawkins, L., Grehan, N., Cookson, P., Garner, S. F., Crisp-Hihn, A., Lloyd-Evans, P., Evans, A., Balan, K., Ouwehand, W. H., Armour, K. L., Clark, M. R. & Williamson, L. M. (2013). Recombinant HPA-1a antibody therapy for treatment of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia: proof of principle in human volunteers. *Blood*, 122(3), 313–320.

- Grozovsky, R., Hoffmeister, K. M. & Falet, H. (2010). Novel clearance mechanisms of platelets. *Curr Opin Hematol*, 17(6), 585–589.
- Gruel, Y., Boizard, B., Daffos, F., Forestier, F., Caen, J. & Wautier, J. L. (1986). Determination of platelet antigens and glycoproteins in the human fetus. *Blood*, 68(2), 488–492.
- Guo, Y., Tian, X., Wang, X. & Xiao, Z. (2018). Adverse effects of immunoglobulin therapy. *Front Immunol*, 9, 1299.
- Holzwarth, S. T., Bayat, B., Zhu, J., Phuangtham, R., Fischer, L., Boeckelmann, D., Röder, L., Berghöfer, H., Schmidt, S., Bein, G. & Santoso, S. (2020). Naturally occurring point mutation Cys460Trp located in the I-EGF1 domain of integrin $\beta 3$ alters the binding of some anti-HPA-1a antibodies. *Transfusion*, 60(9), 2097–2107.
- Jin, J. C., Lakkaraja, M. M., Ferd, P., Manotas, K., Gabor, J., Wissert, M., Berkowitz, R. L., McFarland, J. G. & Bussel, J. B. (2019). Maternal sensitization occurs before delivery in severe cases of fetal alloimmune thrombocytopenia. *Am J Hematol*, 94(8), E213-E215.
- Kamphuis, M. M., Paridaans, N., Porcelijn, L., Haas, M. de, van der Schoot, C. E., Brand, A., Bonsel, G. J. & Oepkes, D. (2010). Screening in pregnancy for fetal or neonatal alloimmune thrombocytopenia: systematic review. *BJOG*, 117(11), 1335–1343.
- Kamphuis, M. M., Paridaans, N. P., Porcelijn, L., Lopriore, E. & Oepkes, D. (2014). Incidence and consequences of neonatal alloimmune thrombocytopenia: a systematic review. *Pediatrics*, 133(4), 715–721.
- Kao, K. J., Scornik, J. C. & McQueen, C. F. (1990). Evaluation of individual specificities of class I HLA on platelets by a newly developed monoclonal antibody. *Hum Immunol*, 27(4), 285–297.
- Kapur, R., Kustiawan, I., Vestrheim, A., Koeleman, C. A.M., Visser, R., Einarsdottir, H. K., Porcelijn, L., Jackson, D., Kumpel, B., am Deelder, Blank, D., Skogen, B., Killie, M. K., Michaelsen, T. E., Haas, M. de, Rispens, T., van der Schoot, C. E., Wuhrer, M. & Vidarsson, G. (2014). A prominent lack of IgG1-Fc fucosylation of platelet alloantibodies in pregnancy. *Blood*, 123(4), 471–480.
- Kayser, V., Chennamsetty, N., Voynov, V., Forrer, K., Helk, B. & Trout, B. L. (2011). Glycosylation influences on the aggregation propensity of therapeutic monoclonal antibodies. *Biotechnol J*, 6(1), 38–44.
- Kiefel, V., Santoso, S., Weisheit, M. & Müller-Eckhardt, C. (1987). Monoclonal antibody--specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood*, 70(6), 1722–1726.
- Kjaer, M., Bertrand, G., Bakchoul, T., Massey, E., Baker, J. M., Lieberman, L., Tanael, S., Geinacher, A., Murphy, M. F., Arnold, D. M., Baidya, S., Bussel, J., Hume, H., Kaplan, C., Oepkes, D., Ryan, G., Savoia, H., Shehata, N. & Kjeldsen-Kragh, J. (2019). Maternal HPA-1a antibody level and its role in predicting the severity of Fetal/Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia: a systematic review. *Vox sang*, 114(1), 79–94.
- Kjeldsen-Kragh, J., Kjaer, K. M., Tomter, G., Golebiowska, E., Randen, I., Hauge, R., Aune, B., Oian, P., Dahl, L. B., Pirhonen, J., Lindeman, R., Husby, H., Haugen, G., Gronn, M., Skogen, B. & Husebekk, A. (2007). A screening and intervention program aimed to reduce mortality and serious morbidity associated with severe neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood*, 110(3), 833–839.
- Kjeldsen-Kragh, J. (2020). Foetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia-A rare, potentially serious and often underdiagnosed bleeding condition. *Transfus Apher Sci*, 59(1), 102703.

- Kjeldsen-Kragh, J. & Ahlen, M. T. (2020). Foetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia - The role of the HLA-DRB3*01:01 allele for HPA-1a-immunisation and foetal/neonatal outcome. *Transfus Apher Sci.*, 59(1), 102707.
- Kjeldsen-Kragh, J., Bein, G. & Tiller, H. (2023). Pregnant women at low risk of having a child with fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia do not require treatment with intravenous immunoglobulin. *J Clin Med*, 12(17), 5492.
- Konkle, B. A. (Hrsg.). (2018). *Disorders of Platelets and Vessel Wall* (20. Aufl.). Harrison's Principles of Internal Medicine.
- Kroll, H., Penke, G. & Santoso, S. (2005). Functional heterogeneity of alloantibodies against the human platelet antigen (HPA)-1a. *Thromb and Haemost*, 94(6), 1224–1229.
- Kumpel, B. M. & Manoussaka, M. S. (2012). Placental immunology and maternal alloimmune responses. *Vox sang*, 102(1), 2–12.
- Kumpel, B. M., Sibley, K., Jackson, D. J., White, G. & Soothill, P. W. (2008). Ultrastructural localization of glycoprotein IIIa (GPIIIa, $\beta 3$ integrin) on placental syncytiotrophoblast microvilli: implications for platelet alloimmunization during pregnancy. *Transfusion*, 48(10), 2077–2086.
- Kuwana, M., Okazaki, Y. & Ikeda, Y. (2009). Splenic macrophages maintain the anti-platelet autoimmune response via uptake of opsonized platelets in patients with immune thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost*, 7(2), 322–329.
- Kuwana, M., Okazaki, Y., Kaburaki, J., Kawakami, Y. & Ikeda, Y. (2002). Spleen is a primary site for activation of platelet-reactive T and B cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. *J Immunol*, 168(7), 3675–3682.
- Leach, J. L., Sedmak, D. D., Osborne, J. M., Rahill, B., Lairmore, M. D. & Anderson, C. L. (1996). Isolation from human placenta of the IgG transporter, FcRn, and localization to the syncytiotrophoblast: implications for maternal-fetal antibody transport. *J Immunol*, 157(8), 3317–3322.
- Liebermann, L., Greinacher, A., Murphy, M. F., Bussel, J., Bakchoul, T., Corke, S., Kjaer, M., Kjeldsen-Kragh, J., Bertrand, G., Oepkes, D., Baker, J. M., Hume, H., Massey, E., Kaplan, C., Arnold, D. M., Baidya, S., Ryan, G., Savoia, H., Landry, D. & Shehata, N. (2019). Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: recommendations for evidence-based practice, an international approach. *Br J Haematol.*, 3(185), 549–562.
- Liu, Z, Bussel, JB, Lakkaraja, M., Ferrer-Marin, F., Ghevaert, C., Feldman, H. A., McFarland, J. G., Chavda, C. & Sola-Visner, M. (2015). Suppression of in vitro megakaryopoiesis by maternal sera containing anti-HPA-1a antibodies. *Blood*, 126(10), 1234–1236.
- Masson, E., Vidal, C., Deschamps, M., Bongain, S., Thevenin, C., Dupont, I., Rietmulher, D., Pouthier, F., Mongaillard, G., Chabod, J., Ferrand, C., Tiberghien, P. & Rebibou, J.-M. (2013). Incidence and risk factors of anti-HLA immunization after pregnancy. *Hum Immunol*, 74(8), 946–951.
- McMillan, R., Longmire, R. L., Tavassoli, M., Armstrong, S. & Yelenosky, R. (1974). In vitro platelet phagocytosis by splenic leukocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*, 290(5), 249–251.
- Metcalfe, P., Watkins, N. A., Ouwehand, W. H., Kaplan, C., Newman, P., Kekomaki, R., Haas, M. de, Aster, R., Shibata, Y., Smith, J., Kiefel, V. & Santoso, S. (2003). Nomenclature of human platelet antigens. *Vox sang*, 85(3), 240–245.
- Morrone, K. (2018). Thrombocytopenia in the Newborn. *NeoReviews*, 19(1), e34-e41.
- Mueller-Eckhardt, C., Grupert, A., Weisheit, M., Mueller-Eckhardt, G., Kiefel, V. & Kroll, H. (1989). 348 Cases of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Lancet*, 1(8634), 363–366.

- Neumüller, J., Tohidast-Akrad, M., Fischer, M. & Mayr, W. R. (1993). Influence of chloroquine or acid treatment of human platelets on the antigenicity of HLA and the 'thrombocyte-specific' glycoproteins Ia/IIa, IIb, and IIb/IIIa. *Vox sang*, 65(3), 223–231.
- Newman, P. J., Derbes, R. S. & Aster, R. H. (1989). The human platelet alloantigens, PlA1 and PlA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest*, 83(5), 1778–1781.
- Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol*, 8(1), 34–47.
- Norris, P. A.A., Segel, G. B., Burack, W. R., Sachs, U. J., Lissenberg-Thunnissen, S. N., Vidarsson, G., Bayat, B., Cserti-Gazdewich, C. M., Callum, J., Lin, Y., Branch, D., Kapur, R., Semple, J. W. & Lazarus, A. H. (2021). FcγRI and FcγRIII on splenic macrophages mediate phagocytosis of anti-glycoprotein IIb/IIIa autoantibody-opsonized platelets in immune thrombocytopenia. *Haematologica*, 106(1), 250–254.
- Overton, T. G., Duncan, K. R., Jolly, M., Letsky, E. & Fisk, N. M. (2002). Serial aggressive platelet transfusion for fetal alloimmune thrombocytopenia: platelet dynamics and perinatal outcome. *Am J Obstet Gynecol*, 186(4), 826–831.
- Pereira, J., Cretney, C. & Aster RH (1988). Variation of class I HLA antigen expression among platelet density cohorts: a possible index of platelet age? *Blood*, 71(2), 516–519.
- Querschnitts-Leitlinie zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten.*
https://www.bundesaerztekammer.de/fileadmin/user_upload/_old-files/downloads/pdf-Ordner/MuE/Querschnitts-Leitlinien_BAEK_zur_Therapie_mit_Blutkomponenten_und_Plasmaderivaten-Gesamtnovelle_2020.pdf
- Radder, C. M., Brand, A. & Kanhai, H. H. H. (2003). Will it ever be possible to balance the risk of intracranial haemorrhage in fetal or neonatal alloimmune thrombocytopenia against the risk of treatment strategies to prevent it? *Vox sang*, 84(4), 318–325.
- Rijkers, M., Saris, A., Heidt, S., Mulder, A., Porcelijn, L., Claas, F. H. J., Bierings, R., Leebeek, F. W. G., Jansen, A. J. G., Vidarsson, G., Voorberg, J. & Haas, M. de (2018). A subset of anti-HLA antibodies induces FcγRIIIa-dependent platelet activation. *Haematologica*, 103(10), 1741–1752.
- Rossi, K. Q., Lehman, K. J. & O'Shaughnessy, R. W. (2016). Effects of antepartum therapy for fetal alloimmune thrombocytopenia on maternal lifestyle. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 29(11), 1783–1788.
- Sachs, U., Bakchoul, T. & Bein, G. (2012). Fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie: Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie. *Transfusionsmedizin*, 2, 77–89.
- Sachs, U. J., Bakchoul, T. & Bein, G. (2014). Fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie: Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie. *Klinikerzt*, 43(1), 18–28.
- Sachs, U. J., Wienzek-Lischka, S., Duong, Y., Qui D, H. W., Cooper, N., Santoso, S., Bayat, B. & Bein, G. (2020). Maternal antibodies against paternal class I human leukocyte antigens are not associated with foetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Br J Haematol.*, 189(4), 751–759.
- Sachs, U. J. (2020). Prospects for risk stratification of anti-HPA-1a alloimmunized pregnant women. *Transfus Apher Sci.*, 59(1), 102709.
- Sachs, U. J., Bedei, I., Wienzek-Lischka, S., Cooper, N., Ehrhardt, H., Axt-Flidner, R. & Bein, G. (2021). Fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie, Teil 2. *Transfusionsmedizin*, 11(02), 127–142.

- Santoso, S., Wihadmadyatami, H., Bakchoul, T., Werth, S., Al-Fakhri, N., Bein, G., Kiefel, V., Zhu, J., Newman, P. J., Bayat, B. & Sachs, U. J. (2016). Antiendothelial $\alpha v\beta 3$ antibodies are a major cause of intracranial bleeding in fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 36(8), 1517–1524.
- Schmock, K. & Perkins, S. L. (2014). Thrombocytopenia: an update. *Int J Lab Hematol.*, 36(3), 269–278.
- Simister, N. E., Story, C. M., Chen, H. L. & Hunt, J. S. (1996). An IgG-transporting Fc receptor expressed in the syncytiotrophoblast of human placenta. *Eur J Immunol*, 26(7), 1527–1531.
- Sola-Visner, M., Saxonhouse, M. A. & Brown, R. E. (2008). Neonatal thrombocytopenia: what we do and don't know. *Early hum Dev*, 84(8), 499–506.
- Sonneveld, M. E., Natunen, S., Sainio, S., Koeleman, C. A. M., Holst, S., Dekkers, G., Koelewijn, J., Partanen, J., van der Schoot, C. E., Wuhrer, M. & Vidarsson, G. (2016). Glycosylation pattern of anti-platelet IgG is stable during pregnancy and predicts clinical outcome in alloimmune thrombocytopenia. *Br J Haematol*, 174(2), 310–320.
- Taaning, E. (2000). HLA antibodies and fetomaternal alloimmune thrombocytopenia: myth or meaningful? *Transfus Med Rev*, 14(3), 275–280.
- Takahashi, D., Fujihara, M., Miyazaki, T., Matsubayashi, K., Sato, S., Azuma, H., Kato, T., Kino, S., Ikeda, H., Takamoto, S., Sato, N. & Torigoe, T. (2017). Flow cytometric quantitation of platelet phagocytosis by monocytes using a pH-sensitive dye, pHrodo-SE. *J Immunol Methods*, 447, 57–64.
- te Pas, A. B., Lopriore, E., van den Akker, E. S. A., Oepkes, D., Kanhai, H. H., Brand, A. & Walther, F. J. (2007). Postnatal management of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: the role of matched platelet transfusion and IVIG. *Eur J Pediatr*, 166(10), 1057–1063.
- Thinn, A. M.M., Wang, Z., Zhou, D., Zhao, Y., Curtis, B. R. & Zhu, J. (2018). Autonomous conformational regulation of $\beta 3$ integrin and the conformation-dependent property of HPA-1a alloantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(39), E9105-E9114.
- Tiller, H., Husebekk, A., Skogen, B., Kjeldsen-Kragh, J. & Kjaer, M. (2016). True risk of fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia in subsequent pregnancies: a prospective observational follow-up study. *BJOG*, 123(5), 738–744.
- Tiller, H., Kamphuis, M. M. & Flodmark, O. (2013). Fetal intracranial haemorrhages caused by fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: an observational cohort study of 43 cases from an international multicentre registry. *BMJ Open*, 3(3), e002490.
- Uhrynowska, M., Maslanka, K. & Zupanska, B. (1997). Neonatal thrombocytopenia: incidence, serological and clinical observations. *Am J Perinatol*, 14(7), 415–418.
- Versiti. (Oktober 2020). *HPA Database*. <https://www.versiti.org/hpa>
- von dem Borne, A. E. & Décary, F. (1990). Working party on platelet serology: nomenclature of platelet-specific antigens. *Vox sang*, 58(2), 176.
- Vos, T. W. de, Winkelhorst, D., Haas, M. de, Lopriore, E. & Oepkes, D. (2020). Epidemiology and management of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfus Apher Sci.*, 59(1), 102704.
- Vos, T. de, Tersteeg, I., Lopriore, E., Oepkes, D., Porcelijn, L., van der Schoot, E., Verweij, E.J.T., Winkelhorst, D., Haas, M. de & Marle, M. E. A.-v. (2022). Screening of pregnant women for fetal neonatal alloimmune thrombocytopenia: a cost-utility analysis. *Authorea*.
- Vos, T. W. de, Porcelijn, L., Hofstede-van Egmond, S., Pajkrt, E., Oepkes, D., Lopriore, E., van der Schoot, C. E., Winkelhorst, D. & Haas, M. de (2021). Clinical characteristics of human platelet antigen (HPA)-1a and HPA-5b alloimmunised pregnancies and the

- association between platelet HPA-5b antibodies and symptomatic fetal neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Br J Haematol*, 195(4), 595–603.
<https://doi.org/10.1111/bjh.17731>
- Vos, T. W. de, van Zagten, M., Haas, M. de, Oepkes, D., Tan, R. N. G. B., van der Schoot, C. E., Steggerda, S. J., Vries, L. S. de, Lopriore, E. & van Klink, J. M. M. (2023). Children newly diagnosed with fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: neurodevelopmental outcome at school age. *J Pediatr*, 258(113385).
- Wabnitz, H., Khan, R. & Lazarus, A. H. (2020). The use of IVig in fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia- Principles and mechanisms. *Transfus Apher Sci*, 59(1), 102710.
- Wagner, C. L., Mascelli, M. A., Neblock, D. S., Weisman, H. F., Collier, B. S. & Jordan, R. E. (1996). Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood*, 88(3), 907–914.
- Wei, B., Berning, K., Quan, C. & Zhang, Y. T. (2017). Glycation of antibodies: Modification, methods and potential effects on biological functions. *mAbs*, 9(4), 586–594.
- Wiener, E., Abeyakoon, O., Benchetrit, G., Lyall, M., Keler, T. & Rodeck, C. H. (2003). Anti-HPA-1a-mediated platelet phagocytosis by monocytes in vitro and its inhibition by gamma receptor (FcγR) reactive reagents. *Eur J Haematol*, 70(2), 67–74.
- Wienzek-Lischka, S., König, I. R., Papenkort, E., Hackstein, H., Santoso, S., Sachs, U. J. & Bein, G. (2017). HLA-DRB3*01:01 is a predictor of immunization against human platelet antigen-1a but not of the severity of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*, 57(3), 533–540.
- Wienzek-Lischka, S., Sawazki, A., Ehrhardt, H., Sachs, U. J., Axt-Flidner, R. & Bein, G. (2020). Non-invasive risk-assessment and bleeding prophylaxis with IVIG in pregnant women with a history of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: management to minimize adverse events. *Arch Gynecol Obstet*, 302(2), 355–363.
- Wihadmadyatami, H., Röder, L., Berghöfer, H., Bein, G., Heidinger, K., Sachs, U. J. & Santoso, S. (2016). Immunisation against αIIbβ3 and αvβ3 in a type 1 variant of Glanzmann's thrombasthenia caused by a missense mutation Gly540Asp on β3. *Thromb Haemost*, 116(2), 262–271.
- Winkelhorst, D., Kamphuis, M. M., Steggerda, S. Y., Rijken, M., Oepkes, D., Lopriore, E. & van Klink, J.M.M. (2019). Perinatal outcome and long-term neurodevelopment after intracranial haemorrhage due to fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Fetal Diagn Ther.*, 45(3), 184–191.
- Winkelhorst, D., Murphy, M. F., Greinacher, A., Shehata, N., Bakchoul, T., Massey, E., Baker, J., Lieberman, L., Tanael, S., Hume, H., Arnold, D. M., Baidya, S., Bertrand, G., Bussel, J., Kjaer, M., Kaplan, C., Kjeldsen-Kragh, J., Oepkes, D. & Ryan, G. (2017). Antenatal management in fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: a systematic review. *Blood*, 129(11), 1538–1547.
- Xu, X., Chen, D., Ye, X., Xia, W., Xu, Y., Chen, Y., Shao, Y., Deng, J., Ding, H., Liu, J., Wang, J., Ni, H., Fu, Y. & Santoso, S. (2021). Successful prenatal therapy for anti-CD36-mediated severe FNAIT by deglycosylated antibodies in a novel murine model. *Blood*, 138(18), 1757–1767.
- Xu, X., Fu, Y., Kiefel, V. & Santoso, S. (2021). Fetal and neonatal immune thrombocytopenia caused by maternal alloantibodies and isoantibodies in Caucasian and Asian populations: a narrative review. *Ann Blood*, 6, 36.
- Yougbaré, I., Lang, S., Yang, H., Chen, P., Zhao, X., Tai, W.-S., Zdravic, D., Vadasz, B., Li, C., Piran, S., Marshall, A., Zhu, G., Tiller, H., Killie, M. K., Boyd, S., Leong-Poi, H., Wen, X.-Y.,

- Skogen, B., Adamson, S. L., . . . Ni, H. (2015). Maternal anti-platelet β 3 integrins impair angiogenesis and cause intracranial hemorrhage. *J Clin Invest*, *125*(4), 1545–1556.
- Zhi, H., Ahlen, M. T., Thinn, A. M.M., Weiler, H., Curtis, B. R., Skogen, B., Zhu, J. & Newman, P. J. (2018). High-resolution mapping of the polyclonal immune response to the human platelet alloantigen HPA-1a (PIA1). *Blood Adv*, *2*(21), 3001–3011.
- Zhou, D., Thinn, A. M.M., Zhao, Y., Wang, Z. & Zhu, J. (2018). Structure of an extended β 3 integrin. *Blood*, *132*(9), 962–972.