

# **Etablierung eines ELISpot-Assays zur Detektion von Antikörpern gegen $\beta$ 3- Integrine**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Denis Maenner

aus Ochsenhausen

Gießen 2019

Aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin,  
unter der Leitung von Prof. Dr. med. Gregor Bein,  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. med. Gregor Bein

Gutachter: PD Dr. biol. hom. Anna Zakrzewicz

Tag der Disputation: 22.06.2020

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Integrine .....	6
1.1.1	Funktion, Aufbau, Struktur, Konformation und Signalwege von Integrinen.....	6
1.1.2	Struktur, Konformation und Signalwege von Integrinen.....	8
1.1.3	Klinische Bedeutung von Integrinen.....	11
1.2	Monoklonale Antikörper .....	14
1.2.1	Methoden zur Herstellung monoklonaler Antikörper .....	14
1.2.2	Anwendungsgebiete monoklonaler Antikörper .....	17
1.3	Thrombozytopenien .....	18
1.3.1	Definition und Ätiologie .....	18
1.3.2	Alloimmunthrombozytopenien (Glanzmann-Thrombastenie & Neonatale Alloimmunthrombozytopenie).....	18
1.4	Zielsetzung der Arbeit.....	21
2	Material und Methoden.....	23
2.1	Geräte, Kleinmaterial, Kits, Chemikalien, Proteine, Zelllinien und Antikörper	23
2.2	Isolation von PBMCs randomisierter Blutspender.....	25
2.3	Zellkultur von Hybridomas und PBMCs .....	25
2.3.1	Hybridomzelllinien.....	25
2.3.2	Hybridomzellkultur .....	26
2.3.3	PBMC-Kultur .....	26
2.4	Kryokonservierung Hybridomas/PBMCs .....	26
2.5	Durchflusszytometrie .....	27
2.6	Proteine.....	27
2.6.1	Biotinmarkierung .....	27
2.7	ELISpot-Assay .....	28
2.7.1	ELISpot-Assay zur Detektion monoklonaler Antikörper.....	28
2.7.2	ELISpot-Assay zur Detektion humaner Antikörper.....	28
2.8	Statistische Auswertung .....	28
3	Ergebnisse.....	30

3.1	Etablierung eines B-Zell-ELISpot-Assays zur Detektion von monoklonalen Antikörpern gegen $\beta$ 3-Integrine mit Hybridomzellen .....	30
3.2	Titrationenversuche zur Evaluation optimaler Bedingungen zur Detektion von antigenspezifischem monoklonalem IgG gegen $\beta$ 3-Integrine .....	31
3.3	Testung der Spezifität und Sensitivität des ELISpot-Assays zur Detektion von monoklonalen Antikörpern gegen $\beta$ 3-Integrine .....	33
3.3.1	Untersuchung der Sensitivität des ELISpot-Assays zur Detektion von monoklonalen Antikörpern .....	33
3.3.2	Untersuchung der Spezifität des ELISpot-Assays zur Detektion von monoklonalen Antikörpern .....	35
3.4	Testung der Klonalität und Produktivität einer Hybridomzelllinie mittels ELISpot-Assay.....	36
3.5	Etablierung eines B-Zell-ELISpot-Assays zur Detektion von Alloantikörpern gegen $\beta$ 3-Integrine mit humanen B-Zellen.....	37
3.6	Untersuchung der präanalytischen Parameter für die Entwicklung eines ELISpot-Assays zur Detektion humaner Antikörper gegen $\beta$ 3-Integrine .....	38
3.6.1	Anteil der B-Zellen an isolierten PBMCs aus EDTA-Blutproben.....	38
3.6.2	Vitalität der isolierten PBMCs in der Stimulationskultur .....	38
3.6.3	Differenzierung der isolierten B-Zellen in der Stimulationskultur .....	40
3.7	Untersuchung von Blutproben eines Patienten mit GT (Typ 1) mittels B-Zell-ELISpot-Assay auf Alloantikörper gegen $\beta$ 3-Integrine.....	41
3.8	Untersuchung von Blutproben einer NAIT-Patientin mittels B-Zell-ELISpot-Assay auf Alloantikörper gegen $\beta$ 3-Integrine .....	43
4	Diskussion.....	44
4.1	Etablierung eines ELISpot-Assays zur Detektion von monoklonalen Antikörpern gegen $\beta$ 3-Integrine .....	44
4.2	Untersuchung der Sensitivität und Spezifität zur Detektion von monoklonalen Antikörpern.....	45
4.3	Untersuchung zur Detektion Verbund-abhängiger (compound-dependent) Antikörper.....	46
4.4	Untersuchung der Klonalität und Produktivität .....	47
4.5	Etablierung eines ELISpot-Assays zur Detektion von Alloantikörpern gegen $\beta$ 3-Integrine mit humanen B-Zellen .....	48
4.6	Untersuchung präanalytischer Parameter.....	48
4.7	Untersuchung von Patientenproben (GT & NAIT) im ELISpot-Assay.....	50
5	Zusammenfassung.....	54
5.1	Hintergrund .....	54

5.2	Methoden.....	54
5.3	Ergebnisse .....	55
5.4	Schlussfolgerung .....	55
6	Summary .....	57
6.1	Background .....	57
6.2	Materials and Methods .....	57
6.3	Results .....	58
6.4	Conclusion.....	58
7	Abkürzungsverzeichnis .....	59
8	Abbildungsverzeichnis.....	61
9	Tabellenverzeichnis .....	63
10	Literaturverzeichnis.....	64
11	Publikationsverzeichnis.....	72
11.1	Vorträge.....	72
11.2	Publikationen.....	72
12	Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation.....	73
13	Danksagung .....	74

# 1 Einleitung

## 1.1 Integrine

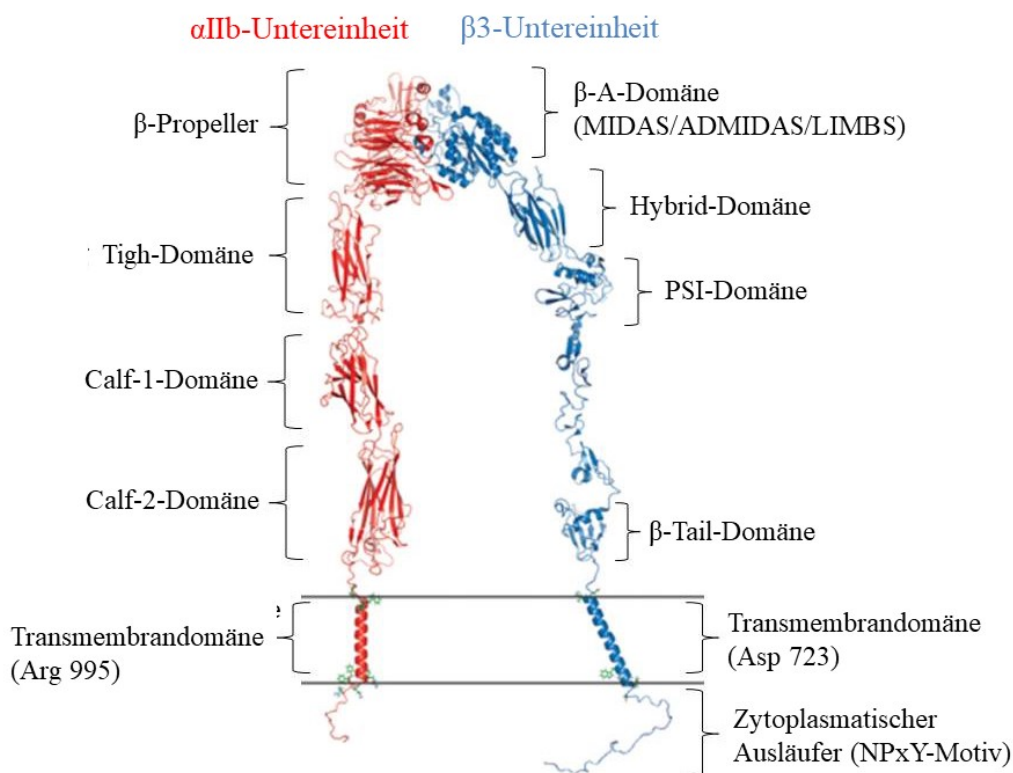
### *1.1.1 Funktion, Aufbau, Struktur, Konformation und Signalwege von Integrinen*

Integrine sind die bedeutendste Klasse von Rezeptoren für den Kontakt von Zellen mit der extrazellulären Matrix. Charakteristisch für sie ist, dass sie eine bidirektionale Signaltransduktion über die Zellmembran zulassen. Diese ist intrazellulär an die Aktivierung von Signalwegen gekoppelt, die entscheidende Aspekte der Zellfunktion regulieren, darunter Proliferation, Apoptose, Form, Motilität, Polarität, Genexpression und Differenzierung. Daher haben sie unter anderem sowohl eine Schlüsselfunktion in verschiedenen physiologischen Prozessen des Organismus wie Embryonalentwicklung, Diapedese von Leukozyten oder der primären Hämostase als auch in pathologischen Prozessen wie Entzündung oder der Metastasierung von neoplastischen Zellen (Hynes 2002). Ihre generelle Bedeutung zeigt sich in der starken evolutionären Konservierung der Rezeptorklasse. Integrine lassen sich in allen vielzelligen Tieren (Metazoa) finden, jedoch nicht in Prokaryonten, Pflanzen oder Pilzen (Whittaker and Hynes 2002; Hynes 2002).

Integrine sind Heterodimere, bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. Insgesamt umfasst die Rezeptorfamilie in allen Wirbeltieren 18  $\alpha$ - und acht  $\beta$ -Untereinheiten. Einzelne davon können zu 24 verschiedenen Rezeptoren kombiniert werden, die auf unterschiedlichen Zellen und Geweben exprimiert werden. Zwischen den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten gibt es keine strukturelle Homologie, innerhalb der verschiedenen  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Untereinheiten existieren jedoch konservierte, überschneidende Bereiche. Die Rezeptoren können nach ihren Untereinheiten (z. B.  $\beta$ 3-Integrine) oder ihrem Ligandenbindungsverhalten (z. B. RGD-bindende Rezeptoren) eingeteilt werden (Hynes 2002; Barczyk et al. 2010). Der extrazelluläre Teil der  $\alpha$ -Untereinheit besteht aus einem siebenteiligen  $\beta$ -Propeller, gefolgt von einer thigh- und den beiden calf-Domänen. In neun der  $\alpha$ -Untereinheiten kommt eine 200 Aminosäuren lange  $\alpha$ I-Domäne vor (Barczyk et al. 2010). Der extrazelluläre Teil der  $\beta$ -Untereinheit besteht aus einer Plexin-Semaphorin-Integrin- (PSI-Domäne), gefolgt von einer Hybriddomäne. In diese ist eine  $\beta$ -I-Domäne eingefügt, die mit der  $\alpha$ I-Domäne strukturverwandt ist. Es folgen vier cysteinreiche Epidermale-Wachstumsfaktor-Domänen (EGF-Domäne) und die  $\beta$ -Tail-Domäne (Arnaout et al. 2005; Campbell and Humphries 2011). Die Untereinheiten bilden zusammen einen ‚Integrin-Kopf‘, der aus dem  $\beta$ -Propeller und der  $\beta$ -I-Domäne besteht. Eine Spalte zwischen den beiden Untereinheiten bildet dabei die Ligandenbindungsstelle des Integrins (Campbell and Humphries 2011; Barczyk et al. 2010; Arnaout et al. 2005). In der  $\beta$ -I-Domäne befinden sich drei Bindungsstellen für divalente Kationen (MIDAS, ADMIDAS, LIMBS), die für die allosterische Regulation der Integrinaktivität und Affinität eine entscheidende Rolle spielen (Arnaout et al. 2005). Bei Integrinen, die eine  $\alpha$ I-Domäne enthalten, stellt diese die Ligandenbindungsstelle dar (Luo et al. 2007). Beide Untereinheiten sind über  $\alpha$ -helikale Transmembrandomänen in der Plasmamembran

verankert, wobei die Transmembrandomäne der  $\beta$ -Untereinheit um  $25^\circ$  zur Ebene der Membran verschoben ist (Moser et al. 2009; Shattil et al. 2010).

Von den Transmembrandomänen ausgehend besitzen sowohl die  $\alpha$ - als auch die  $\beta$ -Untereinheit zytoplasmatische Ausläufer. Diese können in einen membran-proximalen und einen membran-distalen Abschnitt eingeteilt werden. In ersterem Abschnitt befindet sich eine in den  $\alpha$ -Untereinheiten konservierte GFFKR-Sequenz, während sich in letzteren eine ebenfalls konservierte HDR(R/K)E-Sequenz befindetet. Hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen sowie die Bildung einer Salzbrücke zwischen den Seitenketten des Arginins (R) 995 und des Asparagins (D) 723 der konservierten Sequenzen sind von entscheidender Bedeutung für die Regulation der Aktivität des Integrins und werden als ‚inner membrane clasp‘ (IMC) bezeichnet. Unterstützt wird die Funktion vom ‚outer membrane clasp‘ (OMC), der von Interaktionen zwischen Glycin-Resten in derselben Region gebildet wird. Ausschließlich im zytoplasmatischen Ausläufer der  $\beta$ -Untereinheit befindet sich im membran-proximalen Abschnitt ein NPxY-Motiv (x kann jede Aminosäure sein). Dieses ist die Bindungsstelle für integrinassoziierte Proteine, die eine Phosphotyrosinbindungsdomäne besitzen (Moser et al. 2009; Shattil et al. 2010).



**Abbildung 1:** Bänderdiagramm des Integrins  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 mit Beschriftung der Domänen und funktionell relevanter Bereiche. Modifiziert nach Lau et al. (2009). Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons (Genehmigung über RightsLink® Copyright Clearance Center).

### **1.1.2 Struktur, Konformation und Signalwege von Integrinen**

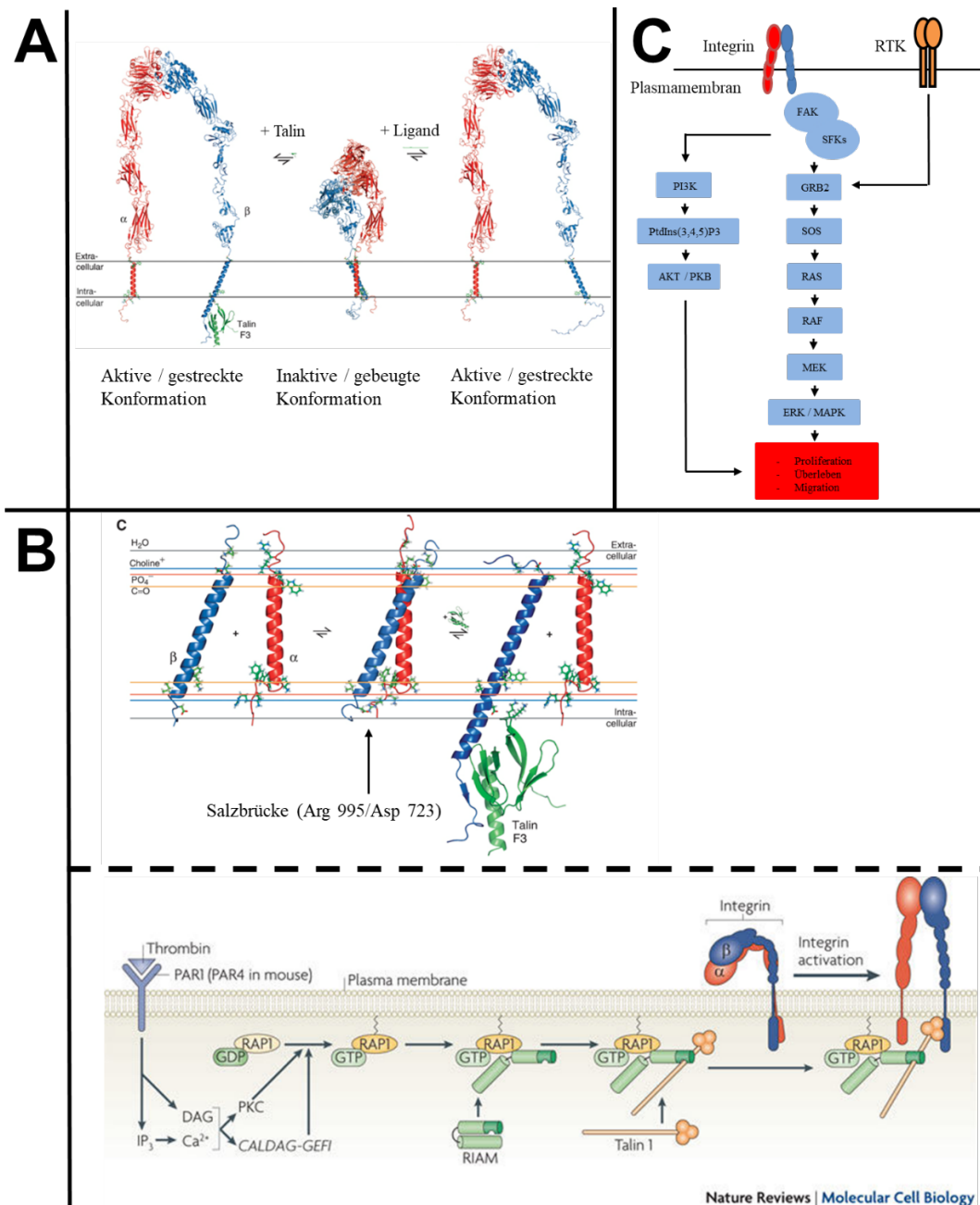
Charakteristisch für Integrine ist, dass sie eine bidirektionale Signaltransduktion über die Zellmembran zulassen. Aktiviert ein Signal aus dem extrazellulären Raum sie, wird von einem Outside-In-Signalweg gesprochen. Kommt es im Gegensatz dazu zu einer Aktivierung aufgrund eines intrazellulären Weges, wird dies Inside-Out-Signalweg genannt. Die Aktivität und Affinität von Integrinen wird über ihre Konformation (= allosterisch) und das ‚Clustering‘ der Rezeptoren reguliert (Hynes 2002; Shimaoka et al. 2002; Arnaout et al. 2005; Shattil et al. 2010; Campbell and Humphries 2011). Verschiedene Methoden, darunter Elektronenmikroskopie, Kernspinresonanzspektroskopie und Kristallstrukturanalyse, wurden zur Untersuchung der Struktur von Integrinen verwendet. Obwohl noch nicht abschließend geklärt, ist wissenschaftlicher Konsens, dass die gebeugte Integrin-Konformation für den inaktiven Zustand mit niedriger Affinität und die gesteckte Konformation für den aktiven Zustand mit hoher Affinität steht. In der gebeugten/inaktiven Konformation sind die  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomänen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit ineinander verschränkt. Der Zustand wird strukturell durch die Wechselwirkungen des IMC und OMC aufrechterhalten. Kennzeichen der aufrechten/aktiven Konformation ist eine Trennung der beiden Transmembrandomänen (Moser et al. 2009; Shattil et al. 2010; Campbell and Humphries 2011). Liganden vieler Integrine sind multivalente Moleküle, wodurch es bei Ligandenbindung zur Clusterbildung auf der Membran kommt. Welcher der Punkte für die Aktivierung und Signaltransduktion schwerer gewichtet werden muss, ist noch nicht ausreichend verstanden und könnte von einem Integrin zum anderen verschieden sein bzw. vom exprimierenden Zelltyp abhängen (Shimaoka et al. 2002; Shattil et al. 2010). Bei der Outside-In-Aktivierung bindet ein Ligand an ein Integrin, z. B. Fibrinogen über seine Arginin-, Glycin- und Asparaginsäure-Sequenz (RGD-Sequenz) an Integrine auf Thrombozyten im Rahmen der primären Hämostase (Shattil and Newman 2004). Bindung des Liganden an der Bindungsstelle zwischen dem  $\beta$ -Propeller und der  $\beta$ -I-Domäne resultiert bei gleichzeitiger Bindung von divalenten Kationen innerhalb der  $\beta$ -I-Domäne in einer Lageänderung der Hybriddomäne um  $60^\circ$  zur Ausgangsebene. Weitere nicht hinreichend verstandene Schritte führen zur Trennung der Transmembrandomänen und zu einem Wechsel in die gesteckte/aktive Konformation (Arnaout et al. 2005; Luo et al. 2007; Campbell and Humphries 2011).

Divalente Kationen sind ein entscheidender Kofaktor für die Aktivierung von Integrinen.  $Mn^{2+}$  wirkt aktivierend, während die Bindung von  $Ca^{2+}$  in der  $\beta$ -I-Domäne die gebeugte/inaktive Konformation begünstigt (Shimaoka et al. 2002; Arnaout et al. 2005; Luo et al. 2007; Campbell and Humphries 2011). Im Gegensatz dazu führen bei der Inside-Out-Aktivierung Signalwege aus der Zelle selbst zum Konformationswechsel von gebeugt/inaktiv zu gestreckt/aktiv und begünstigen somit die Ligandenbindung. Entscheidend für den Prozess sind Proteine, die an die zytoplasmatischen Ausläufer der Transmembrandomänen binden. Das bedeutsamste von ihnen ist Talin, andere beteiligte sind z. B. Kindlin und Vinculin. Eine Untereinheit der FERM-Talinkopffdomäne (F3) verfügt über eine Phosphotyrosinbindungsdomäne (PTB), mit der sie das NPXY-Motiv(x kann jede Aminosäure sein) der  $\beta$ -Untereinheit binden kann. Die Bindung von Talin



verändert den Winkel der  $\beta$ -Transmembrandomäne zur Ebene der Zellmembran und unterbricht die Salzbrücke zwischen Arginin 995 und Asparagin 723, was zu einem Aufbrechen des IMC und damit letztlich zur Trennung der Transmembrandomänen und Aktivierung/Aufrichtung des Integrins führt (Moser et al. 2009; Shattil et al. 2010; Calderwood et al. 2013). Reguliert wird die Aktivität von Talin durch unterschiedliche Signalkaskaden. Ein gut verstandenes Beispiel für die Talin-vermittelte Inside-Out-Aktivierung von Integrinen ist die Bindung von Thrombin an Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR-Rezeptoren) auf Thrombozyten im Rahmen der sekundären Hämostase. Der PAR-Rezeptor aktiviert nach Thrombinbindung das monomere G-Protein RAP1, das wiederum RIAM aktiviert. Das Protein hat die Fähigkeit, Talin zu binden und zu aktivieren. Seine räumliche Struktur ermöglicht es, dass sich Talin nach Bindung in Nähe zu seinem Bindungsmotiv an der  $\beta$ -Untereinheit befindet. Diese Signalkaskade ist eines der wenigen Beispiele einer hinreichend verstandenen Inside-Out-Aktivierung von Integrinen, viele weitere sind nicht vollständig verstanden (Shattil et al. 2010).

Die Aktivierung von Integrinen, unabhängig vom Aktivierungsweg, hat weitreichende Konsequenzen. Sie sind keine reinen Adhäsionsrezeptoren, sondern stoßen an diese Funktion gekoppelt bedeutsame Signalwege für zentrale Zellfunktionen durch Clusterbildung in Form von fokalen Kontakten an. Talin dient neben seiner Funktion als Integrinaktivator auch als zentrales Adapterprotein, das Integrine mit den Aktinfilamenten des Zytoskeletts verbindet und die  $\beta$ -Untereinheit an Multiproteinsignalkomplexen innerhalb der Cluster beteiligt. Bedeutendste Proteine dieser Signalkomplexe sind die fokale Adhäsionskinase (FAK) und zytoplasmatische Tyrosinkinase der Src-Familie (SFK's). Sie binden Integrine an Signalwege, wie den Ras-MAPK- und den AKT/PKB-Signalweg, die im Zusammenspiel mit den Wachstumsfaktorrezeptoren der Rezeptortyrosinkinase (RTK) grundlegende Zellfunktionen wie Proliferation, Überleben und Migration steuern (Guo and Giancotti 2004; Frame et al. 2010; Desgrosellier and Cheresch 2010).



**Abbildung 2:** Outside-In- und Inside-Out-Aktivierung. A: Konformationsänderung durch Ligandenbindung (= Outside-In) oder durch Bindung von Talin (= Inside-Out). Modifiziert nach Lau et al. 2009. B: Mechanismus der Integrinaktivierung durch Talin und dessen Regulation über assoziierte Proteine. Modifiziert nach Lau et al. (2009) und Shattil et al. (2010). C: Signalwege von Integrinen zur Regulation zentraler Zellfunktionen. Eigene Darstellung in Anlehnung an Guo and Giancotti (2004). Nachdruck der jeweiligen Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons (Lau et al. 2009) und Springer Nature (Shattil et al. 2010), Genehmigungen über RightsLink® Copyright Clearance Center.

### **1.1.3 Klinische Bedeutung von Integrinen**

Integrine sind durch ihre grundlegende Funktion als bedeutendste Klasse von Rezeptoren für den Kontakt von Zellen mit der extrazellulären Matrix und ihre Signaltransduktionsfunktion an verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen des Organismus beteiligt. Ihre zentrale Rolle in klinisch bedeutsamen pathologischen Prozessen wie Thrombenbildung, Autoimmunkrankheiten und neoplastischen Erkrankungen macht sie als Zielstruktur für die Entwicklung neuer medikamentöser Therapien relevant.

In den 1990er Jahren wurden die ersten Integrin-Inhibitoren entwickelt, die für den klinischen Einsatz zugelassen wurden. Bei den Medikamenten handelte es sich um Antagonisten gegen das Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 auf Thrombozyten, das eine zentrale Rolle in der primären Hämostase spielt (Cox et al. 2010). Es ist als Fibrinogenrezeptor essenziell für die Quervernetzung der Plättchen und für die Bildung eines Thrombus (Bennett et al. 2009). Das Antikörperfragment Abciximab und die niedermolekularen Inhibitoren Eptifibatid und Tirofiban sollten als Thrombozytenaggregationshemmstoffe das Verständnis der primären Hämostase in klinisch messbare Verbesserungen bei thromboembolischen Gefäßverschlusskrankheiten, hauptsächlich Myokardinfarkten, umsetzen. Eptifibatid ist ein zyklisches Peptid, das über eine KGD-Sequenz verfügt. Über die strukturelle Ähnlichkeit mit einer RGD-Sequenz kann es die Ligandenbindungsstelle des Integrins  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 besetzen. Tirofiban ist ein nicht peptidischer Inhibitor desselben Integrins. Bei Abciximab handelt es sich um ein Fragmented-Antigen-Fragment (Fab-Fragment) eines monoklonalen Antikörpers, das distal der RGD-Bindungsstelle an die  $\beta$ 3-Untereinheit bindet und eine Ligandenbindung sterisch verhindert (Cox et al. 2010). Die Erwartungen wurden jedoch nicht erfüllt. Der Einsatz von Abciximab vor perkutaner koronarer Intervention (PCI) bei präklinischer Gabe von Clopidogrel brachte keinen Vorteil gegenüber dem Placebo bezüglich der Reduktion der Infarktgröße (Mehilli et al. 2009). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass die Kombination von Abciximab mit einem Antikoagulant im Vergleich zur alleinigen Gabe eines Antikoagulanz vor PCI das Blutungs- und generelle Komplikationsrisiko erhöht (Stone et al. 2008). Jedes dieser Medikamente sollte nur bei Hochrisiko-PCIs unter Ausschöpfung der Möglichkeiten mit P2Y12-Inhibitoren (Clopidogrel, Prasugrel, Ticagrelor) verwendet werden (Empfehlungsgrad IIa/Evidenzgrad C). Von einer Routineanwendung bei jeder PCI (Empfehlungsgrad IIb/Evidenzgrad B) wird abgeraten (Steg et al. 2012).

Neben den intravenösen Integrin- $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Inhibitoren wurde auch versucht, oral applizierbare Wirkstoffe zu entwickeln. Keiner davon wurde zugelassen, weil sie zu einer erhöhten kardiovaskulären Komplikationsrate, insbesondere Blutungen führten, ohne dabei einen Nutzen zu erbringen (Chew et al. 2001a; Chew et al. 2001b; Bhatt and Topol 2003; Cox et al. 2010). In einem anderen Feld konnten sich Integrine als Zielstruktur auch klinisch bewähren, jedoch ebenfalls mit beträchtlichen Nebenwirkungen. Die Integrine  $\alpha$ L $\beta$ 2,  $\alpha$ M $\beta$ 2 und  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 sind entscheidende Rezeptoren für die Diapedese von Leukozyten

über die Gefäßwand in entzündetes Gewebe. Dort ruhende Zellen der angeborenen Immunantwort reagieren auf pathogen-assoziierte Molekulare Muster (PAMP). Deren Freisetzung von Chemo- und Interleukinen erhöht die Expression von Selektinen auf den Endothelzellen der Gefäße des entzündeten Gewebes. Binden an der Gefäßwand rollende Leukozyten an Selektine, resultiert daraus über komplexe Signaltransduktionswege in den Leukozyten eine Inside-Out-Aktivierung der Integrine. Sie können in ihrer gestreckten Konformation die Moleküle der Interzellulären-Zelladhäsionsmolekül-Klasse (ICAM-Klasse) und Vaskulären-Zell-Adhäsionsmolekül-Klasse (VCAM-Klasse) auf den Endothelzellen binden. Das führt zu einer festeren Bindung des Leukozyten am Endothel und stößt intrazelluläre Signalwege an, die zum Umbau des Zytoskeletts führen und letztlich zum Durchtritt des Leukozyten zwischen den Interzellulärräumen der Endothelzellen (Vestweber 2015). Dieser Prozess ist von Bedeutung für die physiologische Abwehr von Infektionen, jedoch stellt er auch eine nützliche Zielstruktur für immunsuppressive Medikamente dar.

Charakteristisch für Autoimmunkrankheiten ist die pathologische Einwanderung von Entzündungszellen in gesundes Gewebe. Für Multiple Sklerose ist pathophysiologisch unter anderem die Migration von Lymphozyten ins zentrale Nervensystem kennzeichnend. Es konnte zuerst im Maus-Modell gezeigt werden, dass monoklonale Antikörper gegen Integrin  $\alpha 4\beta 1$  dies unterbinden und eine Autoimmunencephalomyelitis verhindern (Yednock et al. 1992; Cox et al. 2010). Natalizumab ist ein monoklonaler Antikörper gegen die  $\alpha 4$ -Untereinheit von Integrinen, der 2004 zugelassen wurde und sehr gute klinische Ergebnisse in der Therapie der multiplen Sklerose in Bezug auf den Gesamtverlauf und die Reduktion der Wahrscheinlichkeit von akuten Schüben erzielte (Polman et al. 2006; Hutchinson et al. 2009; Cox et al. 2010). Ein ähnliches Wirkprinzip verfolgte Efalizumab. Der monoklonale Antikörper richtet sich gegen die Integrin-Untereinheit  $\alpha L$  und damit gegen die Migration aktiver T-Lymphozyten ins Gewebe. Auch in diesem Fall konnten gute klinische Ergebnisse in der Therapie der Psoriasis festgestellt werden (Lebwohl et al. 2003; Gordon et al. 2003; Ortonne et al. 2005; Cox et al. 2010). Beide Antikörper führten jedoch zu Fällen von tödlich verlaufender progressiver multifokaler Leukenzephalopathie (PML) durch eine Reaktivierung des JC-Virus im zentralen Nervensystem (Tan and Korolnik 2010; Cox et al. 2010). Daraufhin wurde Efalizumab 2009 vom Markt genommen. Mangels Alternativen bei der Behandlung schwerer Krankheitsverläufe der multiplen Sklerose wird Natalizumab weiterhin verwendet, es wurden jedoch Strategien zur Früherkennung von Patienten mit erhöhtem Risiko auf PML entwickelt (Cox et al. 2010).

Derzeit wird erforscht, ob sich Integrin-Antagonisten in der Therapie neoplastischer Erkrankungen bewähren können. Der Grund dafür ist, dass Integrine an den zentralen onkogenen Signalwegen Apoptoseregulation, Metastasierung, Lymphangiogenese und Angiogenese von neoplastischen Zellen beteiligt sind (Hood and Cheresch 2002; Guo and Giancotti 2004; Avraamides et al. 2008; Desgrosellier and Cheresch 2010). Je nach Stadium der Tumorerkrankung verändert sich die Expression bestimmter Integrine. Beispiele für Integrine die mit einem Fortschritt der Erkrankung korrelieren sind  $\alpha V\beta 3$ ,

$\alpha V\beta 5$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha V\beta 6$ . Einige davon aktivieren bei Ligandenbindung die oben beschriebenen promotischen und antiapoptischen Signalwege, während nicht ligandengebundene Integrine einen Prozess auslösen, der als Integrin Mediated Death (IMD) bezeichnet wird, indem das Integrin die Caspase 8 aktiviert und die folgenden Schritte der Apoptose initiiert (Desgrosellier and Cheresch 2010). Tumore entwickeln im Verlauf oft eine Resistenz gegen IMD. Über FAK- und SFK-assoziierte Signalwege regulieren Integrine in neoplastischen Zellen die Expression von E-Cadherin herunter, den Auf- und Abbau des Zytoskeletts zur Migration und die Aktivität von Matrixmetalloproteinasen (MMP) zum Überwinden der Basalmembran für die lymphogene und hämatogene Metastasierung (Hood and Cheresch 2002; Guo and Giancotti 2004; Avraamides et al. 2008; Desgrosellier and Cheresch 2010). Von besonderer Bedeutung ist das Integrin  $\alpha V\beta 3$ , weil es neben den bereits genannten Funktionen zusätzlich eine Schlüsselrolle in der Angiogenese von Tumoren spielt (Brooks et al. 1994; Avraamides et al. 2008).  $\alpha V\beta 3$  kann verschiedene Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) über ihre RGD-Sequenzen binden. Die bedeutsamsten sind Fibronectin und Vitronectin. In Biopsien wurde festgestellt, dass es auf den Blutgefäßen von Tumoren sowie auf den Tumorzellen selbst überexprimiert ist, jedoch nicht auf Gefäßen in normalem Gewebe. In Studien konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass Integrin- $\alpha V\beta 3$ -Antagonisten Endothelzellapoptose sowie die Aktivität von Tumorsuppressoren wie p53 steigern und die Expression von antiapoptischen Proteinen wie z. B. BAX reduzieren. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass es zu einer Aktivierung des IMD-Signalweges kommt (Avraamides et al. 2008).  $\alpha V\beta 3$  stellt im Vergleich zu vielen anderen an den Prozessen beteiligten Integrinen ein besseres Target für Integrin-Antagonisten dar, da es möglicherweise eine potenzierte Wirkung sowohl durch Blockierung antiproliferativer als auch antiangiogener Signalwege aufweist (Cox et al. 2010).

Am weitesten fortgeschritten in der Entwicklung ist Cilengitide. Dabei handelt es sich um zyklisches RGD-Peptid, das 2014 eine Phase-III-Studie zur Behandlung von Patienten mit Glioblastom durchlaufen hat. Es zeigten sich keine Vorteile in der Überlebenszeit und keine schwerwiegenden Nebenwirkungen im Vergleich mit der Standardtherapie mit Temozolomid. Weitere niedermolekulare Antagonisten und inhibierende monoklonale Antikörper gegen  $\alpha V\beta 3$  und andere Integrine befinden sich in unterschiedlichen Phasen der Entwicklung oder klinischen Testung (Avraamides et al. 2008; Stupp et al. 2014).

Neben der Bedeutung in der Entwicklung neuer Therapieansätze für unterschiedliche Erkrankungen sind Integrine auch in der Diagnostik von Relevanz. Der MAIPA-Assay ist ein Immunassay zum Nachweis von Auto- und Alloantikörpern gegen thrombozytäre Integrine (Kiefel 1992). Klinisch hat er sich in der Routinediagnostik der Auto- und Alloimmunthrombozytopenien bewährt (Brighton et al. 1996; WARNER et al. 1999). Im experimentellen Stadium befinden sich bildgebende Ansätze, die PEGylierte zyklische RGD-Peptide mit  $^{18}F$ ,  $^{64}Cu$  markieren. Tumore mit einem Durchmesser von bis zu 1,5

mm konnten damit im Tierversuch in Brust- und Hirngewebe nachgewiesen werden (Avraamides et al. 2008).

## **1.2 Monoklonale Antikörper**

### ***1.2.1 Methoden zur Herstellung monoklonaler Antikörper***

#### **1.2.1.1 Hybridom-Technologie**

Die heutige Verfügbarkeit von monoklonalen Antikörpern gegen unterschiedliche Antigene zur Diagnostik und Therapie geht auf die Entwicklung der Hybridom-Technologie durch Georges Köhler und César Milstein im Jahr 1975 zurück (Köhler and Milstein 1975; Zhang 2012).

Ihre Grundlage ist die Fusion von B-Lymphozyten einer gegen ein gewünschtes Antigen immunisierten Maus mit Myelomzellen. Dabei entstehen immortalisierte antikörpersezernierende Zellen (ASC) gegen ein spezifisches Antigen. Die Methode kann in vier Arbeitsschritte eingeteilt werden: (1) Immunisierung, (2) Fusion, (3) Screening, (4) Charakterisierung (Nelson et al. 2000). Im Allgemeinen wird der Maus das gewünschte Zielantigen subkutan oder intraperitoneal appliziert und die Immunantwort durch die zusätzliche Gabe von Adjuvantien gesteigert. Die Immunisierung kann durch Titerbestimmung im Serum kontrolliert werden. Die Verwendung von Adjuvantien begünstigt ebenfalls den class switch der Immunglobuline (Ig), was die Entstehung von Antikörpern mit höherer Affinität durch somatische Hypermutation fördert. Ist der Endpunkt erreicht, werden die Versuchstiere splenektomiert und die B-Lymphozyten isoliert (Nelson et al. 2000). Als Fusionspartner für die isolierten Zellen steht eine Reihe von Myelomzelllinien zur Verfügung. Sie haben die Gemeinsamkeit, dass sie einen Defekt in der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) aufweisen. Induziert wird die Fusion durch Elektrostimulation oder Polyethylenglycol. Es können dabei fusionierte (Hybridom-) Zellen entstehen, die den gewünschten spezifischen, unspezifische oder keine Antikörper produzieren. Neben den erfolgreich fusionierten Zellen verbleiben auch nicht fusionierte Myelomzellen und B-Lymphozyten in der Zellkultur. Zur Selektion der Hybridomzellen wird ein hypoxanthin-, aminopterin- und thymidinhaltiges Medium (HAT-Medium) verwendet. Aminopterin blockiert die de novo-Nukleotidsynthese, wodurch nur Zellen im HAT-Medium überleben, die auf den Salvage Pathway zur Nukleotidsynthese zurückgreifen können. Nicht fusionierte Myelomzellen können dies aufgrund der defekten HGPRT nicht und sterben ab, Hybridomzellen erhalten die funktionsfähige HGPRT von ihrem lymphozytären Fusionspartner und überleben. Diese Selektion ist notwendig, weil erstere eine höhere Mitoserate aufweisen als letztere und sie somit verdrängen würden. Nicht fusionierte B-Zellen sterben ab, da sie nicht immortalisiert sind (Nelson et al. 2000; Zhang 2012). Da die Fusion mancher Hybridomzellen nicht stabil ist, sollte die Kultivierung für mehrere Tage im Selektionsmedium erfolgen. Ziel des anschließenden (Primär-)Screenings ist es, mittels Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) unspezifisch und nicht antikörpersezernierende Hybridomzellen von den Fusionsplatten auszuwählen. Oft liegen Kolonien unterschiedlicher Hybridom-Klone räumlich so dicht aneinander, dass

der erste Schritt der Charakterisierung eine Klonierung durch die Limiting Dilution-Methode ist. Sind die Klone voneinander getrennt, kann eine genauere Charakterisierung erfolgen, z. B. die Bestimmung der Immunglobulin-G-Subklasse (IgG), Glykosylierung, Messung der Spezifität und Affinität und Epitop-Mapping. Mittels der Bestimmung dieser Eigenschaften kann entschieden werden, welcher Klon die geeignetsten Eigenschaften für Therapie oder Diagnostik aufweist (Nelson et al. 2000; Zhang 2012).

Wegen des Auftretens von humanen Anti-Maus-Antikörpern (HAMA) nach Therapie mit monoklonalen Antikörpern aus Hybridomas, die die Wirkung limitieren, sowie der Inkompatibilität zu humanen Fc-Rezeptoren werden therapeutische Antikörper aktuell vor allem durch Immunisierung transgener Mäuse entwickelt. Durch yeast artificial chromosomes gelang es, den humanen Ig-Lokus in deren Genom zu übertragen. Ihre Immunisierung ermöglicht es mit denselben vorangehend beschriebenen Arbeitsschritten, Hybridomas zu erzeugen, die komplett humane monoklonale Antikörper produzieren (Little et al. 2000; Brekke and Sandlie 2003; Carter 2006). Der Vorteil der Hybridom-Technologie liegt in der im Vergleich mit anderen Methoden hohen Affinität der monoklonalen Antikörper durch Affinitätsreifung und somatische Hypermutation *in vivo* (Carter 2006).

#### 1.2.1.2 Phagedisplay

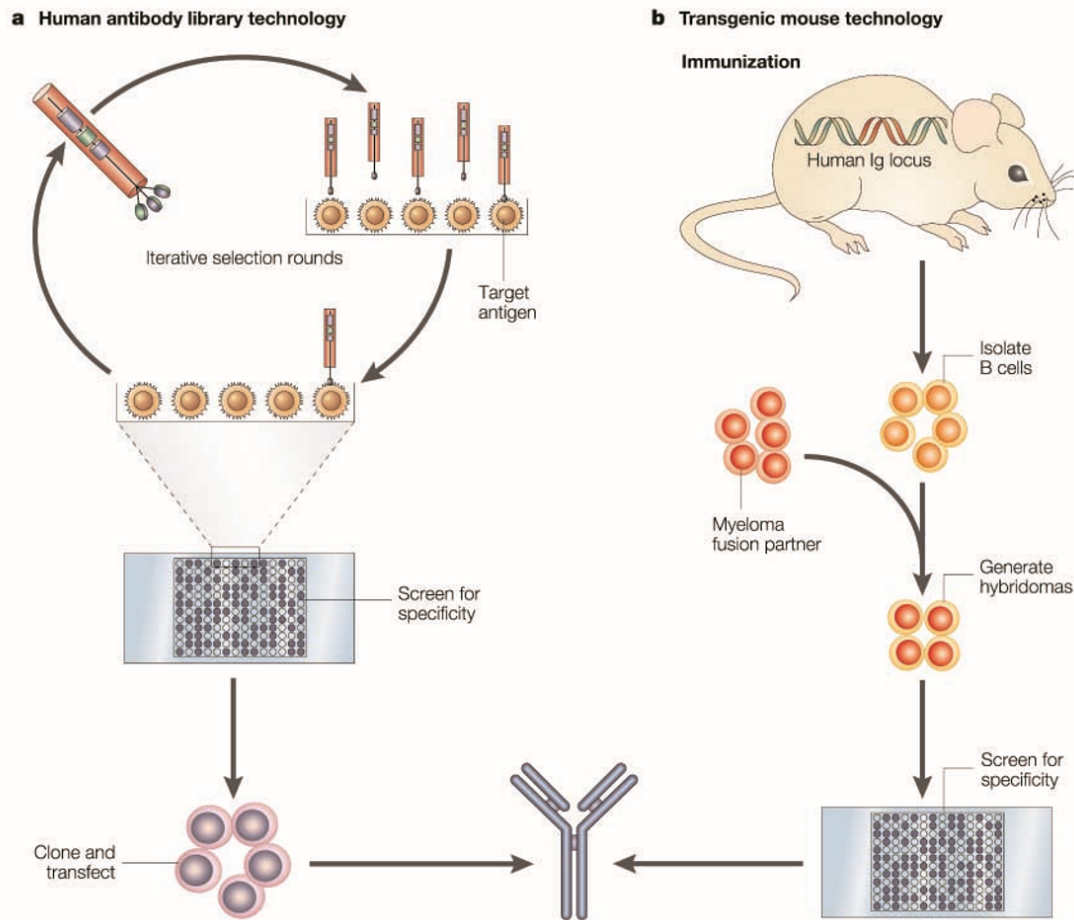
Das Grundprinzip des Phagedisplays ist es, die natürlichen Schritte der Antikörperentstehung mittels molekularbiologischer Methoden *in vitro* nachzuahmen (Winter et al. 1994). Grundlage aller Display-Methoden (Phage, Hefe, Ribosomen) sind Antikörper-Bibliotheken, die mittels einer Displaytechnologie, am häufigsten dem Phagedisplay, auf geeignete Fragmente für ein gewünschtes Antigen gescreent werden können (Winter et al. 1994; Hoogenboom et al. 1998; Hoogenboom 2005; Marasco and Sui 2007). Dort können lediglich scFV- und Fab-Fragmente hergestellt werden (Marasco and Sui 2007). Antikörper-Bibliotheken entstehen durch Isolation der Gene für die variable Region der schweren (VH-Gene) und der variablen Region der leichten Ig-Kette (VL-Gene) aus B-Zellen. Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden diese amplifiziert und auf einen Phagemid-Vektor kloniert (Winter et al. 1994; Hoogenboom et al. 1998; Lerner 2016). Phagemide sind Plasmide, die einen *fl*-origin of replication (*ori*) für Phagen tragen. Neben dem *Ori* trägt das Phagemid die genetische Information für das Hüllprotein III des Phagen, an das die VH- und VL-Gene gekoppelt sind. Der Phagemid-Vektor wird von *E. coli* aufgenommen, das anschließend mit einem Helfer-Phagen infiziert wird. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um den filamentösen Phagen M13. Nach Infektion und Übertragung der Phagen-DNA beginnt das Bakterium mit der Synthese der kodierenden Bestandteile. Da das Phagemid über einen passenden (viralen) *Ori* verfügt, werden die enthaltenen genetischen Informationen ebenfalls vervielfältigt. Dadurch liegen anschließend im periplasmatischen Raum des Bakteriums zwei unterschiedliche Versionen des Hüllproteins-III vor: ein ‚Wild-Typ‘, entstanden aus der genetischen Information des Helferphagen, und eine Version mit gekoppeltem Antikörperfragment aus dem Phagemid (Smith and Petrenko 1997; Hoogenboom et al. 1998; Kehoe and Kay 2005). Ein komplett zusammengesetzter Phage enthält fünf Kopien

des Hüllproteins-III. Durch zufällige Kombination der beiden Varianten entstehen Phagen, die im Durchschnitt ein antikörperfragmentgekoppeltes Hüllprotein-III tragen. Das Antikörperfragment entspricht den auf das Phagemid klonierten VH- und VL-Genen. Aufgrund eines defekten Packaging-Signals im Genom des Helferphagen enthalten nahezu alle zusammengesetzten und freigesetzten Phagen das Phagemid. Alle auf diese Weise hergestellten Phagen präsentieren damit auf ihrer Oberfläche ein Antikörperfragment (Phänotyp), das mit den jeweiligen auf dem Phagemid eingebrachten VH- und VL-Genen (Genotyp) korreliert (Winter et al. 1994; Smith and Petrenko 1997; Hoogenboom et al. 1998; Kehoe and Kay 2005). Eine Antikörper-Bibliothek kann bis zu  $10^{10}$  oder  $10^{11}$  unterschiedlicher Phagen, die jeweils unterschiedliche Antikörperfragmente präsentieren, enthalten. Je nachdem, aus welcher Subgruppe von B-Zellen die VH- und VL-Gene isoliert wurden, kann zwischen immunisierten, naiven und synthetischen Antikörper-Bibliotheken unterschieden werden. Bei immunisierten Bibliotheken werden die VH- und VL-Gene erst nach Antigenkontakt in vivo aus den B-Zellen isoliert. Naive Antikörper-Bibliotheken enthalten VH- und VL-Gene aus B-Zellen, die bereits die Reifung im Knochenmark abgeschlossen haben, jedoch noch keinen Antigenkontakt hatten. Die Umlagerung der Gensegmente im Knochenmark und Deletion überschüssiger Segmente wird bei der Herstellung synthetischer Antikörper-Bibliotheken ignoriert. Die einzelnen Gensegmente werden komplett artifiziell ohne Vorarbeit in vivo rekombiniert und umgelagert (Hoogenboom et al. 1998; Hoogenboom 2005). Nach Herstellung einer geeigneten Antikörperbibliothek können passende Phagen daraus selektiert werden. Dies geschieht, indem das gewünschte Zielantigen auf einer Platte immobilisiert wird und die Phagen der Antikörper-Bibliothek dort inkubiert werden. Nach deren Waschung befinden sich ausschließlich Phagen auf der Platte, deren Antikörperfragment das Antigen bindet. Sie werden eluiert und mit Hilfe von E.Coli amplifiziert. Es können mehrere Selektionsrunden hintereinander durchgeführt werden. Wird die Konzentration des immobilisierten Antigens herunter titriert, können die Phagen, deren Antikörperfragment die höchste Affinität aufweist, selektiert werden. Durch Mutagenese und weitere Selektionsrunden kann dieser Effekt weiter verstärkt werden (Winter et al. 1994; Smith and Petrenko 1997; Hoogenboom et al. 1998; Kehoe and Kay 2005). Selektierte Phagen werden erneut durch E.Coli amplifiziert und die Antikörperfragmente aus dem periplasmatischen Raum oder Überstand der Kultur isoliert. Eine Charakterisierung der gewonnenen scFV oder Fab-Fragmente bezüglich Spezifität und Affinität erfolgt mittels ELISA. Ist das Ziel die Entwicklung eines kompletten monoklonalen Antikörpers, müssen die VH- und VL-Gene aus dem Phagen, dessen Fragmente sich im ELISA als am besten geeignet herausgestellt haben, erneut isoliert und durch Expressionsvektoren in Zelllinien transfiziert werden, die komplett humanes IgG produzieren (Hoogenboom et al. 1998; Marasco and Sui 2007).

Das Design der Antikörper-Bibliothek ist entscheidend für die Eigenschaften des gewünschten Antikörperfragmentes/monoklonalen Antikörpers. Immunisierte Antikörper-Bibliotheken können durch Vorselektion in vivo zu Fragmenten mit höherer Affinität führen. Synthetische Antikörper-Bibliotheken ermöglichen es Antikörperfragmente gegen Haptene, Metalle, Toxine oder andere exotische Epitope. Ein



genereller Vorteil gegenüber der Hybridom-Technologie ist die Möglichkeit, Antikörper gegen Selbst-Epitope zu entwickeln, was mit Technologien, die auf in vivo Immunisierung basieren, aufgrund von immunologischen Toleranzmechanismen nicht oder nur schwer möglich ist (Hoogenboom et al. 1998).



**Abbildung 3:** Methoden zur Herstellung monoklonaler Antikörper. Rechts: Herstellung durch humane Hybridomas. Links: Herstellung mittels Phagedisplay. Übernommen aus Brekke and Sandlie (2003). Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature (über RightsLink® Copyright Clearance Center).

### 1.2.2 Anwendungsgebiete monoklonaler Antikörper

Voranehend wurden bereits Beispiele für Anwendungsgebiete monoklonaler Antikörper bei integrinassoziierten Krankheitsbildern beschrieben. Diese machen nur einen geringen prozentualen Anteil an den insgesamt entwickelten Antikörpern aus: Von 131 humanen monoklonalen Antikörpern, die von 1996 bis 2010 in klinische Studien eintraten, wurden 59 (45%) als Krebstherapien, 36 (28%) als Therapien für rheumatische und Autoimmunerkrankungen und weitere 36 (28%) für andere Indikationen entwickelt. Von den 59 antineoplastischen monoklonalen Antikörpern erreichten lediglich zwei (3,4%) die Zulassung durch die Food and Drug Administration (FDA). Die kumulative Zulassungsrate für humane monoklonale Antikörper betrug im genannten Zeitraum 17,5%. Berechnet man sie plattformabhängig, ergeben sich 29% für humane monoklonale

Antikörper aus Hybridomas von transgenen Mäusen und 12,5% aus phagedisplaybasierten Technologien. Es muss dabei beachtet werden, dass die Anzahl der mittels Phagedisplay entwickelten monoklonalen Antikörper in diesem Zeitraum noch geringer war (Nelson et al. 2010).

## 1.3 Thrombozytopenien

### 1.3.1 Definition und Ätiologie

Eine akute Thrombozytopenie ist definiert als ein Abfall der Thrombozytenzahl unter 30 000/ $\mu$ l. Ursache dafür ist meist eine Bildungsstörung im Knochenmark oder ein gesteigerter peripherer Umsatz. Diese entstehen aus einer Knochenmarkschädigung oder -infiltration. Medikamente, Strahlen oder akute Virusinfektionen können dessen Funktion einschränken. Ebenso kann eine Infiltration durch einen soliden Tumor oder häufiger durch Leukämien oder Lymphome die Bildung von Thrombozyten einschränken. Häufigste Ursache für deren gesteigerten Umsatz sind Immunthrombozytopenien. Dabei entstehende Allo- und Autoantikörper gegen Antigene auf Thrombozyten führen zu einer Opsonierung. Die Epitope der häufigsten Allo- als auch Autoantikörper liegen auf dem Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (Herold 2018).

### 1.3.2 Alloimmunthrombozytopenien (*Glanzmann-Thrombastenie & Neonatale Alloimmunthrombozytopenie*)

Alloantikörper entstehen, wenn eine Immunisierung gegen ein für den Körper fremdes Antigen, das von einem anderen Organismus derselben Spezies stammt, stattfindet. Integrin assoziierte Beispiele hierfür sind die Glanzmann-Thrombastenie (GT) und die Neonatale Alloimmunthrombozytopenie (NAIT) (Nurden 2006; Sachs et al. 2012; Peterson et al. 2013; Winkelhorst et al. 2017). GT ist die häufigste vererbte Thrombozyten-Funktionsstörung. Ausgelöst wird sie durch Deletionen oder Insertionen in den Genen, die für die  $\alpha$ IIb- oder die  $\beta$ 3-Integrin-Untereinheiten kodieren und damit zu missense- oder nonsense-Mutationen führen. Klinisch zeigen sich diese in einer erhöhten Blutungsneigung, die je nach spezifischer Form unterschiedlich ausfällt. Leitliniengerechte Therapie bei klinisch relevanten Blutungen ist die Gabe von rekombinantem Faktor VIIa. Thrombozytentransfusionen sollten vermieden werden, weil das auf den Thrombozyten des Spenders natürlich exprimierte Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 vom Immunsystem des Empfängers je nach spezifischer Mutation als verändert oder fremd erkannt wird. Es erfolgt eine Alloimmunisierung mit der Bildung von Alloantikörpern gegen das Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 oder dessen Untereinheiten. Dies führt dazu, dass Transfusionen keine langfristige Therapieoption darstellen und nur in Notfällen zur schnellen Stillung von Blutungen verwendet werden sollten (Nurden 2006; Nurden et al. 2013).

Bei der NAIT handelt es sich um die häufigste Ursache von Thrombozytopenien bei sonst gesunden Feten und Neugeborenen (Peterson et al. 2013; Winkelhorst et al. 2017). Leichte Verläufe zeigen sich klinisch oft mit Hauteinblutungen und/oder Petechien. 10–20% der Fälle zeigen schwere Verläufe, die mit intrakraniellen Blutungen (ICH) einhergehen (Sachs et al. 2012; Peterson et al. 2013). Verantwortlich für den Mangel an

Thrombozyten sind mütterliche Anti-HPA-Antikörper. Deren Antigene liegen auf den membranständigen thrombozytären Glykoproteinen. Sie entstehen durch genetische Polymorphismen in den Genen der Glykoproteine. Insgesamt entstehen die Antigene des Human-Platelet-Antigen-Systems (HPA) durch mindestens 27 unterschiedliche Punktmutationen (meist Substitutionen). In 75-85% der NAIT-Fälle (je nach Zentrum und Studie) handelt es sich um Antikörper gegen das HPA-1a-Antigen. Dieses entsteht durch eine Leucin/Prolin-Substitution an Position 33 in der PSI-Domäne der  $\beta$ 3-Untereinheit des Integrins  $\alpha$ I**II** $\beta$ 3. 98% aller Frauen tragen diese Punktmutation und sind damit HPA-1a-positiv. NAIT durch Antikörper gegen HPA-1a kann nur auftreten, wenn die Mutter HPA-1a-negativ (HPA-1bb) und der Vater positiv (HPA-1aa oder HPA-1ab) ist. Eine Immunisierung der Schwangeren tritt auf, wenn der Fetus das Merkmal HPA-1a von seinem Vater ererbt hat (Sachs et al. 2012; Peterson et al. 2013). Es ist noch nicht geklärt, ob die Schwangere durch Übertritt fetaler Thrombozyten in die mütterliche Zirkulation oder durch Expression des  $\beta$ 3-Integrins an Zellen der Plazenta (z.B. am Synziotrophoblasten) immunisiert wird. Im Gegensatz zur hämolytischen Erkrankung beim Fetus und Neugeborenen kann es bereits bei der ersten Schwangerschaft zu einer Immunisierung kommen (Sachs et al. 2012).

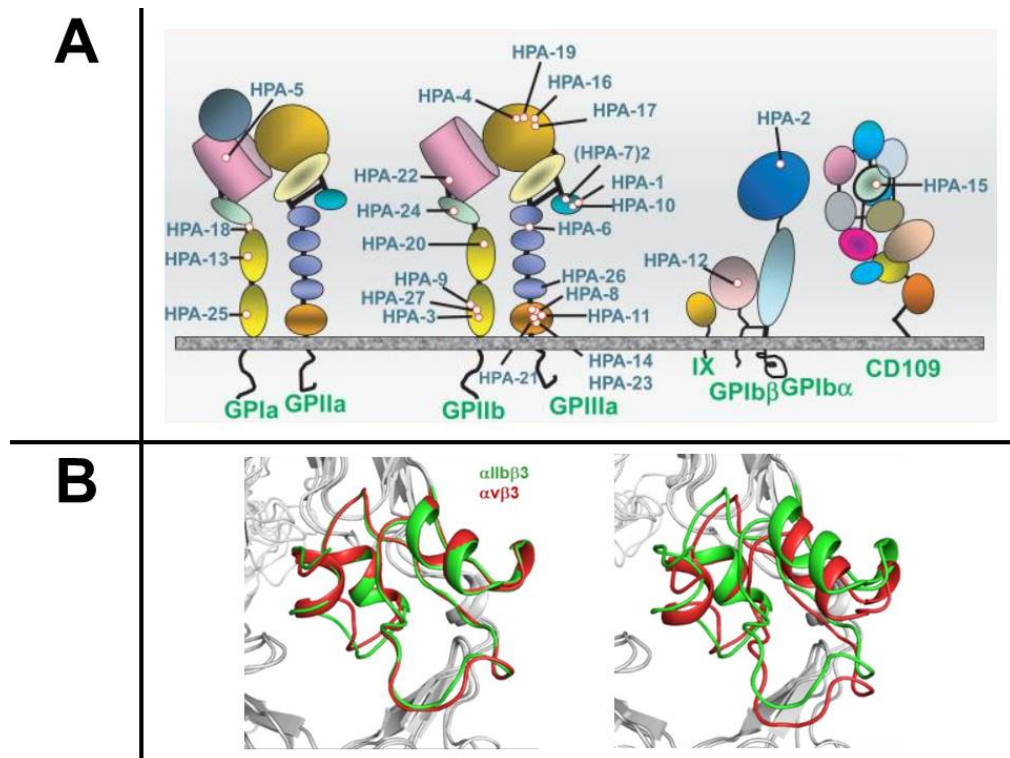
Die Diagnose NAIT wird in der Regel erst klinisch bei Geburt des ersten Kindes mit Blutungszeichen und niedriger Thrombozytenzahl gestellt (Winkelhorst et al. 2017). Ein Routine-Screening auf mütterliche Anti-HPA-Antikörper während der Schwangerschaft mittels Solid-Phase-Immunoassays oder Durchflusszytometrie wurde bisher nicht in die Mutterschaftsvorsorge eingeführt, da es noch nicht möglich ist, prospektiv diejenigen Schwangeren zu erkennen, bei denen das Risiko einer klinisch relevanten fetalen Blutung, insbesondere einer ICH, besteht. In vielen Studien zeigte sich kein Zusammenhang zwischen dem Titer der Anti-HPA-Antikörper und dem Schweregrad fetaler/neonataler Blutungen. Ein serologisch schwacher Antikörper kann mit Fällen von ICH einhergehen, während ein vergleichbar starker Antikörper nur Hauteinblutungen verursacht (Tiller et al. 2009; Kamphuis et al. 2010; Bakchoul et al. 2011; Sachs et al. 2012). Bei klinisch relevanter neonataler Thrombozytopenie und/oder Blutungen wird das Neugeborene mit HPA-kompatiblen Thrombozytenkonzentraten transfundiert (Sachs et al. 2012; Winkelhorst et al. 2017). Eine Folgeschwangerschaft sollte unter Überwachung von mit dem Krankheitsbild vertrauten Ärzten erfolgen. Mittels mehrerer Methoden wird eine Risikostratifizierung durchgeführt, die sich vornehmlich auf die Wahrscheinlichkeit für ICH des Feten/Neugeborenen bezieht. Es sollte eine Genotypisierung des Vaters erfolgen, um festzustellen ob dieser hetero- oder homozygot positiv für HPA 1a ist (Sachs et al. 2012; Peterson et al. 2013). Ist der Vater homozygot positiv ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Inkompatibilität besteht 100%, bei heterozygotem Genotyp liegt die Wahrscheinlichkeit bei 50%. In diesem Fall kann der fetale Genotyp nicht-invasiv aus zellfreiem mütterlichen Plasma bestimmt werden (Wienzek-Lischka et al. 2015). Zusätzlich sollte mittels Solid-Phase-Immunoassays wie dem MAIPA oder MACE getestet werden, ob und mit welchem Titer sich Anti-HPA-Antikörper im mütterlichen Serum befinden. Invasive diagnostische Maßnahmen, z. B. Nabelschnurpunktionen werden heute nicht mehr empfohlen (Sachs et al. 2012).

Es wurden verschiedene Algorithmen mit vorangehend beschriebenen Untersuchungen in der 12., 24. und 30. Schwangerschaftswoche ausgearbeitet und Therapieempfehlungen daraus abgeleitet. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass, je höher die Risikowahrscheinlichkeit ist, desto früher eine fetale Blutungsprophylaxe mit hochdosiertem intravenösem Immunglobulin (IVIg) eingeleitet werden sollte. IVIg wird in der Regel in einer Dosierung von 1 g/kg Körpergewicht wöchentlich bis zur Entbindung eingesetzt (Winkelhorst et al. 2017).

Neue Ergebnisse legen nahe, dass maternale Anti-HPA-1a Antikörper mehrere Subtypen aufweisen. Dabei konnten neben Alloantikörpern gegen den Integrinkomplex  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 auf Thrombozyten auch endothelspezifische gegen  $\alpha$ V $\beta$ 3 nachgewiesen werden. Neben diesen Verbund-abhängigen (compound-dependent) Antikörpern können ebenfalls Antikörper entstehen, die unabhängig von dem Integrinkomplex mit der  $\beta$ 3-Untereinheit reagieren. Die Kombination der HPA-1a-positiven  $\beta$ 3 Untereinheit mit der  $\alpha$ IIb- oder  $\alpha$ V-Untereinheit führt zu jeweils unterschiedlichen Konformationsveränderungen in der PSI-Domäne, wodurch unterschiedliche Epitope des Alloantigens HPA-1a entstehen. Antikörper gegen  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 und  $\beta$ 3 lassen sich im maternalen Serum von leichten NAIT-Fällen nachweisen. In klinisch schweren Fällen mit ICH konnten neben den zuvor genannten auch Antikörper gegen  $\alpha$ V $\beta$ 3 nachgewiesen werden. Diese wirken antiangiogen, indem sie die Bindung von Vitronectin an Endothelzellen blockieren und Caspase-3-getriggerte Apoptose auslösen. Es ist anzunehmen, dass der so entstandene Endothelschaden die Ursache für die Entstehung von ICHs bei NAIT-Fällen ist. Diese Ergebnisse legen nahe, Verbund-spezifische Anti- $\alpha$ V $\beta$ 3-Antikörper zur Risikostratifizierung in der Therapie von NAIT zu nutzen (Santoso et al. 2016).

<b>Antigen</b>	<b>Alias</b>	<b>GP</b>	<b>Punktmutation</b>	<b>Erstbeschreiber</b>
HPA-1a/b	Pl <sup>a/b</sup>	GPIIIa	L33P	Newman et al. (1989)
HPA-2a/b	Ko <sup>b/a</sup>	GPIba	T145M	Kuijpers et al. (1992)
HPA-3a/b	Bak <sup>a/b</sup>	GPIIb	I843S	Lyman et al. (1990)
HPA-5a/b	Br <sup>b/a</sup>	GPIa	GPIa	Santoso et al. (1993)
HPA-15a/b	Zav, Gov <sup>a/b</sup>	CD109	S703Y	Schuh et al. (2002)

**Tabelle 1:** Übersicht über die häufigsten NAIT-assoziierten HPA-Antigene. Modifiziert nach Peterson et al. 2013. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons (Genehmigung über RightsLink® Copyright Clearance Center).



**Abbildung 4:** HPA-Antigene. A: Übersicht und Lokalisation der bekannten HPA-Antigene. Modifiziert nach Peterson et al. 2013. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons (über RightsLink® Copyright Clearance Center). B: Unterschiedliche Konformationen der PSI-Domäne abhängig von der kombinierten  $\alpha$ -Untereinheit. Übernommen aus Santoso et al. (2016). Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health Inc. (über RightsLink® Copyright Clearance Center).

#### 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung eines B-Zell-Enzyme Linked Immuno Spot-Assays (ELISpot) zur Detektion von Antikörpern gegen  $\beta 3$ -Integrine. Mütterliche Antikörper gegen das humane HPA-1a sind die häufigste Ursache der NAIT. Das Antigen HPA-1a ist durch einen Aminosäureaustausch in der  $\beta 3$ -Integrinkette charakterisiert. Kürzlich konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass bestimmte mütterliche anti-HPA-1a Antikörper mit fetaler Hirnblutung assoziiert sind. Diese Antikörper reagieren mit dem Vitronektin-Rezeptor ( $\alpha V\beta 3$ -Integrin) und induzieren eine funktionelle Störung des Endothels. Dieser Subtyp von anti-HPA-1a Antikörpern wurde bei Müttern von Neugeborenen ohne Hirnblutung nicht gefunden. Bei Müttern von Neugeborenen ohne Hirnblutung wurden Antikörper nachgewiesen, die gegen den Fibrinogen-Rezeptor ( $\alpha IIb\beta 3$ ) gerichtet sind. Die beiden Antikörper-Subtypen erkennen die  $\beta 3$ -Integrin-Kette im Verbund mit einer jeweils anderen  $\alpha$ -Kette und sind damit Verbund-abhängige (compound-dependent) Antikörper. Ein weiterer Antikörper-Subtyp erkennt das HPA-1a Antigen auf der  $\beta 3$ -Integrin-Kette unabhängig von dem Verbund mit einer  $\alpha$ -Kette. Da Antiseren von Müttern mit FNAIT immer ein polyklonales Gemisch zahlreicher Antikörpermoleküle repräsentieren, ist die Gewinnung und Charakterisierung von

murinen und humanen monoklonalen Antikörpern für die Pathogeneseforschung, für die Entwicklung von Nachweisverfahren zur Risikostratifizierung sowie zur Entwicklung neuer Medikamente zur Prophylaxe fetaler Blutungen unverzichtbar.

Mittels B-Zell-ELISpot-Assay können einzelne, Antikörper-sezernierende Zellen in einer Mikrotiterplatte *in situ* nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese untersucht, dass der B-Zell-ELISpot-Assay ein geeignetes Verfahren zur Charakterisierung von Hybridomzellen und damit zur Entwicklung neuer monoklonaler Antikörper gegen  $\beta$ 3-Integrine darstellt. In einer zweiten Phase sollte untersucht werden, ob das gleiche Nachweisverfahren auch zum quantitativen Nachweis von Antikörper-sezernierenden Zellen aus Blutproben von Patienten, und damit zur Bestimmung des Risikos einer fetalen Hirnblutung bei Schwangeren mit NAIT, geeignet ist.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte, Kleinmaterial, Kits, Chemikalien, Proteine, Zelllinien und Antikörper

Gerät	Hersteller
Brutschrank	Hareues, Hanau
Feinwaage	AE 100; Mettler, Gießen
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer	Ikamag RET; Janke & Kunkel, Staufen
Sterilbank	HeraSafe, Heraeus, Hanau
Durchflusszytometer	BD FACSCanto II
Vortex-Schüttler	VF2; Janke & Kunkel, Staufen
Wasserbad	Gesellschaft für Laborgeräte, Burgwedel
Zentrifugen	Biofuge A und Biofuge 22 R; Heraeus, Hanau Rotixa/a und Rotanata/TRC, Hettich, Tuttlingen
Kleinmaterial	Hersteller
Pipettenspitzen	Filtertips 10 µl, 100 µl, 1000 µl; Biozym, Hess. Oldendorf
Einmalpipetten	Steril; Greiner, Frickenhausen
Einfrierampullen	2 ml; Nunc, Wiesbaden-Biebrich
Einmalskalpelle	Steril; Feather, pfm, Köln
Spritzen	20 ml; Braun, Melsungen
Sterilfilter	0,22 µm und 0,45 µm; Sartorius, Göttingen
Zentrifugiertubes	15 ml; Falcon, Heidelberg 30 ml; Falcon, Heidelberg
Zellkulturplatten	Greiner Bio-One 16 Well-Platten, Greiner, Frickenhausen Greiner Bio-One 96 Well-Platten, Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflaschen	250 ml; steril; Sarstaedt, Nümbrecht 40 ml; steril; Nunc, Wiesbaden-Biebrich
FACS-Tubes	Falcon, Heidelberg
Dialyse	Slide-A-Lyzer MINI device 10-100 µl; Thermo Fisher Scientific, Bonn

Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes 0,1-0,5 ml;  
Thermo Fisher Scientific, Bonn

<b>Kits</b>	<b>Hersteller</b>
ELISpot Maus Kit	Mouse IgG ELISpot BASIC (ALP); Mabtech, Nacka Strand, Schweden
ELISpot Human Kit	Human IgG ELISpot BASIC (ALP); Mabtech, Nacka Strand, Schweden
<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Biotin	Sulfo-NHS-LC-Biotin; Thermo Fisher Scientific, Bonn
PBS	PAN, Aidenbach
Ficoll	Ficoll Paque Plus; GE Healthcare, Little Chalfont, Vereinigtes Königreich
RPMI 1640	GE Healthcare, Little Chalfont, Vereinigtes Königreich
DMSO	Sigma-Aldrich, München
Penicillin/Streptomycin	PAN, Aidenbach
HT-Supplement	Thermo Fisher Scientific, Bonn
HAT-Supplement	Thermo Fisher Scientific, Bonn
FCS	PAN, Aidenbach
HEPES-Puffer (1M)	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Interleukin-2	Mabtech, Nacka Strand, Schweden
R848	Mabtech, Nacka Strand, Schweden
Gamunex	Talecris, Deutschland
Pacific Blue Annexin V	Biolegend, Koblenz
7-AAD Viability Staining Solution	Biolegend, Koblenz
Trypanblau	Sigma-Aldrich, München
<b>Proteine</b>	<b>Hersteller</b>
$\alpha$ IIb $\beta$ 3	Recombinant Human Integrin alpha 2b beta 3 Protein; R&D Systems Minneapolis, USA
$\alpha$ V $\beta$ 3	Recombinant Human Integrin alpha V beta 3 Protein; R&D Systems Minneapolis, USA
CD177	Laborbestand
BSA	Bovine Serum Albumin (BSA); PAN, Aidenbach



<b>Zelllinien</b>	<b>Hersteller</b>
Gi5	Laborbestand
Gi16	Laborbestand
7D8	Laborbestand
AP3	ATCC® HB-242™; Manassas, USA

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
FITC anti-human CD19	Biologend, Koblenz
PE anti-human CD3	Biologend, Koblenz
APC anti-human CD38	Biologend, Koblenz

**Tabelle 2:** Übersicht über die verwendeten Materialien.

## 2.2 Isolation von PBMCs randomisierter Blutspender

Randomisierten Blutspendern und ausgewählten anonymisierten Patienten mit gesicherter Diagnose wurden Ethylendiamintetraessigsäure-(EDTA)Blutproben entnommen. Dies geschah in Übereinstimmung mit dem Ethikvotum bezüglich Blutresten von Blutspendern (AZ 05/00 „Untersuchungen an Restblut, das zum Verwurf vorgesehen ist“) und dem Ethikvotum für die Verwendung von Blutproben von Patienten (AZ 78/14 „Nachweis zirkulierender Antikörper-sezernierender B-Lymphozyten bei Patienten mit Allo- und Autoimmunthrombozytopenien“). Die Fraktion der peripheren mononukleären Zellen (PBMC) wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Die Proben wurden am selben Tag bearbeitet, um eine maximale Ausbeute an Zellen und Vitalität zu gewährleisten. In ein 15 ml Falcon-Tube (Falcon, Heidelberg) wurden 3 ml Ficoll-Paque (GE Healthcare, Little Chalfont, Vereinigtes Königreich) pipettiert und anschließend 5 ml Vollblut darüber geschichtet. Anschließend wurden die Tubes mit 450 g für 30 Minuten ohne Bremsung zentrifugiert. Der sich dadurch gebildete Buffy Coat wurde mittels Pipetten abgenommen und in phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) (PAN, Aidenbach) aufgenommen. Um Reste an Thrombozyten auszuwaschen, wurden anschließend zwei weitere Waschschriffe durchgeführt. Dabei wurden die Tubes mit 450 g für fünf Minuten mit voller Bremsung zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen entweder kryokonserviert oder in Kultur genommen.

## 2.3 Zellkultur von Hybridomas und PBMCs

### 2.3.1 Hybridomzelllinien

Für diese Arbeit wurden die Hybridomzelllinien Gi5, Gi16, AP3 und 7D8 verwendet. Gi5 und Gi16 produzieren einen monoklonalen Antikörper gegen das Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Die Hybridomzelllinien wurden hergestellt und charakterisiert wie zuvor beschrieben

(Santoso et al. 1984; Kiefel et al. 1987; Santoso et al. 1989). Das Epitop von Gi16 befindet sich auf der  $\alpha$ IIb-Untereinheit. Bei Gi5 handelt es sich um einen Verbund-abhängigen (compound-dependent) Antikörper gegen  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. AP3 produziert einen Antikörper gegen die  $\beta$ 3-Untereinheit (Newman et al. 1985). Der von 7D8 produzierte Antikörper richtet sich gegen CD177, wobei es sich um ein granulozytäres Oberflächenprotein handelt. Die Hybridomzelllinie 7D8 wurde freundlicherweise von Dr. Stroncek (Transfusion Medicine Department, NIH, Bethesda, USA) zur Verfügung gestellt (Stroncek et al. 1996).

### **2.3.2 Hybridomzellkultur**

Die Zellen wurden schnellstmöglich in einem Wasserbad mit 37°C bis zum Eiskern aufgetaut und anschließend unter sterilen Bedingungen in ein Falcon Tube gegeben. Dieses wurde mit HT- oder HAT-Medium aufgefüllt. Als Medium wurde RPMI 1640 (GE Healthcare, Little Chalfont, Vereinigtes Königreich) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) (PAN, Aidenbach) und 1% Penicillin/Streptomycin (PAN, Aidenbach) versetzt. Hierzu wurde je nach Bedarf entweder 2% HT- oder HAT-Supplement (Thermo Fisher Scientific, Bonn) hinzugefügt. In einem einmaligen Waschschrift wurde das Dimethylsulfoxid (DMSO) des Einfriermediums entfernt. Die Zellen wurden erneut aufgenommen und mit Hilfe von Trypanblau (Sigma-Aldrich, München) und einer Neubauer-Zählkammer gezählt und in Aliquote von Zellen auf 16-Well-Zellkulturplatten (Greiner, Frickenhausen) ausgesät. Die ersten Passagen der Zellkultur fanden in HAT-Medium statt, um nicht fusionierte oder nicht produktive Klone auszuwählen. Anschließend fanden Passagen in hypoxanthin- und thymidin-haltigem Medium (HT-Medium) statt. Mit entsprechendem Wachstum der Kultur wurden die Zellen schrittweise in 40 ml-(Nunc, Wiesbaden-Biebrich) und später in 250 ml-Suspensionskulturflaschen (Sarstaedt, Nümbrecht) überführt.

### **2.3.3 PBMC-Kultur**

Die Zellen wurden nach der oben beschriebenen Methode isoliert, gezählt und anschließend auf 96-Well-Zellkulturplatten (flat bottom) kultiviert (Greiner, Frickenhausen). Pro Well wurden zwischen 2,5 und 5,0 x 10<sup>5</sup> ausgesät. Die Zellen wurden in einem Medium bestehend aus RPMI 1640 mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin sowie 0,1% HEPES-Puffer (Thermo Fisher Scientific, Bonn) kultiviert. Je nach Experiment wurden dem Medium nach Jahnmatz et al. (2013) 10 ng/ml Interleukin-2 (Human IgG ELISpot BASIC [ALP]; Mabtech, Nacka Strand, Schweden) und 1  $\mu$ g/ml des Toll-Like-Rezeptor-Agonisten (TLR) R848 (Human IgG ELISpot BASIC (ALP); Mabtech, Nacka Strand, Schweden) hinzugefügt. Unabhängig vom experimentellen Ansatz wurden die Zellen für 72 Stunden in einem CO<sub>2</sub>-Inkubator (Hareues, Hanau) zur Differenzierung der B-Zellen inkubiert und anschließend für Experimente verwendet.

## **2.4 Kryokonservierung Hybridomas/PBMCs**

Die isolierten PBMCs oder kultivierten Hybridomas wurden gewaschen, gezählt und je nach Experiment in entsprechende Aliquote eingeteilt. Diese wurden anschließend in ein Medium bestehend aus RPMI 1640 supplementiert mit 1% Penicillin/Streptomycin, 20% FCS und 10% DMSO (Sigma-Aldrich, München) in eine Einfrierampulle (Nunc,

Wiesbaden-Biebrich) aufgenommen. Die Zellen wurden unmittelbar danach mit Hilfe eines ethanolhaltigen Einfrierbehälters mit  $-1^{\circ}\text{C}$  pro Minute auf  $-80^{\circ}\text{C}$  gebracht und anschließend zur langfristigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

## **2.5 Durchflusszytometrie**

Die Experimente wurden an einem BD FACSCanto II durchgeführt. Die folgenden Antikörper wurden für die Experimente verwendet: FITC anti-human CD19 Antibody, PE anti-human CD3 Antibody, APC anti-human CD38 Antibody (Biolegend, Koblenz). Die Vitalität der Zellen wurde mit AnnexinV- und 7AAD-Färbung überprüft (Biolegend, Koblenz). Für alle Versuche wurden entsprechende Isotypen-Kontrollen durchgeführt und die Anzahl der gewerteten Ereignisse lag stets bei  $> 500\,000$ . Die Zellen wurden gemäß der oben beschriebenen Methode isoliert und in eine FACS-Tube (Falcon, Heidelberg) gegeben. Zur Blockierung der Fc-Rezeptoren wurden die Zellen für zehn Minuten bei Raumtemperatur mit  $10\ \mu\text{l}$  Gamunex (IVIG, Talecris, Deutschland) inkubiert und überschüssiges IgG von den Zellen mit PBS abgewaschen. Anschließend wurden je nach Experiment die Antikörper gegen Cluster-of-Differentiation-Moleküle (CD-Moleküle) oder die Vitalitätsmarker hinzugefügt. Die Zellen wurden für 30 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nicht gebundene fluorochrommarkierte Antikörper wurden in einem Waschschritt mit PBS entfernt. Dafür wurden die Zellen mit  $400\ \text{g}$  für fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand abgeschüttet. Die Proben wurden unverzüglich am CantoII gemessen.

## **2.6 Proteine**

Die Integrine  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  und  $\alpha\text{V}\beta 3$  wurden von R&D Systems (Minneapolis, USA) gekauft. Die Proteine wurden in CHO-Zellen exprimiert und den Anweisungen entsprechend in einer Konzentration von  $200\ \mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS gelöst und anschließend mit Biotin markiert. Darauffolgend wurden sie aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Das Rekombinante  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  enthält die  $\alpha\text{IIb}$ -Untereinheit von Met1-Arg993. In der  $\beta 3$ -Untereinheit befindet sich die Sequenz von Gly27-Asp718 und damit die PSI-Domäne, auf der sich das HPA-1a Antigen befindet. In  $\alpha\text{V}$  ist die Sequenz Phe31-Val992 beinhaltet. In beiden Fällen wurde dieselbe Sequenz für die  $\beta 3$ -Untereinheit verwendet. Das verwendete CD177 wurde wie bereits in Sachs, Ulrich J H et al. (2007) beschrieben hergestellt. Als Negativkontrolle für die Proteinbindung der Antikörper wurde BSA (PAN, Aidenbach) verwendet.

### **2.6.1 Biotinmarkierung**

Die verwendeten Proteine wurden entsprechend den Empfehlungen des Herstellers mit  $10\ \text{mM}$  Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Fisher Scientific, Bonn) markiert. Dafür wurden die Proteine in PBS gelöst und eine den Aminogruppen des Proteins entsprechende Menge der  $10\ \text{mM}$ -Biotinlösung hinzugefügt und inkubiert. Nach einer Stunde Inkubation im Rotator bei Raumtemperatur wurde das überschüssige nicht gebundene Biotin mittels Slide-A-Lyzer™ MINI device ( $10\text{--}100\ \mu\text{l}$ ; Thermo Fisher Scientific, Bonn) gegen PBS dialysiert. Anschließend wurden die Proteine entweder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren oder direkt im Experiment verwendet.

## 2.7 ELISpot-Assay

### 2.7.1 *ELISpot-Assay zur Detektion monoklonaler Antikörper*

Der ELISpot-Assay wurde wie vom Hersteller (Mabtech, Nacka Strand, Schweden) empfohlen mit dem ELISpotBasic Kit Mouse IgG durchgeführt. Sterile weiße MultiScreenHTS IP Filterplatten (Merck Millipore, Darmstadt) wurden mit 70% Ethanol aktiviert, entsprechend den Herstellerangaben gewaschen und über Nacht mit Ziege-Anti-Maus-IgG (Goat-Anti-Mouse, GAM) (15 µg/ml, PBS) bei 4°C beschichtet. In weiteren Waschsritten wurden nicht an die Platte gebundene GAM-Antikörper entfernt. Nach dem Waschen mit PBS wurde die Platte mit RPMI-Medium plus 10% FCS blockiert. Aliquote von Hybridomzellen (500–1000 Zellen) wurden in HT-oder HAT-Medium auf die Platte gegeben und bei 37°C für 24 Stunden in einem Brutschrank zur Produktion von IgG-Antikörpern inkubiert. Die Zellen und nicht an die Fänger-Antikörper gebundenes Maus-IgG wurden im folgenden Waschschrift mit PBS entfernt. Danach wurden gebundene Maus-IgG-Antikörper unter Verwendung biotinylierter rekombinanter Proteine nachgewiesen. Deren Bindung wurde mittels mit alkalischer Phosphatase (ALP) markiertem Streptavidin und Substrat (BCIP/NBT) sichtbar gemacht. In einem alternativen Ansatz (Total-IgG) wird anstatt des biotinylierten Proteins ein biotinylierter GAM-Antikörper hinzugegeben. Diese Bindung wird ebenfalls durch ALP-markiertes Streptavidin und Substrat sichtbar gemacht.

### 2.7.2 *ELISpot-Assay zur Detektion humaner Antikörper*

Der ELISpot-Assay wurde ebenfalls wie vom Hersteller (Mabtech, Nacka Strand, Schweden) empfohlen mit dem ELISpotBasic Kit Human IgG durchgeführt. Es wurden ebenfalls sterile weiße MultiScreenHTS IP Filterplatten (Merck Millipore, Darmstadt) mit 70% Ethanol aktiviert und entsprechend den Herstellerangaben gewaschen. Hierbei wurden die Platten mit Ziege-Anti-Human-IgG (Goat-Anti-Human, GAH) (15 µg/ml, PBS) als Fänger-Antikörper bei 4°C beschichtet. Nach mit dem vorhergehenden Assay identischen Wasch- und Blockierungssritten wurden die PBMCs aus der Stimulationskultur entnommen, im Medium befindliche Antikörper zuvor mittels eines Waschsritts in PBS entfernt und in Aliquoten von 200 000 bis 500 000 auf die Platten aufgebracht. Die Zellen wurden in frischem Medium mit oder ohne Immunstimulatoren bei 37°C für 24 Stunden in einem Brutschrank zur Produktion von IgG-Antikörpern inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden gebundene IgG-Antikörper unter Verwendung biotinylierter rekombinanter Proteine nachgewiesen. Deren Bindung wiederum mittels ALP-markiertem Streptavidin und Substrat (BCIP/NBT) gezeigt werden konnte. Bis auf die Verwendung eines biotinylierten GAH-Antikörpers ist die Bestimmung des Total-IgG ebenfalls identisch.

## 2.8 Statistische Auswertung

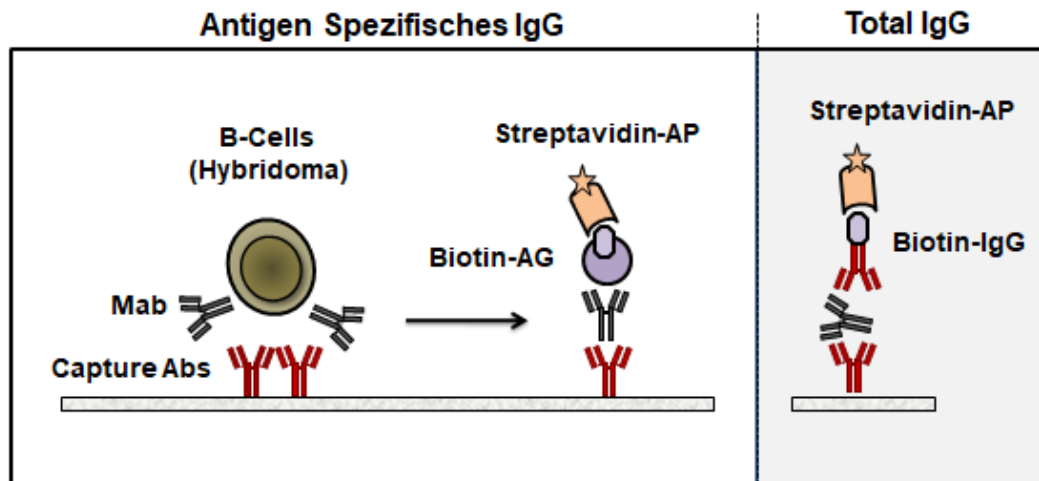
Alle Experimente wurden statistisch mit Graph Pad Prism Version 6 oder 7 ausgewertet. Bei allen Daten wurde aufgrund einer nicht ausreichenden Stichprobengröße davon ausgegangen, dass keine Normalverteilung vorliegt. Daher wurde grundsätzlich für den Vergleich von zwei Gruppen auf einen statistisch signifikanten Unterschied der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test eingesetzt. Für den Vergleich von mehr als 2 Gruppen auf

statistische Signifikanz gegen eine Negativ-Kontrolle wurde ein Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's Multiple Comparison-Test als Post-Hoc-Analyse verwendet. Beim Kruskal-Wallis-Test handelt es sich um eine modifizierte Varianzanalyse für nicht normalverteilte Daten. Sphärizität wurde grundsätzlich nicht angenommen. Der Post-Hoc-Test wurde gewählt, da er sämtliche Gruppen gegen eine Kontrollgruppe auf signifikanten Unterschied testet und auf nicht normalverteilte Daten anwendbar ist. Das Signifikanzniveau wurde für alle Tests auf  $\alpha < 5\%$  festgelegt. Die jeweiligen P-Werte werden symbolisch in den Abbildungen angegeben (\*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$ , \*\*\*\*  $P \leq 0.0001$ ). In allen Abbildungen sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen gekennzeichnet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Etablierung eines B-Zell-ELISpot-Assays zur Detektion von monoklonalen Antikörpern gegen $\beta$ 3-Integrine mit Hybridomzellen

Zur Entwicklung eines B-Zell-ELISpot-Assays zur Detektion von Antikörpern gegen  $\beta$ 3-Integrine wurde zunächst aufgrund begrenzter Patientenverfügbarkeit für die Studie ein Hybridommodell entwickelt (Maenner et al. 2016). Es wurden zwei verschiedene Aufbauformen des Assays zur Beantwortung unterschiedlicher Fragestellungen konzipiert: Zum einen eine Variante, die die Detektion von antigenspezifischem IgG erlaubt, zum anderen eine, die alle produzierten IgG-Moleküle detektiert, unabhängig von deren Antigen-Bindungseigenschaften (Total-IgG). Alle Reagenzien entstammten dem ELISpot-Kit für Maus-IgG von Mabtech und das Design des Assays zur Detektion monoklonaler Antikörper gegen  $\beta$ 3-Integrine basiert auf den Ergebnissen von Jahnmatz et al. (2013). In beiden Varianten des Assays wurde eine PVDF-Membran mit Ethanol aktiviert und mit GAM beschichtet, die als ‚Fänger‘-Antikörper für den zu detektierenden Analyt genutzt werden. Um Artefakte zu verhindern, wurden freie Stellen auf der PVDF-Membran mit verdünntem FCS geblockt. Kultivierte Hybridomzellen wurden nach Entnahme aus der Kultur gereinigt, gezählt und je nach Experiment in unterschiedlicher Anzahl für 24 Stunden auf der aktivierten und beschichteten Membran inkubiert. Durch den Waschschrift wurde Kontamination durch bereits in der Kultur synthetisierte Antikörper verhindert. Die innerhalb der 24 Stunden Inkubation von den Zellen synthetisierten Antikörper wurden durch die GAM-‚Fänger‘-Antikörper fixiert. Nach dem intensiven Waschen der Platte und damit der Entfernung von Hybridomzellen wurden je nach Aufbauform des Assays unterschiedliche Detektionssysteme verwendet. Im antigenspezifischen Ansatz wurde das zu detektierende Antigen als rekombinantes Protein eingesetzt und mit Biotin markiert. Die Menge des verwendeten Biotins wurde dem Molekulargewicht der Proteine angepasst und überschüssiges, nicht gebundenes Biotin ausdialysiert. Die Proteine wurden je nach Experiment und Art in verschiedenen Konzentrationen auf die Membran gegeben und banden dort spezifisch die immobilisierten Antikörper. Für den Total-IgG-Ansatz wurde am Fc-Teil mit Biotin markiertes GAM-IgG verwendet. Dieses bindet in einer klassischen Sandwich-Konfiguration an das gesamte auf der Membran befindliche immobilisierte IgG. Sowohl für die Bindung von biotin-markierten Proteinen zur Detektion von antigenspezifischem IgG als auch für jene von biotin-markiertem GAM zur Detektion des Total-IgG wurde ALP-markiertes Streptavidin eingesetzt. Dieses bindet spezifisch an das Biotin. Durch die Zugabe eines Substrates, das durch die ALP umgesetzt wird, entsteht an der jeweiligen Stelle der Membran eine punktförmige farbliche Reaktion. Diese ‚Spots‘ wurden einheitlich für alle Experimente mit einer Konfiguration an einem Bioreader 4000 der 8. Generation ausgewertet. Die genauen Angaben über Konzentration und die verwendeten Reagenzien können dem Abschnitt 2 (Material und Methoden) entnommen werden.



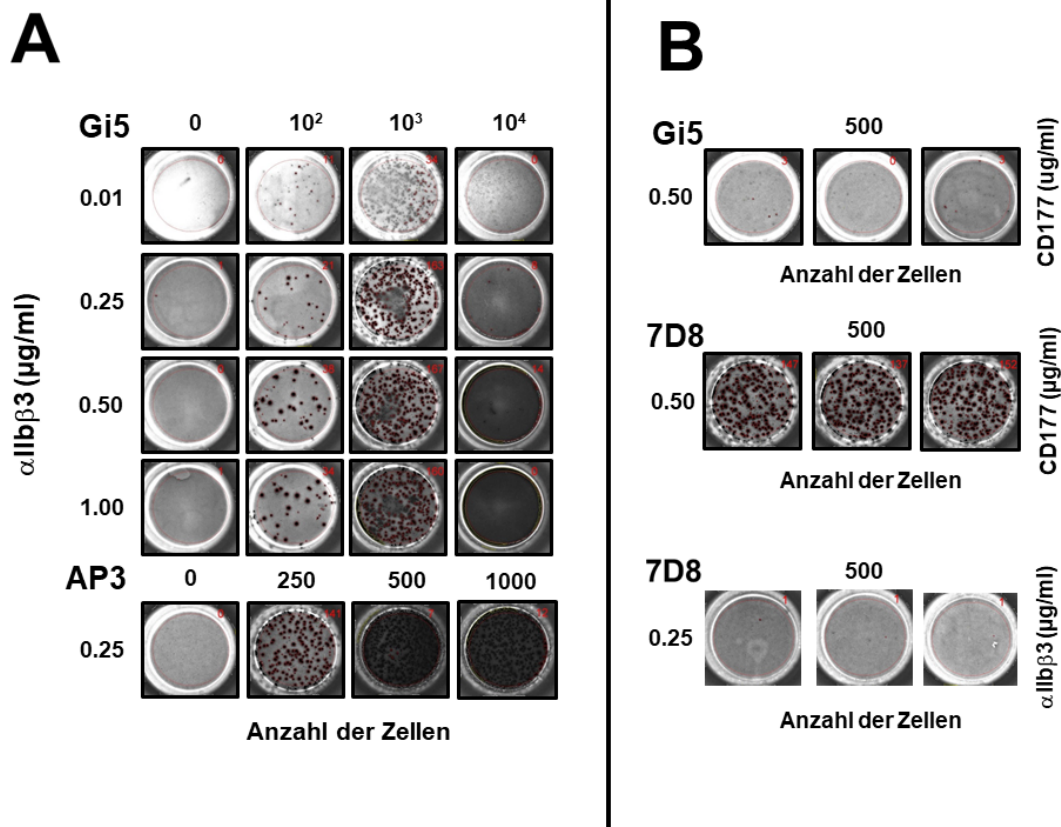
**Abbildung 5:** Schematische Darstellung des B-Zell ELISpot Assays zur Detektion von Antikörpern gegen  $\beta 3$ -Integrinen mit Hybridomzellen. Eine PVDF-Membran wird mit Fänger-Antikörpern (Abs) beschichtet. Nach Inkubation werden nicht gebundene monoklonale Antikörper (Mab) abgewaschen. Gebundene Mabs werden mittels biotinyliertem Antigen (Ag) detektiert. Diese Bindung wird mit Alkalischer Phosphatase (AP) und Substrat auf der Membran als Spot sichtbar gemacht. Total IgG ermöglicht die Detektion aller IgG Antikörper auf der Membran, unabhängig vom Antigen. Übernommen aus Maenner et al. 2016.

### 3.2 Titrationsversuche zur Evaluation optimaler Bedingungen zur Detektion von antigenspezifischem monoklonalem IgG gegen $\beta 3$ -Integrine

Eine Schachbretttitration für die beiden in dieser Studie verwendeten Hybridomzelllinien Gi5 und AP3 wird in Abb. 6A (linkes Panel) dargestellt (Maenner et al. 2016). Gi5 produziert einen Verbund-abhängigen (compound-dependent) monoklonalen Antikörper gegen das Integrin  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  (Santoso et al. 1984; Santoso et al. 1989). Die Zelllinie AP3 produziert einen nicht Verbund-spezifischen monoklonalen Antikörper gegen die  $\beta 3$ -Untereinheit des Integrins  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  (Newman et al. 1985). Auf der X-Achse ist die verwendete Anzahl an Hybridomzellen aufgetragen, die Y-Achse gibt die Konzentration des verwendeten rekombinanten, biotinylierten Integrin  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  in  $\mu\text{g/ml}$  wieder. Es zeigte für beide Zelllinien mit zunehmender Zellzahl ein Überlappen der Spots bis zu einem Punkt, an dem eine Auswertung nicht mehr möglich war. Bei zu geringer Antigenkonzentration zeigte sich ein Verblässen der Spots, was eine Auswertung durch den Reader nicht möglich machte.

Ab einer Konzentration von  $0,25 \mu\text{g/ml}$  konnte eine Sättigung festgestellt werden. Ein vermehrter Background durch erhöhte Konzentration war nicht zu erkennen. Für alle weiteren Experimente wurde für die Zelllinie Gi5 eine Zahl von  $10^3$  Zellen pro Well und eine Konzentration des rekombinanten Integrins von  $0,25 \mu\text{g/ml}$  verwendet. Für die Zelllinie AP3 stellte sich der Überlappungseffekt bereits mit einer geringeren Menge dar,

weshalb hier für alle Experimente 250 Zellen pro Well mit einer Antigenkonzentration von 0,25  $\mu\text{g/ml}$  verwendet wurde. Als Negativ-Kontrolle wurde das rekombinante granulozytäre Glykoprotein CD177 verwendet. Es wurde nach demselben Protokoll wie das Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  biotinyliert. In Abb 6B (rechtes Panel) zeigt sich lediglich ein minimales nicht signifikantes, unspezifisches Signal im Bereich zwischen null und drei Spots nach Inkubation der Platten mit der Integrin- $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -spezifischen Zelllinie Gi5. Zur internen Kontrolle des rekombinanten biotinylierten CD177 wurde das Protein mit der Zelllinie 7D8 getestet. Sie produziert einen monoklonalen Antikörper gegen CD177 (Stroncek et al. 1996). Hierbei sahen wir nach Inkubation mit der gleichen Konzentration CD177 eine deutliche positive Reaktion. Eine unspezifische Reaktion von Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  mit der Zelllinie 7D8 wurde getestet und konnte nicht festgestellt werden. Es wurde ebenfalls eine Negativ-Kontrolle für die Hybridomzelllinie AP3 mit CD177 durchgeführt, die ohne Abweichung verlief.



**Abbildung 6:** Titrationsversuche und Negativ-Kontrollen. A: Titrationsversuche zur Evaluation optimaler Antigenkonzentration und Zellzahl zur Detektion von antigenspezifischen IgG gegen  $\beta\text{3}$ -Integrine.  $n=1$ . B: Negativ-Kontrolle mit dem granulozytären Glykoprotein CD177 und interner Kontrolle mit dem Klon 7D8 (anti-CD177).  $n=3$ . Übernommen aus Maenner et al. 2016.

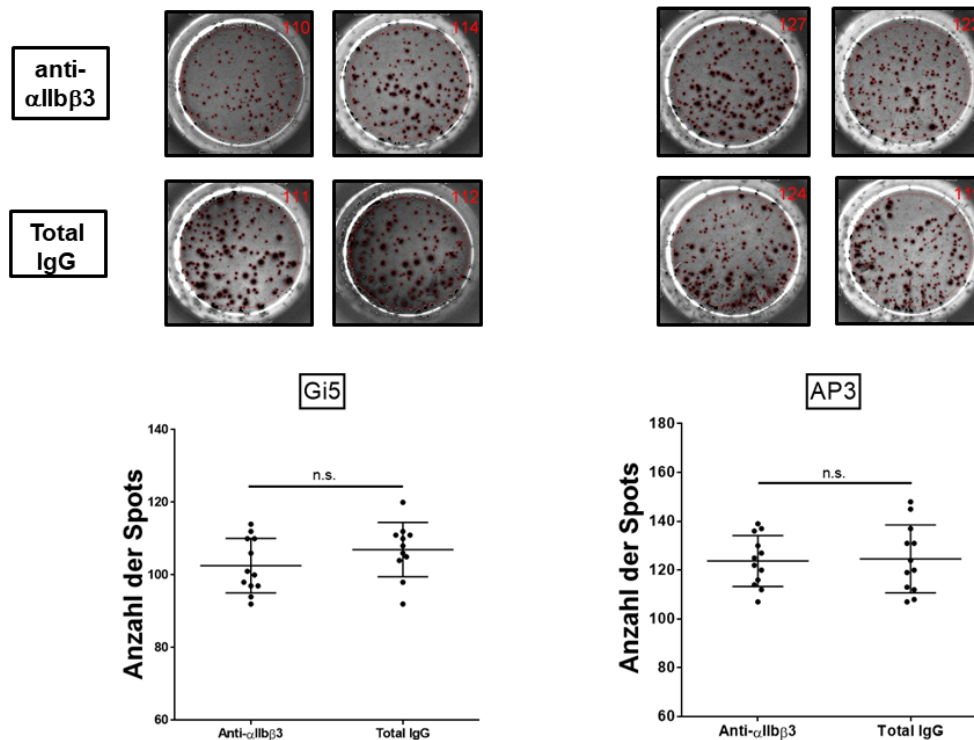


### 3.3 Testung der Spezifität und Sensitivität des ELISpot-Assays zur Detektion von monoklonalen Antikörpern gegen $\beta 3$ -Integrine

#### 3.3.1 Untersuchung der Sensitivität des ELISpot-Assays zur Detektion von monoklonalen Antikörpern

Oben durchgeführte Versuche mit Gi5 und Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 sowie mit 7D8 und  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 wurden wiederholt, um die Intra- und Inter-Assay-Variabilität zu berechnen. Es zeigte sich weiterhin keine unspezifische Detektion von monoklonalen Antikörpern der Zelllinie 7D8 und dem biotinylierten, rekombinanten Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Die Detektion von monoklonalen Antikörpern der Zelllinie Gi5 mit biotinyliertem, rekombinanten Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 war unverändert. Insgesamt konnte eine Intra- von 4,28% (n = 9, Daten nicht gezeigt) und eine Inter-Assay-Variabilität von 6,38% (n = 4, Daten nicht gezeigt) erreicht werden (Maenner et al. 2016).

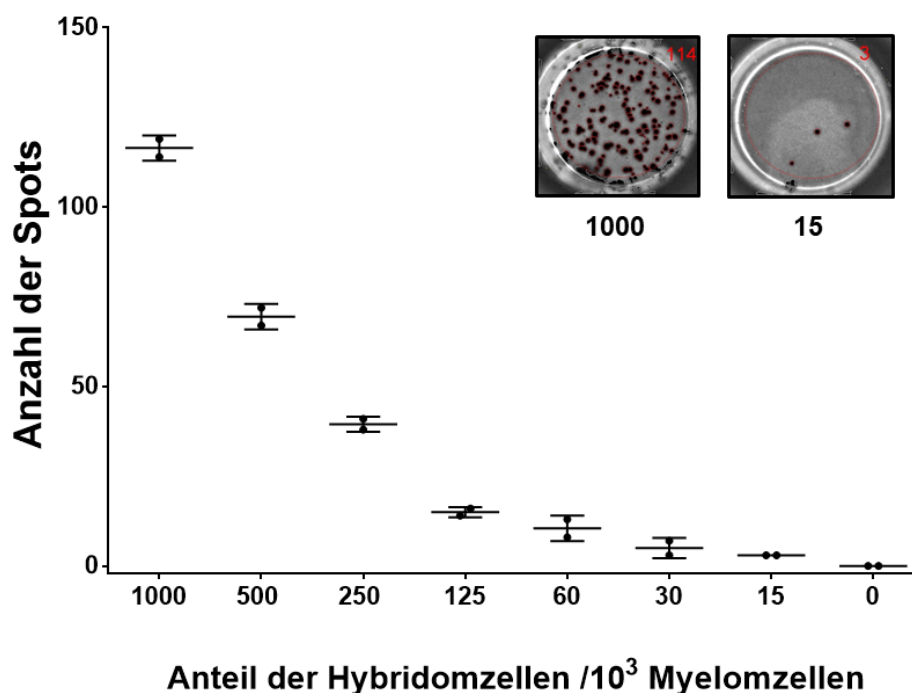
Um zu analysieren, ob der Assay sensitiv genug ist, um alle sezernierten monoklonalen Antikörper mittels des neuartigen Detektionssystems mit biotinylierten Proteinen zu erkennen, wurde die Anzahl der Spots des antigenspezifischen mit dem Total-IgG derselben Zelllinie verglichen. Da es sich beim Detektionssystem des letztgenannten um einen klassischen biotinylierten GAM-Antikörper handelt, eignete sich dies als adäquate Kontrolle für den hier neu etablierten Ansatz. In Abb. 7 wird dies für beide monoklonale Antikörper sezernierenden Zelllinien gegen  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (AP3 und Gi5) gezeigt, im linken Panel der Abbildung für die Verbund-spezifische Zelllinie Gi5 und im rechten für die nicht Verbund-spezifische AP3. Es zeigte sich für beide kein signifikanter Unterschied zwischen dem detektierten antigenspezifischen und Total-IgG (Maenner et al. 2016).



**Abbildung 7:** Vergleich zwischen antigenspezifischem und Total-IgG für die beiden Anti- $\alpha$ Ib $\beta$ 3 sezernierenden Zelllinien Gi5 und AP3. Im linken Panel dargestellt für die Zelllinie Gi5, im rechten für AP3.  $n=11-12$ . Übernommen aus Maenner et al. 2016.

Zur weiteren Abklärung der Sensitivität des Assays wurde ein Grenzverdünnungsversuch durchgeführt. Abb. 8 zeigt dessen Ergebnisse (Maenner et al. 2016). Für jeden Ansatz des Experiments wurde eine Gesamtzahl von  $10^3$  Zellen pro Well gewählt. In absteigender Reihenfolge wurden zu den Hybridomzellen der Zelllinie Gi5 solche der nicht antikörpersezernierenden Myelomzelllinie Ag 8.653 hinzugefügt, so dass die Gesamtmenge in jedem Well stets bei  $10^3$  lag.

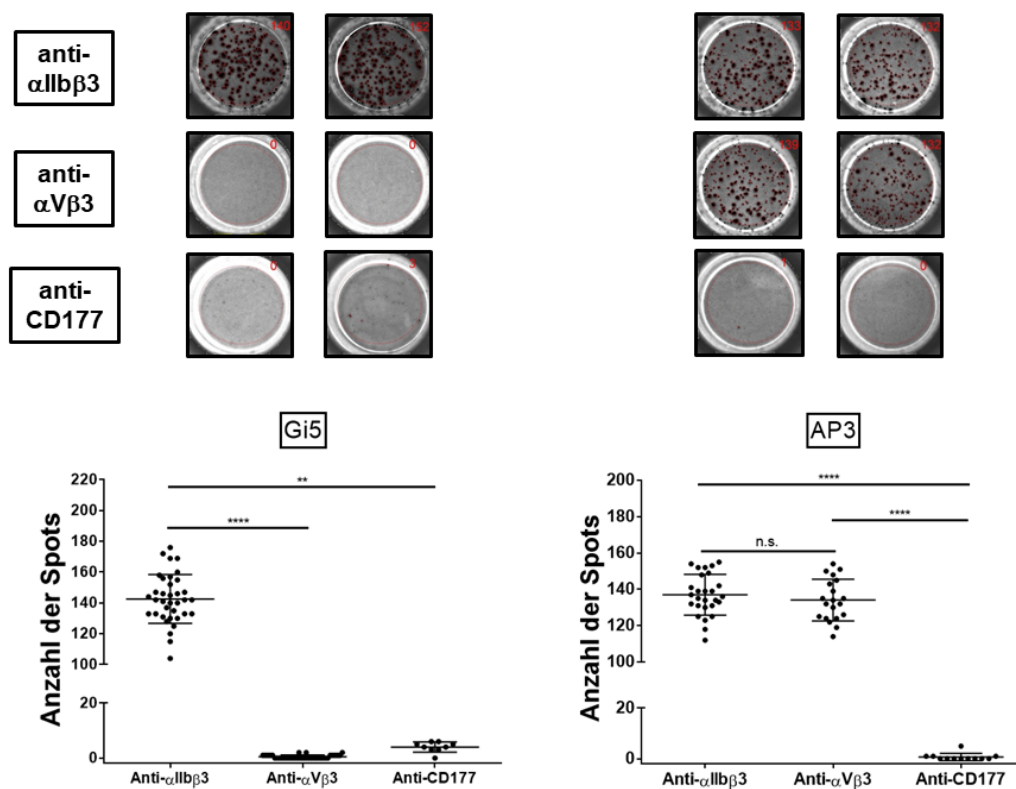
Im ersten Ansatz des Experiments befinden sich  $10^3$  Hybridomzellen. Diese Zahl wurde mit jedem weiteren Durchgang um die Hälfte reduziert und konsekutiv mit Myelomzellen bis zum Erreichen der Gesamtzahl aufgefüllt. Dies wurde in den weiteren Ansätzen fortgeführt. Somit steigt der Anteil an nicht antikörpersezernierenden Ag 8.653-Myelomzellen im Verhältnis zu antikörpersezernierenden Gi5-Hybridomzellen in jedem Ansatz an. Jeder Punkt auf der X-Achse entspricht einem Ansatz. Im letzten Ansatz befinden sich 15 Zellen Gi5 unter 985 Myelomzellen. Jeder Ansatz wurde doppelt durchgeführt. Bis zu einer Untergrenze von 15 Zellen in einer größeren Population nicht antikörpersezernierender Zellen war eine Detektion möglich (Maenner et al. 2016).



**Abbildung 8:** Grenzverdünnungsversuch mit Gi5 und Ag 8.65 zur Bestimmung der Untergrenze der noch detektierbaren Hybridom- in  $10^3$  Myelomzellen.  $n=2$ . Übernommen aus Maenner et al. 2016.

### 3.3.2 Untersuchung der Spezifität des ELISpot-Assays zur Detektion von monoklonalen Antikörpern

Um die Spezifität des Assays zu untersuchen, wurde ein Experiment durchgeführt, dessen Ergebnisse in Abb. 9 dargestellt sind (Maenner et al. 2016). Die beiden bereits in vorherigen Versuchen genutzten Hybridomzelllinien wurden neben ihrer Reaktivität gegenüber dem Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 auch bezüglich jener auf Integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3 in einem ELISpot-Assay getestet. Das rekombinante Integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3 wurde nach der gleichen in Kap. 2 beschriebenen Methode biotinyliert und im Assay verwendet. Die Zelllinie Gi5 produziert einen monoklonalen Antikörper, der Verbund-spezifisch das Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 bindet. Bei AP3 handelt es sich um eine Zelllinie, die einen monoklonalen Antikörper gegen die  $\beta$ 3-Untereinheit aller Integrine sezerniert, der nicht Verbund-spezifisch ist. Im linken Panel von Abb. 9 sind die Ergebnisse für Gi5 abgebildet. Dieser Verbund-spezifische monoklonaler Antikörper reagierte deutlich mit rekombinantem, biotinyliertem Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, jedoch nicht mit  $\alpha$ V $\beta$ 3. CD177 wurde wie in vorherigen Experimenten als Negativ-Kontrolle für unspezifische Reaktionen genutzt. Es zeigte sich keine Reaktion. AP3 reagierte deutlich mit  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 und  $\alpha$ V $\beta$ 3, nicht mit CD177. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der Reaktion von  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 und  $\alpha$ V $\beta$ 3 (Maenner et al. 2016).

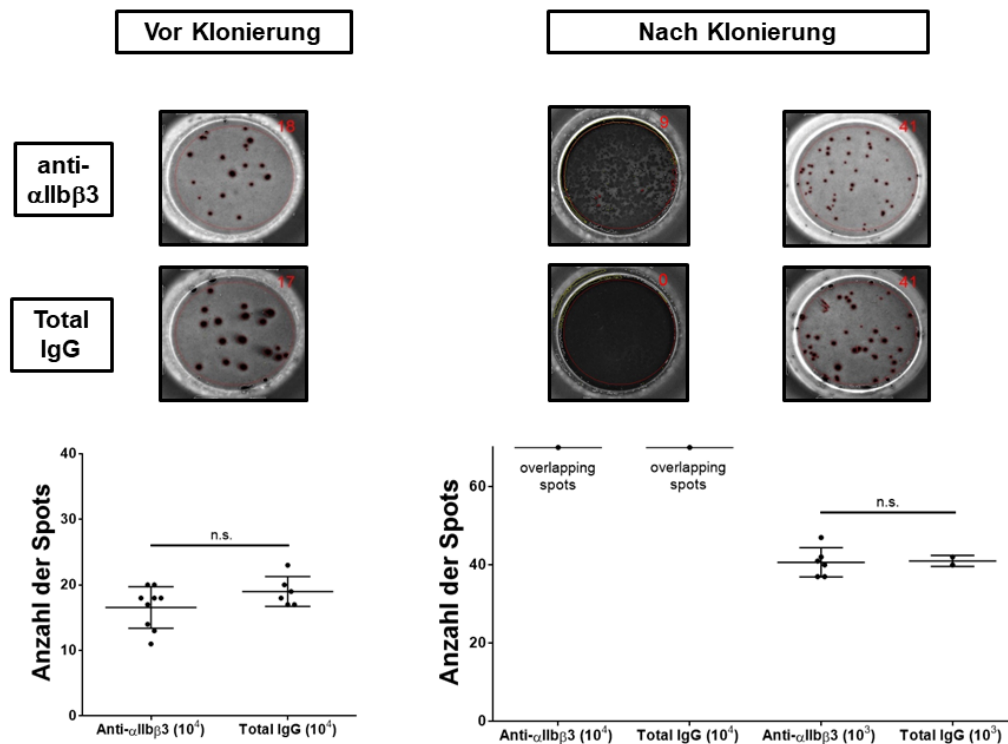


**Abbildung 9:** Spezifitätstestung zur Unterscheidung zwischen Verbund-spezifischen und nicht Verbund-spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen  $\beta 3$ -Integrine. Im linken Panel Testung der Verbund-spezifischen Zelllinie Gi5.  $n=36$  für Anti- $\alpha$ I**Ib** $\beta 3$  und Anti- $\alpha$ V **$\beta 3$** . Im rechten Panel Testung der nicht Verbund-spezifischen Zelllinie AP3.  $n=20-27$  für Anti- $\alpha$ I**Ib** $\beta 3$  und Anti-  $\alpha$ V **$\beta 3$** . Als Negativ-Kontrolle wurde in beiden Ansätzen CD177 verwendet.  $n=9-12$ . Übernommen aus Maenner et al. 2016.

### **3.4 Testung der Klonalität und Produktivität einer Hybridomzelllinie mittels ELISpot-Assay**

In Folge wurde eine weitere Hybridomzelllinie (Gi16) mit dem hier etablierten Assay untersucht. Die Zellen produzieren nicht Verbund-spezifische monoklonale Antikörper gegen die  $\alpha$ I**Ib**-Untereinheit des Integrins  $\alpha$ I**Ib** $\beta 3$ . Bei einer Zellzahl von  $10^4$  war eine Reaktion mit dem biotinylierten rekombinanten Integrin  $\alpha$ I**Ib** $\beta 3$  zu erkennen. Die Menge der Spots betrug zwischen zehn und 23, was sich im linken Panel der Abb. 10 erkennen lässt. Das korrespondierende Total-IgG lag ebenfalls in diesem Intervall. Zwischen den Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Maenner et al. 2016).

Es wurde eine erneute Klonierung der Zelllinie mittels Grenzverdünnung durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen erneut im ELISpot getestet. Das Ergebnis ist im rechten Panel der Abb. 10 dargestellt. Mit derselben Zellzahl wie im Versuch zuvor ergaben sich diesmal überlappende Spots, womit eine Auswertung nicht möglich war. Eine Verdünnung der neu klonierten Zellen um den Faktor tausend führte zu einer Verdopplung der Spotzahl. In diesem Experiment war ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen antigenspezifischem und Total-IgG feststellbar (Maenner et al. 2016). Es wurde keine unspezifische Reaktion gegen CD177 gesehen (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 10:** Testung der Klonalität und Produktivität der Hybridomzelllinie Gi16 im ELISpot-Assay. Im linken Panel ist der Versuch vor Klonierung der Zelllinie dargestellt.  $n=6-9$ . Im rechten danach in unterschiedlichen Zellzahlen.  $n=2-6$ . In allen Experimenten wurden antigenspezifisches und Total-IgG bestimmt. Übernommen aus Maenner et al. 2016.

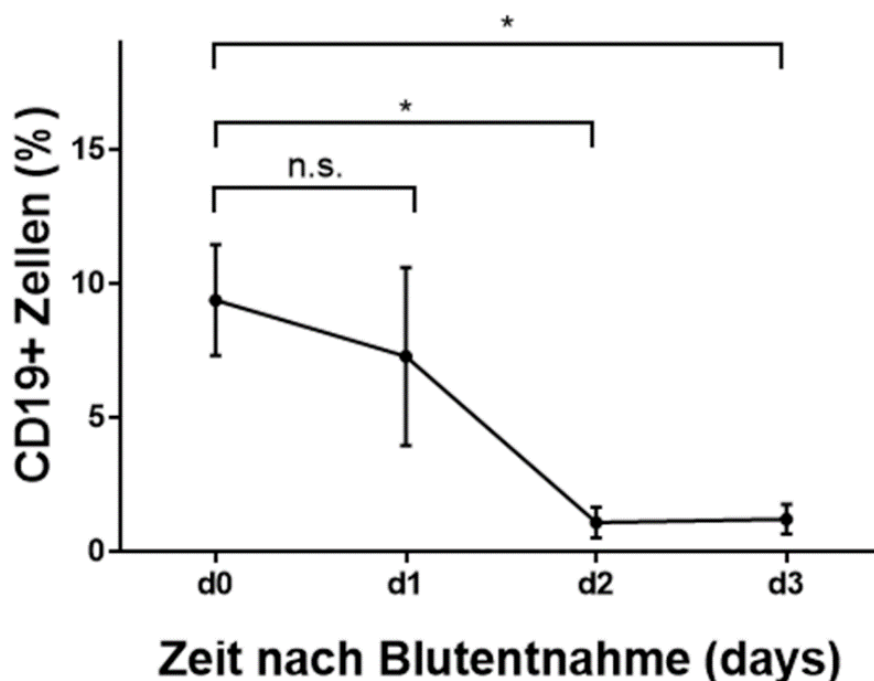
### 3.5 Etablierung eines B-Zell-ELISpot-Assays zur Detektion von Alloantikörpern gegen $\beta 3$ -Integrine mit humanen B-Zellen

Die Architektur des Assays wurde wie in Abb. 5 dargestellt beibehalten. Es wurden PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation, wie in Kap. 2 beschrieben, isoliert und in flüssigem Stickstoff konserviert. Die Zellen wurden anschließend ebenfalls wie oben gezeigt aufgetaut und für 72 Stunden in Kultur genommen. Das Medium enthielt IL-2 und den TLR-Agonisten R848 zur *in vitro*-Differenzierung der B-Zellen in einen antikörperproduzierenden plasmazell-ähnlichen Zustand. Der Assay wurde identisch mit dem zur Detektion von monoklonalen Antikörpern verwendeten aufgebaut, jedoch wurde anstatt des GAM- lediglich ein GAH-Antikörper zur Detektion des Total-IgG in biotinylierter Form verwendet. Als Analyt wurden die stimulierten humanen Zellen für 24 Stunden auf der Platte kultiviert. Für die Versuche wurden nach Auswaschen des in der Kultur gebildeten IgG  $200-500 \times 10^3$  kultivierte PBMCs pro Well eingesetzt. Zur Detektion wurden dieselben Proteine mit identischer Biotinylierung wie für die monoklonalen Antikörper verwendet. Die Versuche wurden im selben ELI-SpotReader ausgewertet.

### 3.6 Untersuchung der präanalytischen Parameter für die Entwicklung eines ELISpot-Assays zur Detektion humaner Antikörper gegen $\beta$ 3-Integrine

#### 3.6.1 Anteil der B-Zellen an isolierten PBMCs aus EDTA-Blutproben

Es wurden jeweils von vier randomisierten Blutspendern EDTA-Blutproben untersucht. In Abständen von 24 Stunden wurden aus diesen PBMCs isoliert. Sie wurden anschließend wie oben beschrieben mittels Durchflusszytometrie untersucht, wozu ein FITC-markierter CD19-Antikörper zur Anwendung kam. Die Ergebnisse sind in Abb. 11 dargestellt, auf der X-Achse ist die Zeit nach Abnahme bis zur Isolation der Zellen aus der EDTA-Monovette angegeben. Auf der Y-Achse ist der prozentuale Anteil an CD-19 positiven Zellen der Probe aufgetragen. Es zeigte sich, dass bereits nach 48 Stunden der Anteil der B-Zellen an der PBMC-Fraktion signifikant absinkt.

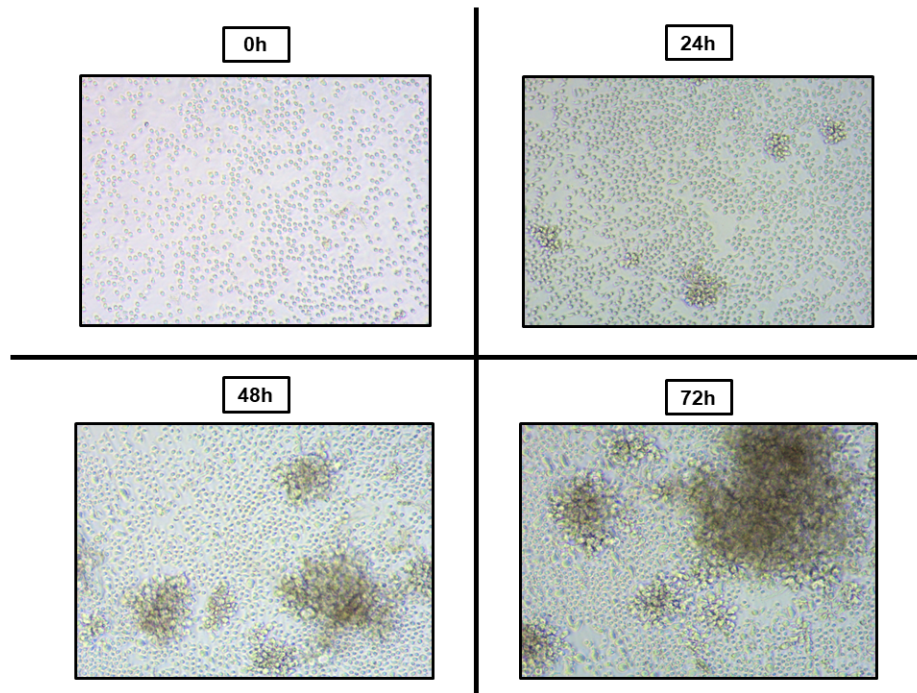


**Abbildung 11:** Anteil von B-Zellen, entnommen aus EDTA-Blutproben von rand. Spendern, die im Abstand von 24 Stunden isoliert und mittels FACS auf CD19-positive Zellen (B-Zellen) untersucht wurden. Die Zeit ist auf der X-Achse aufgetragen, Der prozentuale Anteil an B-Zellen unter den PBMC auf der Y-Achse.  $n=4$ .

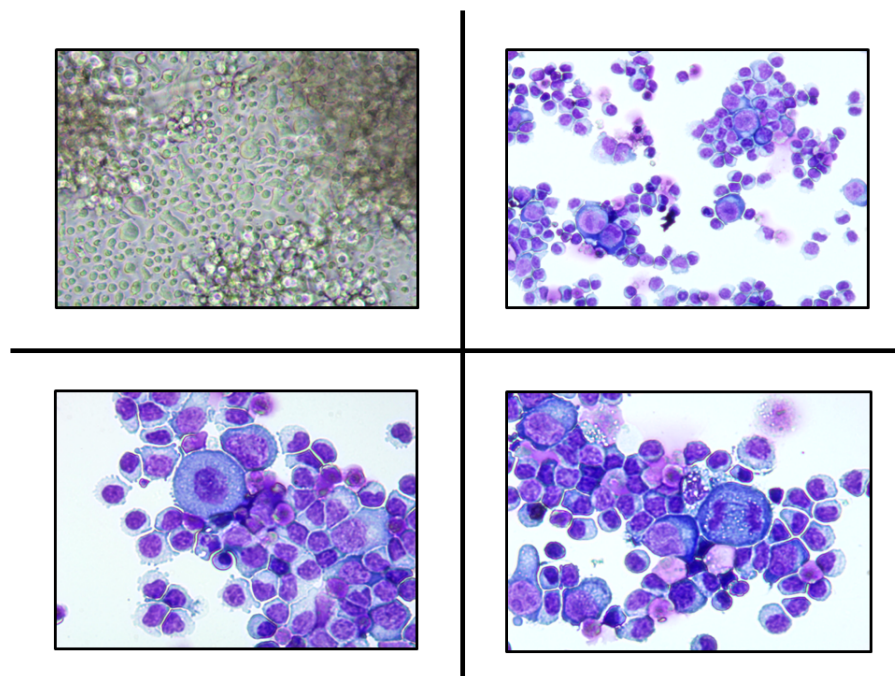
#### 3.6.2 Vitalität der isolierten PBMCs in der Stimulationskultur

Neben der Anzahl der isolierten Zellen war die Vitalität der Zellen in der Stimulationskultur ein weiterer zentraler präanalytischer Parameter. Um diese zu überprüfen, wurden erneut PBMCs von randomisierten Blutspendern isoliert und kryokonserviert, anschließend aufgetaut und für 72 Stunden in die Stimulationskultur mit IL-2 und R848 übernommen. Diese wurde täglich mikroskopisch beobachtet. Abb. 12 und 13 stellen Aufnahmen von jedem Tag dar. In Abb. 13 sind die Zellen nach 72 Stunden

in Giemsa-Färbung dargestellt. Es zeigten sich mehrere Mitosefiguren, darunter auch Zellen, die sich in der Anaphase befanden.



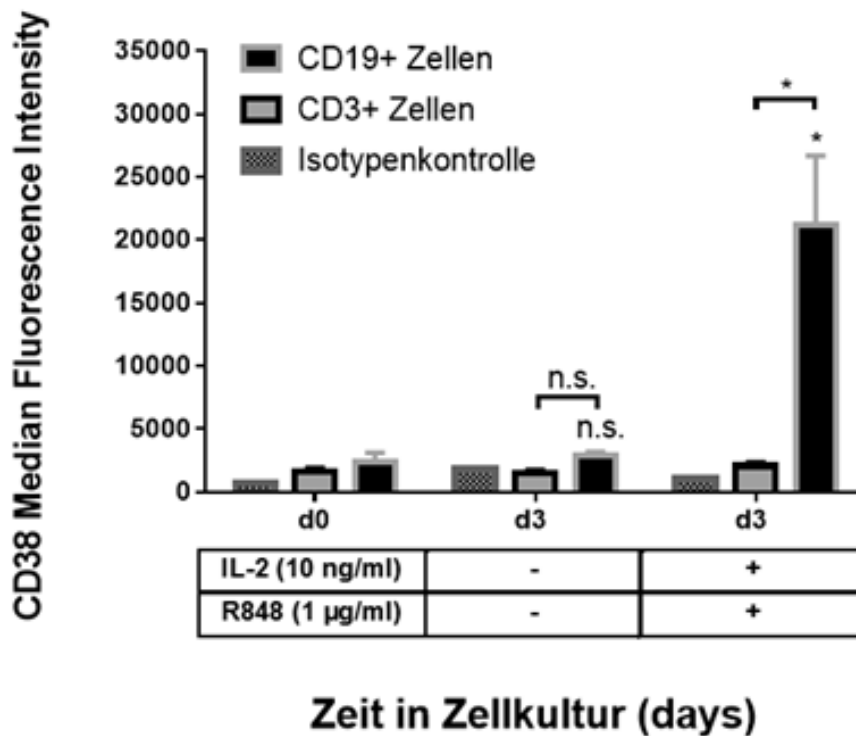
**Abbildung 12:** Isolierte PBMCs in Stimulationskultur mit IL-2 und R848. Über den Bildern ist der Zeitpunkt der lichtmikroskopischen Aufnahme angegeben.



**Abbildung 13:** Isolierte PBMCs in Stimulationskultur mit IL-2 und R848 in Giemsa-Färbung. Die Zellen wurden nach 72 Stunden geerntet, eine Giemsa-Färbung durchgeführt und lichtmikroskopisch ausgewertet.

### 3.6.3 Differenzierung der isolierten B-Zellen in der Stimulationskultur

Als Surrogat-Marker für eine Differenzierung der B-Zellen in Richtung Plasmazelle wurde CD38 verwendet. Es wurden in zwei Experimenten sowohl CD3- als auch CD19-positive Zellen auf die CD38-Expression im Vergleich zum Ausgangswert nach Isolation (d0) untersucht. Sie wurden wie zuvor mit derselben Konzentration IL-2 und R848 im Medium kultiviert und geerntet. Das Kontrollexperiment wurde ohne immunstimulatorische Faktoren durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen beider Versuche gleich gefärbt, im Durchflusszytometer analysiert und mit den schon bei Isolation im gleichen Verfahren gemessenen d0-Werten verglichen. Die Ergebnisse sind in Abb. 14 dargestellt. Es zeigte sich an Tag 3 ein signifikanter Anstieg der Expression von CD38 nach Kultur der Zellen mit IL-2 und R848, die ohne diese Komponenten nicht messbar war. Bei Zellen, die mit Immunstimulatoren kultiviert wurden, zeigte sich dieser Anstieg ausschließlich für CD19-positive Zellen verglichen mit CD3-positiven. Deren Vitalität wurde mit 7-AAD und Annexin V getestet. Die Ergebnisse sind identisch mit den Beobachtungen hoher Vitalität in der Lichtmikroskopie (Daten nicht gezeigt).



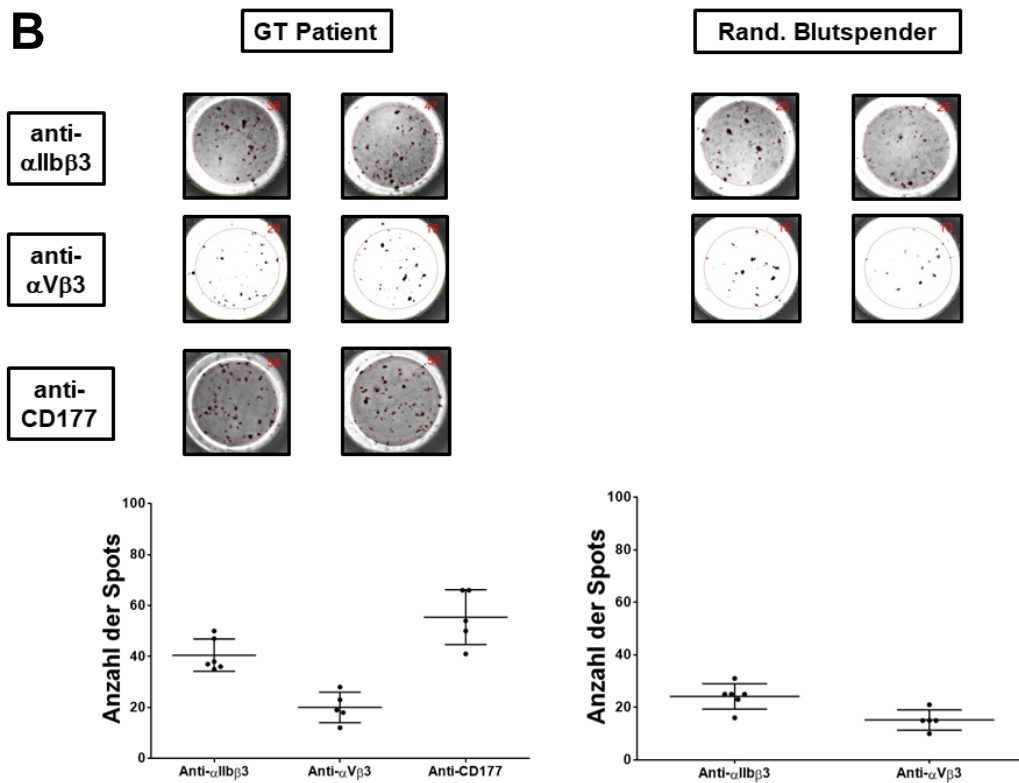
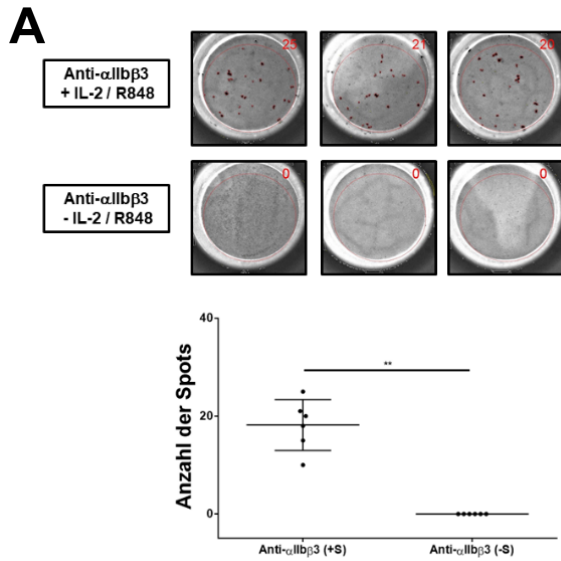
**Abbildung 14:** Vergleich des Anstiegs der CD38-Expression auf B- und T-Zellen unter 72 Stunden Kultur mit und ohne IL-2 und R848 im Vergleich zu den Ausgangswerten nach Isolation. Die Werte danach entsprechen d0 (linkes Panel), jene jeweils mit oder ohne Immunstimulatoren nach 72 Stunden d3 (mittleres und rechtes Panel). Welche Stimulatoren in welchem Ansatz verwendet wurden, kann der Tabelle entnommen werden.  $n=4$ .



### **3.7 Untersuchung von Blutproben eines Patienten mit GT (Typ 1) mittels B-Zell-ELISpot-Assay auf Alloantikörper gegen $\beta 3$ -Integrine**

Die Patientenproben wurden auf zwei Experimente verteilt. Ein Ansatz wurde für 72 Stunden mit den Immunstimulatoren IL-2 und R848 kultiviert, das Kontrollexperiment ohne diese. In der Abb. 15A sind die Ergebnisse dargestellt. Im oberen Panel zeigte sich ein deutlicher Nachweis von Antikörpern gegen das Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta 3$ . Im unteren ohne Immunstimulatoren fand kein Nachweis von antigenspezifischem IgG statt. Aufgrund der geringen Menge der EDTA-Blutproben waren in diesem Experiment Kontrollen und die Testung auf Antikörper gegen  $\alpha\text{V}\beta 3$  nicht möglich.

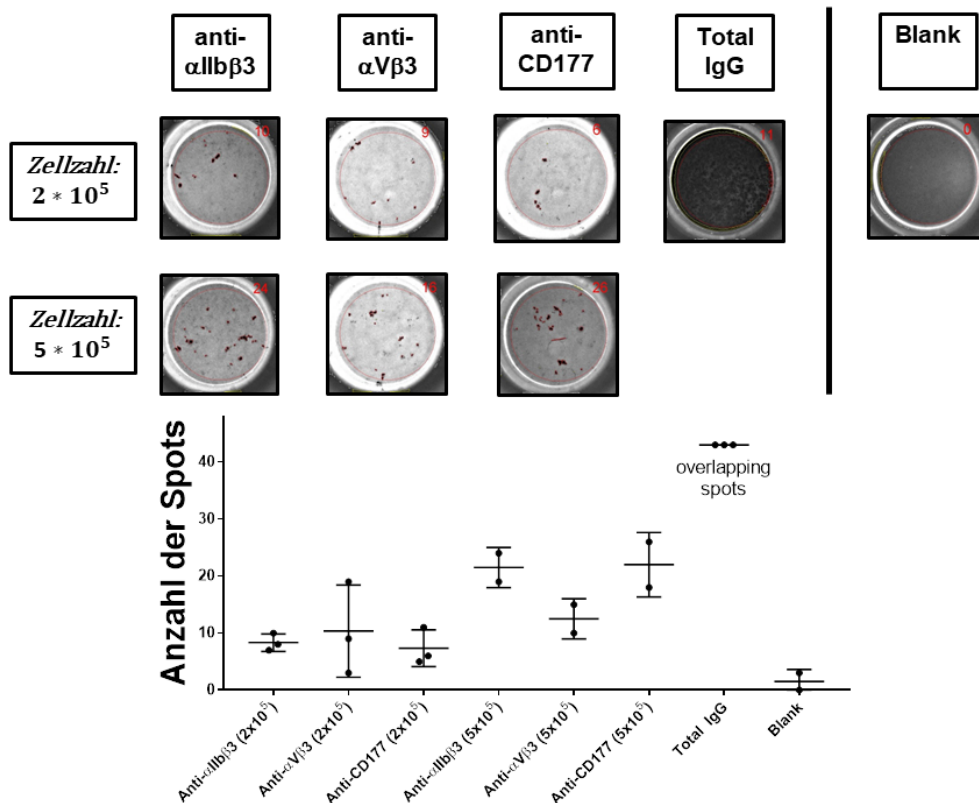
Bei einem weiteren Ambulanztermin konnte eine größere Menge EDTA-Blut abgenommen werden. Abb. 15B zeigt die Wiederholung des Versuchs. In diesem Experiment wurde auf einen unstimulierten Ansatz verzichtet, um auch auf Antikörper gegen  $\alpha\text{V}\beta 3$  testen und eine Gegenprobe durchführen zu können. Als Negativ-Kontrolle wurde wie bereits in vorigen Versuchen etabliert das biotinylierte granulozytäre Glykoprotein CD177 verwendet. Außerdem wurden Zellen eines randomisierten Spenders als Wildtyp mitgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 15B im rechten Panel dargestellt. Es konnte im linken Panel für den GT-Patienten antigenspezifisches IgG gegen  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  und  $\alpha\text{V}\beta 3$  nachgewiesen werden. Jedoch kam es in diesem Versuch zu deutlichen Signalen gegen CD177 des GT-Patienten sowie zu einem Nachweis von Antikörpern gegen  $\alpha\text{IIb}\beta 3$  und  $\alpha\text{V}\beta 3$  bei einem klinisch gesunden randomisierten Blutspender.



**Abbildung 15:** Untersuchung der PBMCs eines Patienten mit GT Typ I auf Antikörper gegen  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 und  $\alpha$ V $\beta$ 3. A: Vergleich zwischen immunstimulierten und nicht immunstimulierten PBMCs.  $n=6$ . B: Wiederholungen des vorherigen Versuchs, in diesem Ansatz zusätzliche Testung auf anti- $\alpha$ V $\beta$ 3. Alle Ansätze wurden 72 Stunden mit Immunstimulatoren kultiviert. Als Negativ-Kontrollen wurden CD177 sowie ein randomisierter Blutspender mitgeführt.  $n=5-6$ .

### 3.8 Untersuchung von Blutproben einer NAIT-Patientin mittels B-Zell-ELISpot-Assay auf Alloantikörper gegen $\beta 3$ -Integrine

Nach Isolation der PBMCs wurden diese nach dem etablierten Standardprotokoll für 72 Stunden mit Immunstimulatoren kultiviert und im ELISpot analysiert. Die Ergebnisse sind Abb. 16 zu entnehmen. Wie in den vorherigen Experimenten mit den Zellen eines GT-Patienten konnten Signale für die Integrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 und  $\alpha$ V $\beta$ 3 detektiert werden. Auch in diesem Versuch zeigte sich eine Reaktion für die Negativ-Kontrolle CD177. Es wurde ebenfalls der Effekt einer erhöhten Zellzahl untersucht. Eine korrelierende Messung des Total-IgG wurde durchgeführt. Als ‚Blanks‘ wurden Wells auf der ELISpot-Platte bezeichnet, die für 24 Stunden nur mit Medium ohne Zellen inkubiert wurden. Anschließend wurden sie entweder mit biotinyliertem CD177 oder  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 dem Protokoll entsprechend entwickelt. Hierbei konnten keine Spots detektiert werden.



**Abbildung 16:** Untersuchung der PBMCs einer Patientin mit NAIT auf Antikörper gegen  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 und  $\alpha$ V $\beta$ 3. Das Experiment wurde in zwei Ansätzen durchgeführt. Es wurden jeweils 200 000 oder 500 000 PBMCs nach 72 Stunden Kultur mit Immunstimulatoren pro Well eingesetzt. CD177 diente als Negativ-Kontrolle, Total-IgG wurde als Positiv-Kontrolle mitgeführt. Als Blanks wurden Wells bezeichnet, die nicht mit Zellen inkubiert, jedoch entsprechend dem Protokoll mit biotinyliertem Protein und Substrat entwickelt wurden.  $n=2-3$ .

## 4 Diskussion

### 4.1 Etablierung eines ELISpot-Assays zur Detektion von monoklonalen Antikörpern gegen $\beta 3$ -Integrine

Antikörper gegen  $\beta 3$ -Integrine sind sowohl für die Diagnostik als auch für die Therapie mehrerer immunhämatologischer Krankheitsbilder entscheidend. Deren Detektion gestaltet sich kompliziert. Der bisherige Goldstandard dafür ist der MAIPA-Assay (Santoso et al. 1989; Kiefel 1992). Von zentraler Bedeutung ist dieser in der Diagnostik von Allo- und Autoimmunthrombozytopenien. In der serologischen Diagnostik der NAIT zeigt er eine Sensitivität gegen Anti-HPA 1a-Antikörper im Nanogrammbereich (Campbell et al. 2007). In einer prospektiven Studie konnte mittels MAIPA eine Korrelation zwischen dem Titer der Anti-HPA 1a-Antikörper und erniedrigten Thrombozytenzahlen in Neugeborenen festgestellt werden (Killie et al. 2008). Nicht alle pathogenen Subspezies der Anti-HPA-Antikörper können mit der gleichen Sensitivität und Spezifität festgestellt werden. Bedingt durch die Heterogenität der Anti-HPA-Antikörper in Seren von -Schwangeren war eine Detektion der Anti-HPA 3a-Antikörper nicht in allen Fällen möglich (Socher et al. 2008). Außerdem legen Untersuchungen nahe, dass niedrig affine Antikörper bedingt durch zahlreiche Waschschrte des Assays nicht detektiert werden, jedoch trotz niedriger Affinität schwere NAIT-Verlaufsformen verursachen konnten (Socher et al. 2009). In der Diagnostik der Autoimmunthrombozytopenie (ITP) zeigte sich ein ähnliches Bild. In einer prospektiven Studie mit 158 Patienten wurde eine sehr gute Spezifität von 80%, allerdings nur eine Sensitivität von 51% nachgewiesen (Brighton et al. 1996).

In einer 2016 veröffentlichten Studie kam unsere Arbeitsgruppe zu dem Schluss, dass schwere Verläufe der NAIT vorwiegend durch Verbund-abhängige (compound-dependent) Anti-HPA 1a-Antikörper mit Verbund-Spezifität gegen das vaskuläre Integrin  $\alpha V\beta 3$  verursacht werden (Santoso et al. 2016). Auch eine andere Arbeitsgruppe konnte 2018 zeigen, dass polyklonale Antikörper gegen HPA 1a ein komplexes Spektrum von Antikörpern repräsentieren, die Spezifität für Verbund-abhängige (compound-dependent,  $\beta 3$ -Integrin im Verbund mit einer  $\alpha$ -Kette) und -unabhängige Epitope (monomere  $\beta 3$ -Integrin-Kette) aufweisen. Ferner spielt die Konformation der  $\beta 3$ -Integrin-Kette (*bent versus extended conformation*) eine Rolle für die Spezifität eines Anti-HPA 1a-Antikörpers (Thinn et al. 2018).

Da die Differenzierung der Sub-Spezifität von Antikörpern gegen HPA-1a bei der Vorhersage des Risikos einer intrakraniellen Blutung bei den Feten und Neugeborenen von zentraler Bedeutung ist, besteht ein Interesse an der Generierung humaner monoklonaler Antikörper gegen HPA 1a, die in der Pathogeneseforschung unverzichtbar sind. Ferner besteht die Möglichkeit, ‚funktionslose‘, blockierende Antikörper zu entwickeln, die in der Prophylaxe fetaler Blutungen eingesetzt werden könnten.

Aus diesen Überlegungen entstand die in Kap. 1 formulierte Arbeitshypothese. In einer bereits durchgeführten Studie wurde gezeigt, dass sich der ELISpot-Assay zur schnellen

Evaluation von Hybridomzellen eignet (Haaheim and Jonsson 1992). In dieser Untersuchung wurden lediglich Peptide als Antigene im ELISpot verwendet. Ziel der ersten Experimente war es zu zeigen, dass sich der ELISpot-Assay auch zur Entwicklung von Hybridomzellen gegen strukturell komplexere Antigene wie Integrine eignet. Der Aufbau des Assays basierte darauf, das Antigen auf die ELISpot-Platte zu coaten (Maenner et al. 2016).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Struktur des Assays zur Detektion monoklonaler Antikörper entworfen, die sich an dem von Jahnmatz et al. (2013) und Mabtech entwickelten Aufbau orientierte (Maenner et al. 2016). Dabei wurde das Antigen nicht auf die Platte geschichtet, sondern in biontynlierter Form nach Bindung der monoklonalen Antikörper an GAH-Fängerantikörper zur Signaldetektion eingesetzt. Die Biotinylierung des Antigens führt zu einer fünfundzwanzigfachen Verstärkung des Signals im Vergleich zum Standardprotokoll (Nordström and Ferrua 1992). Zusätzlich wurde mit dieser Methode verhindert, dass die Struktur des rekombinanten Proteins durch den Coating-Prozess verändert wird (Cox et al. 2012). Im Fall von Peptiden spielt dies keine Rolle, Integrine sind jedoch Heterodimere, deren Antigenstrukturen direkt von der Konformation des Proteins abhängig ist (Santoso et al. 2016; Maenner et al. 2016).

Nach Planung des Assaydesigns wurde eine Schachbretttitration durchgeführt, um die ideale Konzentration von Hybridomzellen und biotinyliertem Antigen zu finden. Das optimale Verhältnis der Reaktanten wurde bestimmt und für alle weiteren Experimente eingesetzt. Um die Kosten des Assays so niedrig wie möglich zu halten, wurde die geringste Konzentration bei deutlich auswertbaren Spots ausgewählt. Diese zeigten sich für alle eingesetzten Zelllinien in Form und Größe identisch zu vorbeschriebenen B-Zell-ELISpot-Studien. Ebenfalls war in diesem Assay-Ansatz kein signifikanter Background oder eine signifikante Anzahl unspezifischer Spots in den Negativkontrollen nachweisbar. Die Ergebnisse lagen qualitativ deutlich über den in den Studien beschriebenen konventionellen Ansätzen, bei denen das Antigen auf die Platte geschichtet wurde (Dosenovic et al. 2009; Walsh et al. 2013). Die Detektion der Gi5-Antikörper innerhalb des Assays bestätigte die Hypothese, dass sich durch deren Biotinylierung die komplexe räumliche Struktur des Integrins erhalten ließ, da es sich bei Gi5 um eine Zelllinie handelt, deren monoklonale Antikörper ein Verbund-spezifisches Epitop aufweisen (Santoso et al. 1984; Kiefel et al. 1987; Santoso et al. 1989; Maenner et al. 2016). Eine Erhöhung der eingesetzten Zellzahl führte zu überlappenden Spots und das Experiment konnte damit nicht mehr ausgewertet werden. Da die Anzahl der Spots aber unter jener der eingesetzten Zellen lag, muss davon ausgegangen werden, dass nicht jeder Spot einer antikörpersezernierenden Zelle entspricht, sondern einem kleinen Verband aus einer bis drei.

## **4.2 Untersuchung der Sensitivität und Spezifität zur Detektion von monoklonalen Antikörpern**

Zur weiteren Untersuchung der Spezifität und Sensitivität des vorangehend etablierten Assays wurden zunächst ähnliche Methoden wie von Walsh et al. (2013), Dosenovic et al. (2009), Jahnmatz et al. (2013) genutzt und ebenfalls Total-IgG als Positiv-Kontrolle

verwendet. In diesem Ansatz wird im Detektionsschritt das biotinylierte Antigen gegen einen biotinylierten GAM-Antikörper ausgetauscht, um das gesamte auf der Platte gebundene IgG zu detektieren. In den oben zitierten Studien wurde der Nachweis von Total-IgG dafür verwendet, die Effektivität der B-Zellstimulation zu evaluieren. Es handelte sich dabei um eine polyklonale Stimulation, womit kein direkter Vergleich zwischen dem gesamten sezernierten und dem antigenspezifischen IgG möglich war. Es konnte lediglich die Frage beantwortet werden, ob die Zellen erfolgreich IgG produzieren. Da der für diese Arbeit verwendete Ansatz jedoch mit monoklonalen Antikörpern durchgeführt wurde, sollte die Gesamtmenge des sezernierten IgG mit jener des antigenspezifischen IgG repräsentiert durch die Spotanzahl übereinstimmen. Daher wurde ein Vergleich zwischen antigenspezifischem und Total-IgG für die beiden in der Studie verwendeten Zelllinien Gi5 und AP3 durchgeführt. Es zeigte sich für beide kein signifikanter Unterschied zwischen antigenspezifischem und Total-IgG. Dies bewies, dass der Assay jeden sezernierenden Klon detektieren kann und damit für dessen sehr gute Sensitivität spricht (Maenner et al. 2016). Da der monoklonale Assay primär als Hilfsmittel zur vereinfachten Herstellung von Hybridomzelllinien entwickelt wurde, wurde die Sensitivität in einem experimentellen Ansatz getestet, der näher an den Entwicklungsabläufen einer Hybridomzelllinie liegt. Nach Fusion und Verwurf der nicht fusionierten Zellen wurde im Standardentwicklungsprotokoll anschließend ein (Primär-) Screening mittels ELISA durchgeführt, um unspezifische und nicht antikörpersezernierende Hybridomzellen von den Fusionsplatten zu eliminieren. Da dieser Versuch lediglich eine Gruppe bereits selektierter Zellen testete, um die Sensitivität abzuleiten, wäre dies ein unpassender Vergleich (Nelson et al. 2000; Zhang 2012). Daher wurde ein Grenzverdünnungsversuch durchgeführt, der mit  $10^3$  Hybridomzellen begann und der Anteil an nicht antikörpersezernierenden Myelomzellen an der Gesamtzellzahl exponentiell erhöht wurde. Damit konnte die Detektion von 15 Hybridomzellen in 975 nicht antikörpersezernierenden Myelomzellen als Untergrenze für die Empfindlichkeit des Assays bestimmt werden, was für eine sehr hohe Sensitivität spricht (Maenner et al. 2016). Ein direkter Interassay-Vergleich zwischen der Sensitivität des hier etablierten und einem konventionellen ELISA konnte nicht durchgeführt werden. Es besteht die Möglichkeit, dass der hier etablierte Assay sensitiver in der Detektion von monoklonalen Antikörpern ist, da die Zellen die Antikörper in ein kleineres Volumen an Medium sezernieren und der Verdünnungseffekt dadurch kleiner als beim konventionellen ELISA ist, bei dem der Überstand der Zellkultur verwendet wird. Diese Hypothese könnte in einer Folgearbeit geprüft werden.

### **4.3 Untersuchung zur Detektion Verbund-abhängiger (compound-dependent) Antikörper**

Die Ergebnisse von Santoso et al. (2016) zeigten, dass klinisch die Unterscheidung zwischen Verbund-abhängigen (compound-dependent) und nicht Verbund-abhängigen Antikörpern gegen  $\beta 3$ -Integrine Relevanz hat. Dies gilt diagnostisch in besonderem Maße für Patienten mit NAIT, jedoch auch für die Untersuchung von Fragestellungen aus dem Feld der Zellfunktionen, an denen Integrine beteiligt sind. Interessant für den therapeutischen Einsatz sind häufig monoklonale Antikörper, deren Epitope Verbund-

spezifisch bzw. konformationsabhängig sind, wenn es sich nicht um Integrine handelt. Im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern, deren Epitope linear sind, haben diese die Fähigkeit, z. B. die Ligandenbindungsstelle zu versperren oder die Konformationsänderung in eine aktive Form zu verhindern. Aus diesen Gründen wurde untersucht, ob der hier verwendete ELISpot-Assay über eine ausreichende Spezifität verfügt, um zwischen Verbund-abhängigen (compound-dependent) bzw. konformationsabhängigen monoklonalen Antikörpern unterscheiden zu können. Dafür wurden die bereits etablierten Hybridomzelllinien AP3 und Gi5 getestet. Bei letzterem handelt es sich um eine Verbund-spezifische Hybridomzelllinie gegen das Integrin  $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 3 (Santoso et al. 1984; Kiefel et al. 1987; Santoso et al. 1989), die erstgenannte bindet die Integrin- $\beta$ 3-Untereinheit unabhängig vom Verbund mit einer  $\alpha$ -Integrinkette (Newman et al. 1985). Beide wurden auf eine Reaktion der monoklonalen Antikörper mit den Integrinen  $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 3 und  $\alpha$ V $\beta$ 3 im ELISpot getestet. Das Ergebnis zeigte, dass der hier etablierte ELISpot Assay eine sehr hohe Spezifität aufweist, indem Gi5 ausschließlich einer Reaktion mit  $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 3, jedoch nicht mit  $\alpha$ V $\beta$ 3 aufweist. Die nicht Verbund-spezifische Zelllinie AP3 reagierte hingegen sowohl mit dem Integrin  $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 3 als auch  $\alpha$ V $\beta$ 3. Diese Eigenschaft, die auf den Einsatz von biotinylierten Proteinen mit intakter Tertiär- und Quartärstruktur zurückzuführen ist, ermöglicht es frühzeitig, in der Erstellung einer Hybridomzelllinie Verbund-spezifische Klone zu isolieren und weiterzuentwickeln (Maenner et al. 2016). Zur Vervollständigung des Untersuchungspanels stand jedoch eine Verbund-spezifische Hybridomzelllinie gegen das Integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3 nicht zur Verfügung. Der Nachweis der Spezifität ließ sich allerdings auch mit den untersuchten Hybridomzelllinien erbringen. Es konnten keine unspezifische Reaktion mit CD177 beobachtet werden (Maenner et al. 2016).

#### **4.4 Untersuchung der Klonalität und Produktivität**

In weiteren Experimenten wurde die Hybridomzelllinie Gi16 ebenfalls in dem hier etablierten Assay getestet. Diese sezerniert nicht Verbund-spezifische monoklonale Antikörper gegen die  $\alpha$ I**Ib**-Untereinheit des Integrins  $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 3. In Vorversuchen (Daten nicht gezeigt) mit einer ähnlichen Zellzahl wie in den Experimenten mit den Zelllinien Gi5 und AP3 zeigte sich keine Reaktion mit dem biotinylierten rekombinanten Integrin  $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 3. Daraufhin wurde die Menge erhöht und der Versuch erneut durchgeführt. Durch eine Steigerung um den Faktor tausend wurde ein schwaches Signal erzielt. Dabei war zu beachten, dass sich das Total-IgG korrespondierend verhielt. Daraus konnte geschlossen werden, dass das Problem nicht in der Detektion der  $\alpha$ I**Ib**-Antikörper durch das rekombinante biotinylierte Integrin  $\alpha$ I**Ib** $\beta$ 3 lag, da sich dies in einer Differenz von detektiertem Total- zu antigenspezifischem IgG gezeigt hätte. Dies führte zur Schlussfolgerung, dass die Hybridomzelllinie die problembehaftete Komponente darstellte. Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass das im Vergleich mit den Zelllinien Gi5 und AP3 schwächere Signal durch einen erhöhten Anteil an nicht produzierenden Hybridomzellen oder solchen, die sich zu Myelomzellen zurück entwickelt hatten, entstand. Diese Hypothese wurde durch nochmalige Klonierung der Zelllinie mittels Grenzverdünnung getestet. In Folge zeigte sich ein so starkes Signal, dass das Experiment aufgrund von überlappenden Spots nicht auswertbar war. Nach

Verdünnung und damit einer gleichen Anzahl an eingesetzten Zellen wie zuvor in den Experimenten mit GI5 konnte eine Verdopplung der Spotzahl im Vergleich zum Ausgangswert mit einer um den Faktor tausend niedrigeren Zellzahl festgestellt werden. In beiden Fällen war kein signifikanter Unterschied zwischen dem antigenspezifischen und dem Total-IgG zu finden. Dieses Ergebnis zeigt, dass der hier etablierte ELISpot-Assay nicht nur zur Evaluation der Spezifität eines sich in der Entwicklung befindenden monoklonalen Antikörpers dienen kann, sondern gleichzeitig auch Rückschlüsse über die Monoklonalität und Produktivität der Zelllinie zulässt. Zusammen mit der hohen Sensitivität zur Detektion von einzelnen Hybridoma-Zellen in einem frühen Stadium nach Fusion entstand eine einfache, zuverlässige und schnelle Methode zur Charakterisierung von Hybridomzelllinien am Beispiel von  $\beta$ 3-Integrinen (Maenner et al. 2016).

#### **4.5 Etablierung eines ELISpot-Assays zur Detektion von Alloantikörpern gegen $\beta$ 3-Integrine mit humanen B-Zellen**

Um einzelne antikörperproduzierende, zirkulierende Zellen im peripheren Blut von Patienten nachzuweisen, wurde der zuvor etablierte Assay zur Detektion monoklonaler Antikörper gegen  $\beta$ 3-Integrine nach dem Ansatz von Jahnmatz et al. (2013) zur Feststellung humaner Alloantikörper weiterentwickelt. Dazu wurde eine Methode mit präexperimenteller Wachstums- und Reifungsstimulation gewählt. Die Zellen sollten dabei nach Isolation für 72 Stunden mit Interleukin-2 und dem Toll-Like-Rezeptor-7 und -8-Agonisten R848 in Kultur genommen werden. Dieses Vorgehen basierte auf den Ergebnissen von Pinna et al. (2009) bezüglich der *in vitro*-Stimulation von B-Zellen. Einige Studien setzten auf präexperimentelle Stimulation der humanen B-Zellen (Walsh et al. 2013; Dosenovic et al. 2009), andere nutzten einen Einsatz ohne vorherige Verwendung von Immunstimulatoren im ELISpot-Assay (Kuwana et al. 2002; Kuwana et al. 2003; Kuwana et al. 2014). Es gab in vorangehenden Untersuchungen unterschiedliche Ansätze bezüglich des Einsatzes der Stimulatoren und der Dauer der Kultur. In der Arbeit von Walsh et al. (2013) wurde Lipopolysaccharid (LPS) als Immunstimulator für sechs Tage angewendet. Die Arbeit von Jahnmatz et al. (2013) verglich zahlreiche beschriebene Cocktails von Immunstimulatoren sowie unterschiedliche Zeitintervalle, darunter auch der Stimulationsansatz von Pinna et al. (2009). Dieser Ansatz zeigte sich am effektivsten; grundsätzlich gilt für alle oben aufgeführten Studien, in denen zwischen einem stimulierten und einem nicht stimulierten Ansatz verglichen wurde, dass Antikörpersekretion *in vitro* nur nach Aktivierung der peripheren Blutzellen beobachtet werden kann. Aus diesem Grund wurde der Ansatz von Jahnmatz et al. (2013) übernommen. Der übrige Aufbau des Assays wurde mit Anpassung der speziesspezifischen Antikörper (Verwendung von GAM-Antikörpern) wie im etablierten Assay für monoklonale Antikörper belassen.

#### **4.6 Untersuchung präanalytischer Parameter**

Zur Isolation der Zellen wurde in den ersten Vorversuchen ein auf Erythrozyten-Rosettierung basierendes Verfahren mit der klassischen Dichtegradientenzentrifugation verglichen (Daten nicht gezeigt). Aus klinischer Konvention wurde die Entscheidung



getroffen, die Zellen aus EDTA-Blutproben zu isolieren, da diese in der hämatologischen Routine-Diagnostik am häufigsten verwendet wurden. Mit beiden Verfahren konnte eine ausreichende Menge an PBMCs isoliert und durch Erythrozyten-Rosettierung eine höhere Reinheit bezüglich der Lymphozytenfraktion erreicht werden. Für alle folgenden Versuche wurden die PBMCs mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert, da in einer vergleichbaren Arbeit zur Etablierung eines ELISpots zur Detektion von Autoantikörpern bei Pemphigus Vulgaris gezeigt werden konnte, dass CD4-positive T-Zellen einen kostimulatorischen Effekt auf die B-Zellen im ELISpot ausüben. In dieser Arbeit wurde ebenfalls festgestellt, dass eine reine B-Zellkultur zu einer signifikant reduzierten Spotzahl führt (Nishifuji et al. 2000). Entscheidend für die Durchführung des Assays war es, genügend B-Zellen aus einer EDTA-Blutprobe zu isolieren. Nach ersten Versuchen mit frisch nach Blutentnahme isolierten Proben wurde getestet, wie sich eine Lagerung des Bluts auf die Anzahl an B-Zellen in der Blutprobe auswirkte. Diese Frage war ein entscheidender präanalytischer Parameter, da vom Ergebnis abhängig war, ob eine Zusendung von Proben an Referenzlabore möglich sein oder der Test vor Ort am Patienten stattfinden müssen würde. Es zeigte sich, dass bereits nach 48 Stunden der Anteil der B-Zellen an der PBMC-Fraktion signifikant absinkt. Daraus wurde für alle weiteren Experimente gefolgert, dass sie unmittelbar ( $< 5\text{h}$ ) nach der Blutentnahme isoliert und im Anschluss bis zur Analyse im ELISpot kryokonserviert werden mussten. Eine Zusendung von Patientenproben wäre daher allenfalls bereits im isolierten kryokonservierten Stadium möglich. Da dies allerdings in den Rahmenbedingungen des klinischen Alltags nicht durchführbar wäre, wurden alle Patientenproben durch unsere Ambulanz zur Verfügung gestellt.

Zur Überprüfung der Vitalität der kryokonservierten PBMCs wurden Proben aufgetaut und nach oben beschriebenem Procedere kultiviert. Die Zellen wurden in einem 24 stündigem Intervall lichtmikroskopisch ausgewertet. Dabei wurde eine Kontrollgruppe ohne Immunstimulatoren im Medium mitgeführt (Daten nicht gezeigt). Auffällig war, dass sich im Verlauf der Kultur Zellcluster bildeten, an deren Rand sich der Phänotyp einzelner PBMCs veränderte. Es konnte eine deutliche Größenzunahme beobachtet werden. Diese Abweichungen waren in allen Ansätzen dieses Versuchs zu erkennen. In Zellkulturen, die als Kontrolle ohne IL-2 und R848 angesetzt wurden, kamen diese Phänomene ebenfalls vor. Jedoch bestanden die Cluster in diesen Fällen nur aus einer deutlich geringeren Anzahl an Zellen. Veränderungen des Phänotyps traten deutlich seltener auf. Des Weiteren wurde eine Giemsa-Färbung nach 72 Stunden durchgeführt. Hier hoben sich die im Phänotyp veränderten Zellen durch den Größenunterschied hervor. Diese Subpopulation zeigte Mitosefiguren, darunter auch mehrere Anaphasen. Aus Vorversuchen war bekannt, dass in den isolierten Proben ein Lymphozytenanteil von  $> 90\%$  bestand (Daten nicht gezeigt). Somit wurde angenommen, dass es sich bei den Zellen mit dem morphologisch kleineren Phänotyp, die zahlenmäßig das Bild dominierten, um die Lymphozytenfraktion handelte. Mit einem chromatindichten Kern und einem schmalen Zytoplasmasaum wiesen sie die dafür typische Morphologie auf (Lüllmann-Rauch 2006). Die morphologisch größeren Zellen zeigten Charakteristika von B-Zell-Blasten und Plasmazellen. Neben der Größenzunahme zeigten sich an

blastenspezifischen Veränderungen Vakuolen sowie in den Kernen mehrere Nukleoli (Swerdlow 2017). Gegen das typische Bild von Blasten sprach der breitere Zytoplasmasaum, der allerdings mit der Morphologie von Plasmazellen vereinbar ist. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die Stimulation mit R848 und IL-2 eine Differenzierung der B-Lymphozyten zu Plasmazellen/-blasten bewirkte. Zur weiteren Abklärung dieser Hypothese des Wirkungsmechanismus der Stimulation wurden die Zellen durchflusszytometrisch untersucht, um zu überprüfen, ob die Kultur mit löslichen Immunstimulatoren im Medium und die morphologischen Veränderungen im Vorversuch mit einer Differenzierung der B-Zellen einhergehen. Als Marker für die Differenzierung der B-Zellen zu einem Antikörper sezernierenden Plasmablasten wurde CD38 verwendet. Aus dem Ergebnis in Zusammenschau mit dem Vorversuch konnte geschlossen werden, dass die morphologische Veränderung, die lichtmikroskopisch beobachtet wurde, mit einem Anstieg der CD38-Expression einhergeht. Die Hypothese, dass es sich bei den morphologisch vergrößerten mitotisch aktiven Zellen um antikörpersezernierende handelt, die sich aus der isolierten B-Zell-Fraktion differenzieren, wurde damit verifiziert. Dies bestätigte die Wirkung und Funktion der Stimulationskultur. Retrospektiv betrachtet wäre die Untersuchung auf einen Anstieg der Expression auf mehr als einen Parameter sinnvoll gewesen z. B. ein erweitertes Plasmazellpanel zusätzlich zu CD38 bestehend aus CD138, CD79a, MUM1 (REKHTMAN 2018).

#### **4.7 Untersuchung von Patientenproben (GT & NAIT) im ELISpot-Assay**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Patient mit GT und Antikörpern gegen  $\beta 3$ -Integrine untersucht, dessen Krankheitsbild zuvor beschrieben war (Wihadmadyatami et al. 2016). Zusammenfassend gesagt handelte es sich um eine Person, die sich klinisch mit wiederholt auftretenden Blutungsstigmata und transfusionspflichtigen Blutungen nach Routineeingriffen in der hämostaseologischen Ambulanz vorstellte. Zuletzt war es während einer Diskus-vertebralis-OP sowie einer partiellen Gastrektomie zu hämodynamisch kritischen Blutungen mit Massentransfusionen gekommen. Durch eine Untersuchung mittels Durchflusszytometrie sowie Immunoblot konnte nachgewiesen werden, dass die Integrine  $\alpha IIb\beta 3$  und  $\alpha V\beta 3$  nicht exprimiert waren, was zur Diagnose einer GT Typ 1 führte. In der Sequenzierung der Gene für die Integrin-Untereinheiten  $\alpha IIb$  und  $\beta 3$  zeigte sich eine homozygote G>A-Transition an der Position 1697 des für die  $\beta 3$ -Untereinheit codierenden Gens. Dies führte zu einer missense-Substitution Gly540Asp (GGC>GAC) in der I-EGF3 Domäne der  $\beta 3$ -Untereinheit, wodurch eine Verknüpfung intrazellulär mit der  $\alpha IIb$  oder  $\alpha V$  Untereinheit nicht erfolgen kann und dadurch keine Expression auf der Thrombozytenmembran stattfindet (Wihadmadyatami et al. 2016). Durch die mehrfachen Thrombozyten-Transfusionen kam es zu einer Isoimmunisierung des Patienten. In seinem Serum konnten Isoantikörper gegen  $\alpha IIb\beta 3$  und  $\alpha V\beta 3$  mittels MAIPA nachgewiesen werden (Wihadmadyatami et al. 2016). Es wurde erwartet, dass diese, wie in diesem Fall bei der GT, eine höhere Affinität als Alloantikörper aufweisen würden. Aus EDTA-Blutproben des Patienten wurden entsprechend den Vorversuchen PBMCs isoliert, kultiviert und im ELISpot-Assay getestet. Um einen Vergleich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen zu

ermöglichen, bei denen ein ELISpot-Assay ohne vorangehenden Einsatz von Immunstimulatoren genutzt wurde, führten wir zwei unterschiedliche Ansätze des Experiments durch (Kuwana et al. 2002; Kuwana et al. 2003; Kuwana et al. 2014). In den nicht stimulierten Ansätzen zeigte sich kein Nachweis für sezerniertes IgG. Dies galt sowohl für diesen Versuch zur Detektion von Antikörpern gegen  $\beta 3$ -Integrine als auch für den Nachweis von Anti-Tetanus-Toxin-Antikörpern, die in einem anderen Experiment untersucht wurden (Daten nicht gezeigt). In den Ansätzen mit Immunstimulation zeigte sich der erwartete Nachweis von Antikörpern gegen das Integrin  $\alpha \text{IIb}\beta 3$ . Aufgrund der geringeren Mengen an Patientenproben war ein gleichzeitiger Ansatz mit Negativ-Kontrollen nicht möglich, was eine Einschränkung der Aussagekraft dieses Experiments darstellt. Daraus wurde gefolgert, dass der Nachweis antikörper-sezernierender Zellen ohne Immunstimulation in vitro nicht möglich war. Es konnte keine abschließende Erklärung dafür gefunden werden, weshalb eine andere Arbeitsgruppe dies unter ähnlichen Bedingungen nachweisen konnte (Kuwana et al. 2002; Kuwana et al. 2003; Kuwana et al. 2014), insbesondere, da die in diesen Studien untersuchten Autoantikörper gegen das Integrin  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  bei ITP wahrscheinlich eine deutlich niedrigere Affinität aufweisen als die Isoantikörper eines Patienten mit GT nach frischer Immunisierung durch Transfusion. Eine mögliche Hypothese ist, dass ELISpot-Ansätze ohne Immunstimulation von einer kürzeren Inkubationszeit der Zellen profitieren. In den zitierten Arbeiten beträgt diese vier Stunden ohne längere Kultur der Zellen. Ohne Immunstimulation wäre es möglich, dass die B-Zellen in der PBMC-Kultur frühzeitig abstarben, da keine externe Aktivierung promitotischer bzw. differenzierungsfördernder Signaltransduktionswege erfolgte. In diesem Fall wäre eine Verlängerung der Inkubationszeit sowie eine Kultur vor Übertragung der Zellen auf die ELISpotplatte kontraproduktiv – ein Effekt ähnlich der Beobachtung, dass ein signifikanter Anteil der CD19-positiven Zellen in einer EDTA-Blutprobe bereits nach 24 Stunden abstirbt. Rückblickend wäre ein sinnvollerer Vergleich zwischen den Protokollen gewesen, die Zellen in der Gruppe ohne Immunstimulation direkt auf die ELISpotplatte zu übertragen und nach 72 oder 24 Stunden auszuwerten. Dieses Vorgehen hätte einen weniger verfälschten Vergleich der Protokolle ermöglicht.

Nach erneuter Vorstellung des Patienten und weiterer Probengewinnung wurde in einem zweizeitigen Vorgehen auf die Detektion von  $\alpha \text{V}\beta 3$ -Antikörpern getestet. Da  $\alpha \text{V}\beta 3$  auch in geringeren Mengen auf Thrombozyten exprimiert wird (Wagner et al. 1996; Collier et al. 1991) und die Thrombozyten der Versuchsperson durch die Mutation in den Genen der gemeinsamen  $\beta 3$ -Untereinheit nicht selbst zur Expressierung des Integrins im Stande waren, sollte nach erfolgter Transfusion eine Immunisierung stattfinden. Dies wurde mittels MAIPA-Assay gezeigt (Wihadmadyatami et al. 2016). Im zweiten Ansatz mit Blutproben des Patienten konnte das vorherige Ergebnis repliziert und Antikörper gegen  $\alpha \text{V}\beta 3$  nachgewiesen werden. Dabei wurden das granulozytäre Glykoprotein CD177 sowie Proben von gesunden Blutspendern als Negativ-Kontrolle mitgeführt. Es zeigten sich sowohl unspezifische Signale gegen CD177 bei dem untersuchten Patienten als auch Antikörper gegen  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  und  $\alpha \text{V}\beta 3$  bei den Kontrollen. Der Nachweis von Antikörpern entspricht den Ergebnissen der MAIPA-Untersuchungen des Patienten

(Wihadmadyatami et al. 2016), jedoch sind diese Ergebnisse in ihrer Aussagekraft eingeschränkt, da klinisch ein gleichzeitiger Nachweis von Anti-CD177-Antikörpern unwahrscheinlich ist. Noch unwahrscheinlicher ist der Nachweis von Antikörpern gegen  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 und  $\alpha$ V $\beta$ 3 ohne klinische Korrelation bei gesunden Blutspendern, so dass diese Ergebnisse als falsch positiv gewertet wurden. Der Mittelwert der Spotzahl für  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 und  $\alpha$ V $\beta$ 3 liegt bei dem GT-Patienten höher als der Mittelwert der Kontrollen. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich unter den Spots neben falsch positiven auch echte Signale verbergen könnten. Ein Nachweis dafür konnte nicht erbracht werden. Auch die Tatsache, dass der Mittelwert der Spotzahl für Anti-CD177 höher liegt als für  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 und  $\alpha$ V $\beta$ 3, spricht für das Überwiegen der falsch positiven Signale.

Eine weitere Untersuchung erfolgte bei einer Patientin mit frischer Anti-HPA 1a-Immunsierung und hohem Antikörpertiter. Sie befand sich aufgrund eines aufgetretenen NAIT-Falles im Rahmen der ersten zur ambulanten Überwachung ihrer zweiten Schwangerschaft in Behandlung der Institutsambulanz. Hier konnte ebenfalls ein falsch positives Signal gegen CD177 detektiert werden. Somit war geklärt, dass es sich um ein systematisches Problem handelte, das sich unabhängig von der Zellzahl zeigte. Zur Eingrenzung wurden weitere ELISpots durchgeführt. In Leerversuchen wurden alle Schritte des Assays durchlaufen, im Medium befanden sich allerdings keine PBMCs. In den Ansätzen konnte kein falsch positives Signal detektiert werden. In der Arbeit von Jahnmatz et al. (2013) wurde der Assay primär dazu entwickelt, die B-Zellantwort nach einer Impfung zu messen. Als negative Kontrolle für unspezifische Reaktionen wurden lediglich Ansätze ohne Zielprotein verwendet, jedoch keine Verwendung strukturell ähnlicher Proteine zu Diphtherie- und Tetanustoxin. Daher lässt sich nicht ausschließen, dass sich in dieser Arbeit ebenfalls falsch positive Signale unter den detektierten Spots befinden. In den Arbeiten von Kuwana et al. (2002), Kuwana et al. (2003), Kuwana et al. (2014) wurde BSA als Negativ-Kontrolle für unspezifische Spots verwendet. In diesen Versuchen zeigten sich keine unspezifischen Spots. In einem weiteren Experiment wurden Spots gegen biotinyliertes BSA nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Die Ursache dieser unspezifischen Signale konnte letztlich nicht geklärt werden. Aufgrund der Tatsache, dass sich in den Ansätzen ohne Zellen keine unspezifischen Spots formten, wurde gefolgert, dass die problematische Komponente des Assays die Primärzellen waren. Des Weiteren sprach für diese Hypothese, dass dieselben Proteine auch in den Experimenten mit Hybridomzellen verwendet wurden und es dort in keinem Experiment zu falsch positiven Signalen kam. Eine der Annahmen sieht die in vorherigen Experimenten beobachtete Clusterbildung innerhalb der Primärzellkultur als Ursache für die unspezifischen Spots. Die Stimulierung mit R848 und Il-2 führt möglicherweise neben der Stimulation promitotischer Signalwege zur einer Expressionssteigerung anderer Zellkontaktmoleküle, was zu einer stärkeren Haftung der Zellen an der Membran führt, die sich nicht mehr abwaschen lassen und biotinylierte Proteine unspezifisch binden. Möglichkeiten, solche Effekte zu umgehen, wären es, die stimulierten PBMCs nicht in Platten mit festen Oberflächen zu kultivieren und stattdessen eine Kultur zu wählen, bei der das Medium regelmäßig umgesetzt wird. Dies könnte eine Clusterbildung unterbinden, allerdings ist fraglich, ob damit nicht ebenfalls der Cross-Talk der Zellen

zur Stimulierung und Differenzierung gehemmt würde. Eine weitere mögliche Ursache für das Auftreten der unspezifischen Spots könnte in der mangelnden Vitalität der Primärzellkulturen liegen. Die eingesetzten Zellen wurden jeweils nach Isolation und bei der Überführung auf die ELISpotplatte im Hämatologie-Analyzer gezählt. Auffällig war die deutliche Verminderung der Zellzahl im zeitlichen Verlauf des jeweiligen Experiments. Neben der Clusterbildung könnten auch Zellfragmente, besonders DNA- und RNA-Fragmente abgestorbener PBMCs zur unspezifischen Bindung von biotinylierten Proteinen und damit zu Spots führen. Da der Hämatologie-Analyser zur Evaluation der Zellzahl lediglich Forward Scatter (FSC) und Side Scatter (SSC) verwendet, wären die veränderten Werte allerdings auch durch eine veränderte Zellmorphologie erklärbar. Zur Überprüfung, ob Zellfragmente für die unspezifischen Spots verantwortlich waren, wurden die Zellen vor Einsatz auf der ELISpotplatte mit einer Endonuclease inkubiert, um DNA- und RNA-Fragmente aufzulösen und die Waschschritte im Protokoll erhöht. Dazu wurde Benzonase verwendet, eine in E.coli hergestellte Endonuclease, die sowohl DNA- als auch RNA-Fragmente hydrolysiert. Es wurden die vom Hersteller empfohlenen Angaben verwendet, der Ablauf erfolgte in Anlehnung an die Arbeit von Walsh et al. (2013). Zusätzlich wurden die Waschschritte im gesamten Protokoll von fünf auf sieben erhöht. Diese Veränderungen führten allerdings nicht zu einem Verschwinden der unspezifischen Spots (Daten nicht gezeigt). Aufgrund des gesetzten Zeitrahmens des Projekts sowie begrenzter Probenverfügbarkeit war eine experimentelle Testung aller Hypothesen nicht möglich.

## 5 Zusammenfassung

### 5.1 Hintergrund

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung eines B-Zell-ELISpot-Assays (Enzyme Linked Immuno Spot Assay) zur Detektion von Antikörpern gegen  $\beta 3$ -Integrine. Mütterliche Antikörper gegen das humane Plättchenantigen 1a (HPA-1a) sind die häufigste Ursache der Fetalen und Neonatalen Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT). Das Antigen HPA-1a ist durch einen Aminosäureaustausch in der  $\beta 3$ -Integrinkette charakterisiert. Kürzlich konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass bestimmte mütterliche anti-HPA-1a Antikörper mit fetaler Hirnblutung assoziiert sind. Diese Antikörper reagieren mit dem Vitronektin-Rezeptor ( $\alpha V\beta 3$ -Integrin) und induzieren eine funktionelle Störung des Endothels. Dieser Subtyp von anti-HPA-1a Antikörpern wurde bei Müttern von Neugeborenen ohne Hirnblutung nicht gefunden. Bei Müttern von Neugeborenen ohne Hirnblutung wurden Antikörper nachgewiesen, die gegen den Fibrinogen-Rezeptor ( $\alpha IIb\beta 3$ ) gerichtet sind. Die beiden Antikörper-Subtypen erkennen somit die  $\beta 3$ -Integrin-Kette im Verbund mit einer jeweils anderen  $\alpha$ -Kette (Verbund-abhängiger (compound-dependent) Antikörper). Ein weiterer Antikörper-Subtyp erkennt das HPA-1a Antigen auf der  $\beta 3$ -Integrin-Kette unabhängig von dem Verbund mit einer  $\alpha$ -Kette. Da Antiseren von Müttern mit FNAIT immer ein polyklonales Gemisch zahlreicher Antikörpermoleküle repräsentieren, ist die Gewinnung und Charakterisierung von murinen und humanen monoklonalen Antikörpern für die Pathogeneseforschung, für die Entwicklung von Nachweisverfahren zur Risikostratifizierung sowie zur Entwicklung neuer Medikamente zur Prophylaxe fetaler Blutungen unverzichtbar.

Mittels B-Zell-ELISpot-Assay können einzelne, Antikörper-sezernierende Zellen in einer Mikrotiterplatte *in situ* nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese untersucht, dass der B-Zell-ELISpot-Assay ein geeignetes Verfahren zur Charakterisierung von Hybridomzellen und damit zur Entwicklung neuer monoklonaler Antikörper gegen  $\beta 3$ -Integrine darstellt. In einer zweiten Phase sollte untersucht werden, ob das gleiche Nachweisverfahren auch zum quantitativen Nachweis von Antikörper-sezernierenden Zellen aus Blutproben von Patienten, und damit zur Bestimmung des Risikos einer fetalen Hirnblutung bei Schwangeren mit FNAIT, geeignet ist.

### 5.2 Methoden

In dieser Studie wurde ein neuer B-Zell-ELISpot-Assay zur Detektion von Antikörpern gegen  $\beta 3$ -Integrine etabliert. Dies geschah in zwei Phasen. In Erster wurde ein ELISpot-Assay zur Testung monoklonaler Antikörper etabliert um die Sensitivität, Spezifität und Verbund-Abhängigkeit gegen  $\beta 3$ -Integrine zu charakterisieren. Hierfür wurden von Hybridom-Zellen sezernierte monoklonale Antikörper mittels auf einer Polyvinylidenfluorid -Membran (PVDF) fixierten Ziege-Anti-Maus-Antikörpern (GAM) gefangen. Anschließend wurden, die so immobilisierten Antikörper, mit den biotinylierten rekombinanten Integrinen  $\alpha IIb\beta 3$  und  $\alpha V\beta 3$  inkubiert. Zum Nachweis einer Antigenbindung wurde ein enzymmarkiertes Streptavidin-Substrat-System genutzt, dass eine Bindung in Form von Spots auf der Membran visualisierte. Drei

Hybridomzelllinien: Gi5, Gi16 und AP3, die vorangehenden Untersuchungen als Anti- $\alpha$ I**b** $\beta$ 3, Anti- $\alpha$ I**b** und Anti- $\beta$ 3 charakterisiert worden sind, wurden im ELISpot getestet. Als Negativkontrolle wurde eine Hybridomzelllinie (7D8) verwendet, die einen monoklonalen Antikörper gegen CD177 produziert. In der zweiten Phase wurde dieser Assay für die Testung humaner B-Zellen weiterentwickelt. Der Aufbau des Assays blieb gleich, es wurden zur Immobilisierung sezernierter Antikörper Ziege-Anti-Human-Antikörper (GAH) verwendet. Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von NAIT und GT-Patienten wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Diese wurden für 72 Stunden in eine Stimulationskultur mit Interleukin-2 (IL-2) und dem Toll-Like-Rezeptor-Agonisten (TLR) R848 übernommen. Nach Durchführung der *in vitro* Stimulation wurden die Zellen mit denselben rekombinanten Proteinen wie zuvor inkubiert. Der Nachweis der Antigenbindung erfolgte mit demselben Detektionssystem.

### 5.3 Ergebnisse

Nach Etablierung des Assays für monoklonale Antikörper konnte eine Intra- von 4,28% und eine Inter-Assay-Variabilität von 6,38% gemessen werden. Anschließend wurden Untersuchungen zur Sensitivität und Spezifität durchgeführt. Im Vergleich mit der Positiv-Kontrolle (Total-IgG) konnte kein signifikanter Unterschied für die Detektion monoklonaler Antikörper gegen  $\alpha$ I**b** $\beta$ 3 und  $\alpha$ V **$\beta$** 3 (Antigenspezifisches-IgG) festgestellt werden, somit konnte jeder sezernierte Antikörper nachgewiesen werden. Weiterhin konnten in einem Grenzverdünnungsversuch bis zu 15 antikörpersezernierende Zellen (ASC) unter 985 Myelomzellen detektiert werden. Die Hybridomzelllinie AP3, die einen nicht Verbund-abhängigen Antikörper gegen die  $\beta$ 3-Kette produziert, reagierte mit  $\alpha$ I**b** $\beta$ 3 und  $\alpha$ V **$\beta$** 3, wohingegen es bei Gi5, einem Verbund-abhängigen (compound-dependent) Antikörper, ausschließlich zur Spotbildung mit  $\alpha$ I**b** $\beta$ 3 kam. Die Analyse einer dritten Hybridomzelllinie, Gi16 (anti- $\alpha$ I**b**), zeigte nur wenige Spots mit  $\alpha$ I**b** $\beta$ 3, was darauf hinwies, dass sich verschiedene Klone in der Kultur befanden (produzierende und nicht-produzierende). Nach erneuter Klonierung der Zelllinie durch die Grenzverdünnungsmethode konnte eine signifikant erhöhte Anzahl von Spots identifiziert werden. Für den Nachweis Antikörper-sezernierender Zellen aus Blutproben von Patienten war der Assay nicht geeignet. Wir vermuten, dass unspezifische Spots durch Zell-Aggregate zwischen Antigen-präsentierenden Zellen und exogen stimulierten B-Zellen hervorgerufen wurden.

### 5.4 Schlussfolgerung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der hier entwickelte B-Zell-ELISpot-Assay zum Nachweis einzelner Antikörper-sezernierender Hybridomzellen *in situ* geeignet ist. Der Nachweis der Antikörper-Sekretion einzelner Hybridomzellen erlaubte Rückschlüsse auf die Klonalität und Produktivität der untersuchten Zelllinien. Ferner konnte in dem etablierten B-Zell-ELISpot-Assay *in situ* differenziert werden, ob monoklonale Antikörper die  $\beta$ 3-Integrin-Kette im Verbund mit einer jeweils spezifischen  $\alpha$ -Kette oder Verbund-unabhängig erkennen. Zusammenfassend gesagt, ist der B-Zell-ELISpot ein geeignetes Verfahren, monoklonale Antikörper gegen  $\beta$ 3-Integrine in einem frühen Stadium nach Fusion zu charakterisieren.

Damit wurde eine Grundlage für die Charakterisierung humaner monoklonaler Antikörper gelegt, mit denen die Pathogenese der Hirnblutung weiter aufgeklärt werden kann und neue Medikamente zur Prophylaxe von Blutungen entwickelt werden können.



## 6 Summary

### 6.1 Background

The aim of this study is the establishment of a B cell ELISpot assay (Enzyme Linked Immuno Spot Assay) for the detection of antibodies against  $\beta 3$ -integrins. Maternal antibodies against human platelet antigen 1a (HPA-1a) are the most common cause of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia (FNAIT). The antigen HPA-1a is characterized by an amino acid exchange in the  $\beta 3$ -integrin chain. Recently, our group has demonstrated that certain maternal anti-HPA-1a antibodies are associated with fetal brain hemorrhage. These antibodies react with the vitronectin receptor ( $\alpha V\beta 3$  integrin) and induce endothelial dysfunction. This subtype of anti-HPA-1a antibody was not found in mothers of newborns without cerebral hemorrhage. Antibodies to the fibrinogen receptor ( $\alpha IIb\beta 3$  integrin) were detected in mothers of newborns without cerebral hemorrhage. The two antibody subtypes thus recognize the  $\beta 3$ -integrin chain in complex with a different  $\alpha$ -chain (compound-dependent antibodies). Another antibody subtype recognizes the HPA-1a antigen on the  $\beta 3$ -integrin chain independently of the complex with a  $\alpha$ -chain. Since maternal bloodsera in cases of FNAIT always represent a polyclonal mixture of numerous antibody molecules, the extraction and characterization of murine and human monoclonal antibodies is indispensable for pathogenesis research, the development of detection methods for risk stratification, and the development of new drugs for the prevention of fetal bleeding.

By means of the B cell ELISpot assay, individual antibody-secreting cells can be detected in situ in a microtiter plate. In the present work it was hypothesized that the B cell ELISpot assay represents a suitable method for the characterization of hybridoma cells and thus for the development of new monoclonal antibodies against  $\beta 3$ -integrins. In a second phase, it should be investigated whether the same detection method is also suitable for the quantitative detection of antibody-secreting cells isolated from blood samples of patients, and thus for the determination of the risk of fetal brain hemorrhage in pregnant women with FNAIT.

### 6.2 Materials and Methods

In this study, a new B cell ELISpot assay for the detection of antibodies against  $\beta 3$ -integrins was established. This happened in two phases. In the first, an ELISpot assay for monoclonal antibodies was established to characterize the sensitivity, specificity and compound dependence against  $\beta 3$ -integrins. For this purpose, monoclonal antibodies secreted by hybridoma cells were captured by goat-anti-mouse-antibodies (GAM) coated on a polyvinylidene fluoride membrane (PVDF). Subsequently, the immobilized monoclonal antibodies were incubated with biotinylated recombinant integrins  $\alpha IIb\beta 3$  and  $\alpha V\beta 3$ . To detect antigen binding, an enzyme-labeled streptavidin-substrate system was used that visualized binding in form of spots on the membrane. Three hybridoma cell lines: Gi5, Gi16 and AP3, which were previously characterized as anti- $\alpha IIb\beta 3$ , anti- $\alpha IIb$  and anti- $\beta 3$ , were tested in this assay. The negative control used was a hybridoma cell

line (7D8) producing monoclonal antibodies against CD177. In the second phase, this assay was further developed for the testing of human B cells. The structure of the assay remained the same, however in this assay goat-anti-human-antibodies (GAH) were used to immobilize secreted antibodies. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with cases of NAIT and Glanzmann's thrombasthenia (GT) were isolated by density gradient centrifugation. These were transferred to cell culture plates with interleukin-2 (IL-2) and the toll-like receptor agonist (TLR) R848 for stimulation and differentiation. After in vitro stimulation, the cells were incubated with the same recombinant proteins used before with monoclonal antibodies. For detection of antigen binding the same detection system was used.

### **6.3 Results**

After establishing the ELISpot for monoclonal antibodies, an intra-assay variation of 4.28% and an inter-assay variation of 6.38% were measured. Subsequently, studies on sensitivity and specificity were performed. In comparison with the positive control (Total IgG), no significant difference was found for the detection of monoclonal antibodies against  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 and  $\alpha$ V $\beta$ 3 (antigen-specific IgG), which shows that any secreted Antibody was detected. In addition, up to 15 antibody secreting cells (ASC) could be detected among 985 non antibody producing myeloma cells. The hybridoma cell line AP3, which produces a non-compound-dependent antibody against the  $\beta$ 3 chain, reacted with  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 and  $\alpha$ V $\beta$ 3, whereas Gi5, a compound-dependent antibody, only reacted with  $\alpha$ IIB $\beta$ 3. Analysis of a third hybridoma cell line, Gi16 (anti- $\alpha$ IIB), showed only a few spots with  $\alpha$ IIB $\beta$ 3. We hypothesized that there were different clones in cell culture (producing and non-producing). After renewed cloning of the cell line by the limiting dilution method a significantly increased number of spots could be identified. The assay was not suitable for detection of antibody-secreting cells from patient blood samples. We suspect that nonspecific spots were caused by cell aggregates between antigen presenting cells and exogenously stimulated B cells.

### **6.4 Conclusion**

In the present work it could be shown that the B-cell ELISpot assay developed here is suitable for the detection of single antibody-secreting hybridoma cells in situ. The detection of antibody secretion of individual hybridoma cells allowed conclusions about the clonality and productivity of the investigated cell lines. Furthermore, it was possible to differentiate in situ in the established B-cell ELISpot assay whether monoclonal antibodies recognize the  $\beta$ 3-integrin chain compound dependent with a specific  $\alpha$ -chain or independently. In summary, the B cell ELISpot is a convenient method to characterize monoclonal antibodies to  $\beta$ 3-integrins at an early stage after fusion. This laid the groundwork for the characterization of human monoclonal antibodies, which further elucidate the pathogenesis of cerebral hemorrhage and develop new drugs for the prevention of hemorrhage.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

Abs .....	Antikörper
Ag .....	Antigen
ALP .....	Alkalische Phosphatase
AP .....	Alkalische Phosphatase
ASC .....	antikörpersezernierende Zellen
CD-Moleküle .....	Cluster-of-Differentiation-Moleküle
DMSO .....	Dimethylsulfoxid
ECM .....	Extrazelluläre Matrix
EDTA .....	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF-Domäne .....	Epidermale-Wachstumsfaktor-Domäne
ELISA .....	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay
ELISpot .....	Enzyme Linked Immuno Spot-Assays
Fab-Fragment .....	Fragmented-Antigen-Fragment
FAK .....	Fokale Adhäsionskinase
FCS .....	Fötale Kälberserum
FDA .....	Food and Drug Administration
FSC .....	Forward Scatter
GAH .....	Ziege-Anti-Human
GAM .....	Ziege-Anti-Maus
GT .....	Glanzmann-Thrombasthenie
HAMA .....	Humane-Anti-Maus-Antikörper
HAT-Medium .....	hypoxanthin-, aminopterin- und thymidinhaltiges Medium
HGPRT .....	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HPA .....	Human-Platelet-Antigen
HT-Medium .....	hypoxanthin und thymidin-haltiges Medium
ICAM-Klasse .....	Interzellulären-Zelladhäsionsmolekül-Klasse
ICH .....	intrakraniellen Blutungen
Ig .....	Immunglobulin
IgG .....	Immunglobulin-G
IMC .....	inner membrane clasp
IMD .....	Integrin Mediated Death
ITP .....	Autoimmunthrombozytopenie
IVIG .....	intravenöses Immunglobulin
LPS .....	Lipopolysaccharid
Mab .....	Monoklonaler Antikörper
MMP .....	Matrixmetalloproteinasen
NAIT .....	Neonatale Alloimmunthrombozytopenie
OMC .....	outer membrane clasp
ori .....	origin of replication
PAMP .....	Pathogen Assoziierte Molekulare Muster
PAR-Rezeptoren .....	Protease-aktivierte-Rezeptoren
PBMC .....	Periphere Mononukleäre Zellen
PBS .....	phosphat-gepufferte Salzlösung
PCI .....	perkutaner koronarer Intervention
PCR .....	Polymerase-Kettenreaktion
PML .....	Progressive Multifokaler Leukenzephalopathie
PSI-Domäne .....	Plexin-Semaphorin-Integrin-Domäne
PTB .....	Phosphotyrosinbindungsdomäne

RGD-Sequenz..... Arginin, Glycin und Asparaginsäure-Sequenz  
RTK.....Rezeptortyrosinkinase  
SFK.....Zytoplasmatische Tyrosinkinasen der Src-Familie  
SSC..... Side Scatter  
TLR ..... Toll-Like-Rezeptor  
VCAM-Klasse..... Vaskulären-Zell-Adhäsionsmolekül-Klasse  
VH-Gene Gene die für die variable Region der schweren Immunglobulin-Kette codieren  
VL-Gene... Gene die für die variable Region der leichten Immunglobulin-Kette codieren

## 8 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Bänderdiagramm des Integrins $\alpha$ IIb $\beta$ 3 mit Beschriftung der Domänen und funktionell relevanter Bereiche. Modifiziert nach Lau et al. (2009). Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons (Genehmigung über RightsLink® Copyright Clearance Center).....	7
<b>Abbildung 2:</b> Outside-In- und Inside-Out-Aktivierung. A: Konformationsänderung durch Ligandenbindung (= Outside-In) oder durch Bindung von Talin (= Inside-Out). Modifiziert nach Lau et al. 2009. B: Mechanismus der Integrinaktivierung durch Talin und dessen Regulation über assoziierte Proteine. Modifiziert nach Lau et al. (2009) und Shattil et al. (2010). C: Signalwege von Integrinen zur Regulation zentraler Zellfunktionen. Eigene Darstellung in Anlehnung an Guo and Giancotti (2004). Nachdruck der jeweiligen Abbildungen mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons (Lau et al. 2009) und Springer Nature (Shattil et al. 2010), Genehmigungen über RightsLink® Copyright Clearance Center. ....	10
<b>Abbildung 3:</b> Methoden zur Herstellung monoklonaler Antikörper. Rechts: Herstellung durch humane Hybridomas. Links: Herstellung mittels Phagedisplay. Übernommen aus Brekke and Sandlie (2003). Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature (über RightsLink® Copyright Clearance Center). ....	17
<b>Abbildung 4:</b> HPA-Antigene. A: Übersicht und Lokalisation der bekannten HPA-Antigene. Modifiziert nach Peterson et al. 2013. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons (über RightsLink® Copyright Clearance Center). B: Unterschiedliche Konformationen der PSI-Domäne abhängig von der kombinierten $\alpha$ -Untereinheit. Übernommen aus Santoso et al. (2016). Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health Inc. (über RightsLink® Copyright Clearance Center).....	21
<b>Abbildung 5:</b> Schematische Darstellung des B-Zell ELISpot Assays zur Detektion von Antikörpern gegen $\beta$ 3-Integrinen mit Hybridomzellen. Eine PVDF-Membran wird mit Fänger-Antikörpern (Abs) beschichtet. Nach Inkubation werden nicht gebundene monoklonale Antikörper (Mab) abgewaschen. Gebundene Mabs werden mittels biotinyliertem Antigen (Ag) detektiert. Diese Bindung wird mit Alkalischer Phosphatase (AP) und Substrat auf der Membran als Spot sichtbar gemacht. Total IgG ermöglicht die Detektion aller IgG Antikörper auf der Membran, unabhängig vom Antigen. Übernommen aus Maenner et al. 2016.....	31
<b>Abbildung 6:</b> Titrationsversuche und Negativ-Kontrollen. A: Titrationsversuche zur Evaluation optimaler Antigenkonzentration und Zellzahl zur Detektion von antigenspezifischen IgG gegen $\beta$ 3-Integrine. $n=1$ . B: Negativ-Kontrolle mit dem granulozytären Glykoprotein CD177 und interner Kontrolle mit dem Klon 7D8 (anti-CD177). $n=3$ . Übernommen aus Maenner et al. 2016. ....	32
<b>Abbildung 7:</b> Vergleich zwischen antigenspezifischem und Total-IgG für die beiden Anti- $\alpha$ IIb $\beta$ 3 sezernierenden Zelllinien Gi5 und AP3. Im linken Panel dargestellt für die Zelllinie Gi5, im rechten für AP3. $n=11-12$ . Übernommen aus Maenner et al. 2016. ...	34

<b>Abbildung 8:</b> Grenzverdünnungsversuch mit Gi5 und Ag 8.65 zur Bestimmung der Untergrenze der noch detektierbaren Hybridom- in $10^3$ Myelomzellen. $n=2$ . Übernommen aus Maenner et al. 2016.....	34
<b>Abbildung 9:</b> Spezifitätstestung zur Unterscheidung zwischen Verbund-spezifischen und nicht Verbund-spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen $\beta 3$ -Integrine. Im linken Panel Testung der Verbund-spezifischen Zelllinie Gi5. $n=36$ für Anti- $\alpha$ IIb $\beta 3$ und Anti- $\alpha$ V $\beta 3$ . Im rechten Panel Testung der nicht Verbund-spezifischen Zelllinie AP3. $n=20-27$ für Anti- $\alpha$ IIb $\beta 3$ und Anti- $\alpha$ V $\beta 3$ . Als Negativ-Kontrolle wurde in beiden Ansätzen CD177 verwendet. $n=9-12$ . Übernommen aus Maenner et al. 2016.....	36
<b>Abbildung 10:</b> Testung der Klonalität und Produktivität der Hybridomzelllinie Gi16 im ELISpot-Assay. Im linken Panel ist der Versuch vor Klonierung der Zelllinie dargestellt. $n=6-9$ . Im rechten danach in unterschiedlichen Zellzahlen. $n=2-6$ . In allen Experimenten wurden antigenspezifisches und Total-IgG bestimmt. Übernommen aus Maenner et al. 2016. ....	37
<b>Abbildung 11:</b> Anteil von B-Zellen, entnommen aus EDTA-Blutproben von rand. Spendern, die im Abstand von 24 Stunden isoliert und mittels FACS auf CD19-positive Zellen (B-Zellen) untersucht wurden. Die Zeit ist auf der X-Achse aufgetragen, Der prozentuale Anteil an B-Zellen unter den PBMC auf der Y-Achse. $n=4$ . ....	38
<b>Abbildung 12:</b> Isolierte PBMCs in Stimulationskultur mit IL-2 und R848. Über den Bildern ist der Zeitpunkt der lichtmikroskopischen Aufnahme angegeben. ....	39
<b>Abbildung 13:</b> Isolierte PBMCs in Stimulationskultur mit IL-2 und R848 in Giemsa-Färbung. Die Zellen wurden nach 72 Stunden geerntet, eine Giemsa-Färbung durchgeführt und lichtmikroskopisch ausgewertet. ....	39
<b>Abbildung 14:</b> Vergleich des Anstiegs der CD38-Expression auf B- und T-Zellen unter 72 Stunden Kultur mit und ohne IL-2 und R848 im Vergleich zu den Ausgangswerten nach Isolation. Die Werte danach entsprechen d0 (linkes Panel), jene jeweils mit oder ohne Immunstimulatoren nach 72 Stunden d3 (mittleres und rechtes Panel). Welche Stimulatoren in welchem Ansatz verwendet wurden, kann der Tabelle entnommen werden. $n=4$ .....	40
<b>Abbildung 15:</b> Untersuchung der PBMCs eines Patienten mit GT Typ I auf Antikörper gegen $\alpha$ IIb $\beta 3$ und $\alpha$ V $\beta 3$ . A: Vergleich zwischen immunstimulierten und nicht immunstimulierten PBMCs. $n=6$ . B: Wiederholungen des vorherigen Versuchs, in diesem Ansatz zusätzliche Testung auf anti- $\alpha$ V $\beta 3$ . Alle Ansätze wurden 72 Stunden mit Immunstimulatoren kultiviert. Als Negativ-Kontrollen wurden CD177 sowie ein randomisierter Blutspender mitgeführt. $n=5-6$ . ....	42
<b>Abbildung 16:</b> Untersuchung der PBMCs einer Patientin mit NAIT auf Antikörper gegen $\alpha$ IIb $\beta 3$ und $\alpha$ V $\beta 3$ . Das Experiment wurde in zwei Ansätzen durchgeführt. Es wurden jeweils 200 000 oder 500 000 PBMCs nach 72 Stunden Kultur mit Immunstimulatoren pro Well eingesetzt. CD177 diente als Negativ-Kontrolle, Total-IgG wurde als Positiv-Kontrolle mitgeführt. Als Blanks wurden Wells bezeichnet, die nicht mit Zellen inkubiert, jedoch entsprechend dem Protokoll mit biotinyliertem Protein und Substrat entwickelt wurden. $n=2-3$ . ....	43

## 9 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Übersicht über die häufigsten NAIT-assoziierten HPA-Antigene. Modifiziert nach Peterson et al. 2013. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons (Genehmigung über RightsLink® Copyright Clearance Center).....	20
<b>Tabelle 2:</b> Übersicht über die verwendeten Materialien. ....	25

## 10 Literaturverzeichnis

Arnaout, M. A.; Mahalingam, B.; Xiong, J-P (2005): Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. In *Annual review of cell and developmental biology* 21, pp. 381–410. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.21.090704.151217.

Avraamides, Christie J.; Garmy-Susini, Barbara; Varner, Judith A. (2008): Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. In *Nature reviews. Cancer* 8 (8), pp. 604–617. DOI: 10.1038/nrc2353.

Bakchoul, Tamam; Kubiak, Sebastian; Krautwurst, Annika; Roderfeld, Monika; Siebert, Hans C.; Bein, Gregor et al. (2011): Low-avidity anti-HPA-1a alloantibodies are capable of antigen-positive platelet destruction in the NOD/SCID mouse model of alloimmune thrombocytopenia. In *Transfusion* 51 (11), pp. 2455–2461. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2011.03171.x.

Barczyk, Malgorzata; Carracedo, Sergio; Gullberg, Donald (2010): Integrins. In *Cell and tissue research* 339 (1), pp. 269–280. DOI: 10.1007/s00441-009-0834-6.

Bennett, J. S.; Berger, B. W.; Billings, P. C. (2009): The structure and function of platelet integrins. In *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 7 Suppl 1, pp. 200–205. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2009.03378.x.

Bhatt, Deepak L.; Topol, Eric J. (2003): Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. In *Nat Rev Drug Discov* 2 (1), pp. 15–28. DOI: 10.1038/nrd985.

Brekke, Ole Henrik; Sandlie, Inger (2003): Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. In *Nat Rev Drug Discov* 2 (1), pp. 52–62. DOI: 10.1038/nrd984.

Brighton, T. A.; Evans, S.; Castaldi, P. A.; Chesterman, C. N.; Chong, B. H. (1996): Prospective evaluation of the clinical usefulness of an antigen-specific assay (MAIPA) in idiopathic thrombocytopenic purpura and other immune thrombocytopenias. In *Blood* 88 (1), pp. 194–201.

Brooks, P.; Clark, R.; Cheresh, D. (1994): Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. In *Science* 264 (5158), pp. 569–571. DOI: 10.1126/science.7512751.

Calderwood, David A.; Campbell, Iain D.; Critchley, David R. (2013): Talins and kindlins: partners in integrin-mediated adhesion. In *Nature reviews. Molecular cell biology* 14 (8), pp. 503–517. DOI: 10.1038/nrm3624.

Campbell, Iain D.; Humphries, Martin J. (2011): Integrin structure, activation, and interactions. In *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3 (3). DOI: 10.1101/cshperspect.a004994.

Campbell, K.; Rishi, K.; Howkins, G.; Gilby, D.; Mushens, R.; Ghevaert, C. et al. (2007): A modified rapid monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigen assay for the detection of human platelet antigen (HPA) antibodies: a multicentre evaluation. In *Vox sanguinis* 93 (4), pp. 289–297. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2007.00989.x.



- Carter, Paul J. (2006): Potent antibody therapeutics by design. In *Nature reviews. Immunology* 6 (5), pp. 343–357. DOI: 10.1038/nri1837.
- Chew, D. P.; Bhatt, D. L.; Sapp, S.; Topol, E. J. (2001a): Increased mortality with oral platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists. A meta-analysis of phase III multicenter randomized trials. In *Circulation* 103 (2), pp. 201–206.
- Chew, D. P.; Bhatt, D. L.; Topol, E. J. (2001b): Oral glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. Why don't they work? In *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions* 1 (6), pp. 421–428.
- Coller, B. S.; Seligsohn, U.; West, S. M.; Scudder, L. E.; Norton, K. J. (1991): Platelet fibrinogen and vitronectin in Glanzmann thrombasthenia: evidence consistent with specific roles for glycoprotein IIb/IIIa and alpha v beta 3 integrins in platelet protein trafficking. In *Blood* 78 (10), pp. 2603–2610.
- Cox, Dermot; Brennan, Marian; Moran, Niamh (2010): Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities. In *Nat Rev Drug Discov* 9 (10), pp. 804–820. DOI: 10.1038/nrd3266.
- Cox, K. L.; Devanarayan, V.; Kriauciunas, A.; Manetta, J.; Montrose, C.; Sittampalam, S. (2012): Immunoassay Methods. In *Assay Guidance Manual. Edited by G. Sitta Sittampalam. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.*
- Desgrosellier, Jay S.; Cheresch, David A. (2010): Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. In *Nature reviews. Cancer* 10 (1), pp. 9–22. DOI: 10.1038/nrc2748.
- Dosenovic, Pia; Chakrabarti, Bimal; Soldemo, Martina; Douagi, Iyadh; Forsell, Mattias N. E.; Li, Yuxing et al. (2009): Selective expansion of HIV-1 envelope glycoprotein-specific B cell subsets recognizing distinct structural elements following immunization. In *J Immunol* 183 (5), pp. 3373–3382. DOI: 10.4049/jimmunol.0900407.
- Frame, Margaret C.; Patel, Hitesh; Serrels, Bryan; Lietha, Daniel; Eck, Michael J. (2010): The FERM domain. Organizing the structure and function of FAK. In *Nature reviews. Molecular cell biology* 11 (11), pp. 802–814. DOI: 10.1038/nrm2996.
- Gordon, Kenneth B.; Papp, Kim A.; Hamilton, Tiffani K.; Walicke, Patricia A.; Dummer, Wolfgang; Li, Nicole et al. (2003): Efalizumab for patients with moderate to severe plaque psoriasis. A randomized controlled trial. In *JAMA* 290 (23), pp. 3073–3080. DOI: 10.1001/jama.290.23.3073.
- Guo, Wenjun; Giancotti, Filippo G. (2004): Integrin signalling during tumour progression. In *Nature reviews. Molecular cell biology* 5 (10), pp. 816–826. DOI: 10.1038/nrm1490.
- Haaheim, L. R.; Jonsson, R. (1992): Rapid quality evaluation of hybridomas using ELISPOT and cell-ELISA techniques. In *Immunol Lett* 34 (2), pp. 135–142.

Herold, Gerd (Ed.) (2018): Innere Medizin 2018. Eine vorlesungsorientierte Darstellung : unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung : mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln, Köln: Gerd Herold.

Hood, John D.; Cheresch, David A. (2002): Role of integrins in cell invasion and migration. In *Nature reviews. Cancer* 2 (2), pp. 91–100. DOI: 10.1038/nrc727.

Hoogenboom, H. R.; Bruïne, A. P. de; Hufton, S. E.; Hoet, R. M.; Arends, J. W.; Roovers, R. C. (1998): Antibody phage display technology and its applications. In *Immunotechnology : an international journal of immunological engineering* 4 (1), pp. 1–20.

Hoogenboom, Hennie R. (2005): Selecting and screening recombinant antibody libraries. In *Nature biotechnology* 23 (9), pp. 1105–1116. DOI: 10.1038/nbt1126.

Hutchinson, Michael; Kappos, Ludwig; Calabresi, Peter A.; Confavreux, Christian; Giovannoni, Gavin; Galetta, Steven L. et al. (2009): The efficacy of natalizumab in patients with relapsing multiple sclerosis. Subgroup analyses of AFFIRM and SENTINEL. In *Journal of neurology* 256 (3), pp. 405–415. DOI: 10.1007/s00415-009-0093-1.

Hynes, Richard O. (2002): Integrins. Bidirectional, allosteric signaling machines. In *Cell* 110 (6), pp. 673–687.

Jahnmatz, Maja; Kesa, Gun; Netterlid, Eva; Buisman, Anne-Marie; Thorstensson, Rigmor; Ahlborg, Niklas (2013): Optimization of a human IgG B-cell ELISpot assay for the analysis of vaccine-induced B-cell responses. In *J Immunol Methods* 391 (1-2), pp. 50–59. DOI: 10.1016/j.jim.2013.02.009.

Kamphuis, M. M.; Paridaans, N.; Porcelijn, L.; Haas, M. de; van der Schoot, C. E.; Brand, A. et al. (2010): Screening in pregnancy for fetal or neonatal alloimmune thrombocytopenia: systematic review. In *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 117 (11), pp. 1335–1343. DOI: 10.1111/j.1471-0528.2010.02657.x.

Kehoe, John W.; Kay, Brian K. (2005): Filamentous phage display in the new millennium. In *Chemical reviews* 105 (11), pp. 4056–4072. DOI: 10.1021/cr000261r.

Kiefel, V. (1992): The MAIPA assay and its applications in immunohaematology. In *Transfus Med* 2 (3), pp. 181–188.

Kiefel, V.; Santoso, S.; Weisheit, M.; Mueller-Eckhardt, C. (1987): Monoclonal antibody--specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. In *Blood* 70 (6), pp. 1722–1726.

Killie, Mette Kjaer; Husebekk, Anne; Kjeldsen-Kragh, Jens; Skogen, Bjørn (2008): A prospective study of maternal anti-HPA 1a antibody level as a potential predictor of alloimmune thrombocytopenia in the newborn. In *Haematologica* 93 (6), pp. 870–877. DOI: 10.3324/haematol.12515.

Köhler, G.; Milstein, C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. In *Nature* 256 (5517), pp. 495–497.

- Kuwana, Masataka; Okazaki, Yuka; Ikeda, Yasuo (2014): Detection of circulating B cells producing anti-GPIb autoantibodies in patients with immune thrombocytopenia. In *PloS one* 9 (1), e86943. DOI: 10.1371/journal.pone.0086943.
- Kuwana, Masataka; Okazaki, Yuka; Kaburaki, Junichi; Ikeda, Yasuo (2003): Detection of circulating b cells secreting platelet-specific autoantibody is useful in the diagnosis of autoimmune thrombocytopenia. In *The American Journal of Medicine* 114 (4), pp. 322–325. DOI: 10.1016/S0002-9343(02)01522-X.
- Kuwana, Masataka; Okazaki, Yuka; Kaburaki, Junichi; Kawakami, Yutaka; Ikeda, Yasuo (2002): Spleen is a primary site for activation of platelet-reactive T and B cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. In *J Immunol* 168 (7), pp. 3675–3682.
- Lau, Tong-Lay; Kim, Chungo; Ginsberg, Mark H.; Ulmer, Tobias S. (2009): The structure of the integrin alphaIIbbeta3 transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling. In *The EMBO journal* 28 (9), pp. 1351–1361. DOI: 10.1038/emboj.2009.63.
- Lebwohl, Mark; Tying, Stephen K.; Hamilton, Tiffani K.; Toth, Darryl; Glazer, Scott; Tawfik, Naji H. et al. (2003): A novel targeted T-cell modulator, efalizumab, for plaque psoriasis. In *The New England journal of medicine* 349 (21), pp. 2004–2013. DOI: 10.1056/NEJMoa030002.
- Lerner, Richard A. (2016): Combinatorial antibody libraries. New advances, new immunological insights. In *Nature reviews. Immunology* 16 (8), pp. 498–508. DOI: 10.1038/nri.2016.67.
- Little, M.; Kipriyanov, S.M; Le Gall, F.; Moldenhauer, G. (2000): Of mice and men. Hybridoma and recombinant antibodies. In *Immunology Today* 21 (8), pp. 364–370. DOI: 10.1016/S0167-5699(00)01668-6.
- Lüllmann-Rauch, Renate (2006): Taschenlehrbuch Histologie. 2., komplett überarb. Aufl. Stuttgart: G. Thieme.
- Luo, Bing-Hao; Carman, Christopher V.; Springer, Timothy A. (2007): Structural basis of integrin regulation and signaling. In *Annual review of immunology* 25, pp. 619–647. DOI: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141618.
- Maenner, Denis; Werth, Silke; Bein, Gregor; Santoso, Sentot (2016): Rapid characterization of hybridomas producing monoclonal antibodies against platelet beta3 integrin using ELIspot. In *Platelets* 27 (8), pp. 758–763. DOI: 10.3109/09537104.2016.1173666.
- Marasco, Wayne A.; Sui, Jianhua (2007): The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics. In *Nature biotechnology* 25 (12), pp. 1421–1434. DOI: 10.1038/nbt1363.
- Mehilli, Julinda; Kastrati, Adnan; Schulz, Stefanie; Früngel, Stefan; Nekolla, Stephan G.; Moshage, Werner et al. (2009): Abciximab in patients with acute ST-segment-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention after

- clopidogrel loading. A randomized double-blind trial. In *Circulation* 119 (14), pp. 1933–1940. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.818617.
- Moser, Markus; Legate, Kyle R.; Zent, Roy; Fassler, Reinhard (2009): The tail of integrins, talin, and kindlins. In *Science (New York, N.Y.)* 324 (5929), pp. 895–899. DOI: 10.1126/science.1163865.
- Nelson, Aaron L.; Dhimolea, Eugen; Reichert, Janice M. (2010): Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. In *Nat Rev Drug Discov* 9 (10), pp. 767–774. DOI: 10.1038/nrd3229.
- Nelson, P. N.; Reynolds, G. M.; Waldron, E. E.; Ward, E.; Giannopoulos, K.; Murray, P. G. (2000): Monoclonal antibodies. In *Molecular pathology : MP* 53 (3), pp. 111–117. DOI: 10.1136/mp.53.3.111.
- Newman, P. J.; Allen, R. W.; Kahn, R. A.; Kunicki, T. J. (1985): Quantitation of membrane glycoprotein IIIa on intact human platelets using the monoclonal antibody, AP-3. In *Blood* 65 (1), pp. 227–232.
- Nishifuji, K.; Amagai, M.; Kuwana, M.; Iwasaki, T.; Nishikawa, T. (2000): Detection of antigen-specific B cells in patients with pemphigus vulgaris by enzyme-linked immunospot assay: requirement of T cell collaboration for autoantibody production. In *The Journal of investigative dermatology* 114 (1), pp. 88–94. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2000.00840.x.
- Nordström, Inger; Ferrua, Bernard (1992): Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. In *J Immunol Methods* 150 (1-2), pp. 199–206. DOI: 10.1016/0022-1759(92)90079-9.
- Nurden, Alan T. (2006): Glanzmann thrombasthenia. In *Orphanet journal of rare diseases* 1, p. 10. DOI: 10.1186/1750-1172-1-10.
- Nurden, Alan T.; Pillois, Xavier; Wilcox, David A. (2013): Glanzmann thrombasthenia: state of the art and future directions. In *Semin Thromb Hemost* 39 (6), pp. 642–655. DOI: 10.1055/s-0033-1353393.
- Ortonne, Jean-Paul; Shear, Neil; Shumack, Stephen; Henninger, Eric (2005): Impact of efalizumab on patient-reported outcomes in high-need psoriasis patients. Results of the international, randomized, placebo-controlled Phase III Clinical Experience Acquired with Raptiva (CLEAR) trial NCT00256139. In *BMC dermatology* 5, p. 13. DOI: 10.1186/1471-5945-5-13.
- Peterson, Julie A.; McFarland, Janice G.; Curtis, Brian R.; Aster, Richard H. (2013): Neonatal alloimmune thrombocytopenia: pathogenesis, diagnosis and management. In *Br J Haematol* 161 (1), pp. 3–14. DOI: 10.1111/bjh.12235.
- Pinna, Debora; Corti, Davide; Jarrossay, David; Sallusto, Federica; Lanzavecchia, Antonio (2009): Clonal dissection of the human memory B-cell repertoire following infection and vaccination. In *European journal of immunology* 39 (5), pp. 1260–1270. DOI: 10.1002/eji.200839129.

Polman, Chris H.; O'Connor, Paul W.; Havrdova, Eva; Hutchinson, Michael; Kappos, Ludwig; Miller, David H. et al. (2006): A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. In *The New England journal of medicine* 354 (9), pp. 899–910. DOI: 10.1056/NEJMoa044397.

REKHTMAN, NATASHA. BAINE MARINA. BISHOP JUSTIN A. (2018): Quick reference handbook for surgical pathologists. [Place of publication not identified]: SPRINGER INTERNATIONAL PU.

Sachs, U.; Bakchoul, T.; Bein, G. (2012): Fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie: Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie. In *Transfusionsmedizin* 2 (02), pp. 77–89. DOI: 10.1055/s-0031-1283993.

Sachs, Ulrich J H; Andrei-Selmer, Cornelia L.; Maniar, Amudhan; Weiss, Timo; Paddock, Cathy; Orlova, Valeria V. et al. (2007): The neutrophil-specific antigen CD177 is a counter-receptor for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). In *J Biol Chem* 282 (32), pp. 23603–23612. DOI: 10.1074/jbc.M701120200.

Santoso, S.; Kiefel, V.; Skribelka, E.; Mueller-Eckhardt, C. (1989): Human platelet-specific antibodies as a tool to identify the glycoprotein specificity of mab by MAIPA assay. In *Leukocyte Typing IV. White Cell Differentiation Antigens. Edited by Knapp et al*, pp. 971–973.

Santoso, S.; Lohmeyer, J.; Rennich, H.; Clemetson, K. J.; Mueller-Eckhardt, C. (1984): Platelet surface antigens: analysis by monoclonal antibodies. I. Antibodies. I. Immunological and biochemical studies. In *Blut* 48 (3), pp. 161–170.

Santoso, Sentot; Wihadmadyatami, Hevi; Bakchoul, Tamam; Werth, Silke; Al-Fakhri, Nadia; Bein, Gregor et al. (2016): Antiendothelial  $\alpha v \beta 3$  Antibodies Are a Major Cause of Intracranial Bleeding in Fetal/Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia. In *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 36 (8), pp. 1517–1524. DOI: 10.1161/ATVBAHA.116.307281.

Shattil, Sanford J.; Kim, Chungo; Ginsberg, Mark H. (2010): The final steps of integrin activation: the end game. In *Nature reviews. Molecular cell biology* 11 (4), pp. 288–300. DOI: 10.1038/nrm2871.

Shattil, Sanford J.; Newman, Peter J. (2004): Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. In *Blood* 104 (6), pp. 1606–1615. DOI: 10.1182/blood-2004-04-1257.

Shimaoka, Motomu; Takagi, Junichi; Springer, Timothy A. (2002): Conformational regulation of integrin structure and function. In *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 31, pp. 485–516. DOI: 10.1146/annurev.biophys.31.101101.140922.

Smith, George P.; Petrenko, Valery A. (1997): Phage Display. In *Chem. Rev.* 97 (2), pp. 391–410. DOI: 10.1021/cr960065d.

Socher, Ines; Andrei-Selmer, Cornelia; Bein, Gregor; Kroll, Hartmut; Santoso, Sentot (2009): Low-avidity HPA-1a alloantibodies in severe neonatal alloimmune

thrombocytopenia are detectable with surface plasmon resonance technology. In *Transfusion* 49 (5), pp. 943–952. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2008.02065.x.

Socher, Ines; Zwingel, Claudia; Santoso, Sentot; Kroll, Hartmut (2008): Heterogeneity of HPA-3 alloantibodies: consequences for the diagnosis of alloimmune thrombocytopenic syndromes. In *Transfusion* 48 (3), pp. 463–472. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2007.01550.x.

Steg, Ph Gabriel; James, Stefan K.; Atar, Dan; Badano, Luigi P.; Blömstrom-Lundqvist, Carina; Borger, Michael A. et al. (2012): ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. In *European heart journal* 33 (20), pp. 2569–2619. DOI: 10.1093/eurheartj/ehs215.

Stone, Gregg W.; Witzenbichler, Bernhard; Guagliumi, Giulio; Peruga, Jan Z.; Brodie, Bruce R.; Dudek, Dariusz et al. (2008): Bivalirudin during primary PCI in acute myocardial infarction. In *The New England journal of medicine* 358 (21), pp. 2218–2230. DOI: 10.1056/NEJMoa0708191.

Stroncek, D. F.; Shankar, R. A.; Noren, P. A.; Herr, G. P.; Clement, L. T. (1996): Analysis of the expression of NB1 antigen using two monoclonal antibodies. In *Transfusion* 36 (2), pp. 168–174. DOI: 10.1046/j.1537-2995.1996.36296181931.x.

Stupp, Roger; Hegi, Monika E.; Gorlia, Thierry; Erridge, Sara C.; Perry, James; Hong, Yong-Kil et al. (2014): Cilengitide combined with standard treatment for patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CENTRIC EORTC 26071-22072 study). A multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. In *The Lancet Oncology* 15 (10), pp. 1100–1108. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70379-1.

Swerdlow, Steven H. (Ed.) (2017): WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Revised 4th edition. Lyon: International Agency for Research on Cancer (World Health Organization classification of tumours).

Tan, Chen S.; Koralnik, Igor J. (2010): Progressive multifocal leukoencephalopathy and other disorders caused by JC virus. Clinical features and pathogenesis. In *The Lancet Neurology* 9 (4), pp. 425–437. DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70040-5.

Thinn, Aye Myat Myat; Wang, Zhengli; Zhou, Dongwen; Zhao, Yan; Curtis, Brian R.; Zhu, Jieqing (2018): Autonomous conformational regulation of  $\beta 3$  integrin and the conformation-dependent property of HPA-1a alloantibodies. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (39), E9105-E9114. DOI: 10.1073/pnas.1806205115.

Tiller, H.; Killie, M. K.; Skogen, B.; Øian, P.; Husebekk, A. (2009): Neonatal alloimmune thrombocytopenia in Norway: poor detection rate with nonscreening versus a general screening programme. In *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 116 (4), pp. 594–598. DOI: 10.1111/j.1471-0528.2008.02068.x.

Vestweber, Dietmar (2015): How leukocytes cross the vascular endothelium. In *Nature reviews. Immunology* 15 (11), pp. 692–704. DOI: 10.1038/nri3908.

Wagner, C. L.; Mascelli, M. A.; Neblock, D. S.; Weisman, H. F.; Coller, B. S.; Jordan, R. E. (1996): Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. In *Blood* 88 (3), pp. 907–914.

Walsh, Paula N.; Friedrich, David P.; Williams, Julie A.; Smith, Rebecca J.; Stewart, Terri L.; Carter, Donald K. et al. (2013): Optimization and qualification of a memory B-cell ELISpot for the detection of vaccine-induced memory responses in HIV vaccine trials. In *J Immunol Methods* 394 (0), pp. 84–93. DOI: 10.1016/j.jim.2013.05.007.

WARNER, M. N.; MOORE, J. C.; WARKENTIN, T. E.; SANTOS, A. V.; KELTON, J. G. (1999): A prospective study of protein-specific assays used to investigate idiopathic thrombocytopenic purpura. In *Br J Haematol* 104 (3), pp. 442–447. DOI: 10.1046/j.1365-2141.1999.01218.x.

Whittaker, Charles A.; Hynes, Richard O. (2002): Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. In *Molecular biology of the cell* 13 (10), pp. 3369–3387. DOI: 10.1091/mbc.E02-05-0259.

Wienzek-Lischka, Sandra; Krautwurst, Annika; Fröhner, Vanessa; Hackstein, Holger; Gattenlöhner, Stefan; Bräuninger, Andreas et al. (2015): Noninvasive fetal genotyping of human platelet antigen-1a using targeted massively parallel sequencing. In *Transfusion* 55 (6 Pt 2), pp. 1538–1544. DOI: 10.1111/trf.13102.

Wihadmadyatami, Hevi; Röder, Lida; Berghöfer, Heike; Bein, Gregor; Heidinger, Kathrin; Sachs, Ulrich J.; Santoso, Sentot (2016): Immunisation against  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 and  $\alpha$ v $\beta$ 3 in a type 1 variant of Glanzmann's thrombasthenia caused by a missense mutation Gly540Asp on  $\beta$ 3. In *Thromb Haemost* 116 (2), pp. 262–271. DOI: 10.1160/TH15-12-0982.

Winkelhorst, Dian; Murphy, Michael F.; Greinacher, Andreas; Shehata, Nadine; Bakchoul, Taman; Massey, Edwin et al. (2017): Antenatal management in fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: a systematic review. In *Blood* 129 (11), pp. 1538–1547. DOI: 10.1182/blood-2016-10-739656.

Winter, G.; Griffiths, A. D.; Hawkins, R. E.; Hoogenboom, H. R. (1994): Making antibodies by phage display technology. In *Annual review of immunology* 12, pp. 433–455. DOI: 10.1146/annurev.iy.12.040194.002245.

Yednock, T. A.; Cannon, C.; Fritz, L. C.; Sanchez-Madrid, F.; Steinman, L.; Karin, N. (1992): Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. In *Nature* 356 (6364), pp. 63–66. DOI: 10.1038/356063a0.

Zhang, Chonghui (2012): Hybridoma technology for the generation of monoclonal antibodies. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 901, pp. 117–135. DOI: 10.1007/978-1-61779-931-0\_7.

## **11 Publikationsverzeichnis**

### **11.1 Vorträge**

Maenner D, Werth S, Bein G, Santoso S. Characterization of mouse hybridomas producing monoclonal antibodies against platelet aIIb $\beta$ 3 complex using ELISPOT. 2015 Basel. Abstract in: Buser, A.; Taleghani, B. M. (Eds.) (2015): Deutsche Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI). 48. Jahreskongress, Basel, September 2015: Abstracts. Supplement Issue: Transfusion Medicine and Hemotherapy 2015, Vol. 42, Suppl. 1. 1. Aufl. Freiburg im Breisgau: Karger, S.

### **11.2 Publikationen**

Denis Maenner, Silke Werth, Gregor Bein & Sentot Santoso (2016) Rapid characterization of hybridomas producing monoclonal antibodies against platelet  $\beta$ 3 integrin using ELIspot, Platelets, 27:8, 758-763, DOI: 10.3109/09537104.2016.1173666



## 12 Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation

„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, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt 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:

## 13 Danksagung

Mein größter Dank geht an meine Betreuer Herr Professor Bein und Herr Dr. Santoso für die Vermittlung einer exzellenten wissenschaftlichen Ausbildung und einer hervorragenden Betreuung des Projekts sowie generell einer Vermittlung der Begeisterung für wissenschaftliches Arbeiten im Allgemeinen und speziell in den Gebieten der Immunologie, Biochemie und Zellbiologie. Insbesondere bedanken möchte ich bei Herrn Professor Bein für die Überlassung des Themas sowie die Möglichkeit, am Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin arbeiten zu dürfen, für die zahlreichen Diskussionen, die Möglichkeit, Probleme jederzeit rücksprechen zu können und das sehr gute Arbeitsklima.

Weiterhin gilt ein großes Dankeschön allen Kollegen und Mitarbeitern des Instituts, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders gilt dies für die Mitarbeiter von Dr. Santosos Labor und an Silke Werth, Heike Berghöfer, Gabriela Michel und Lida Röder für die nette Zusammenarbeit, Unterstützung und für das Vermitteln der Grundlagen von Laborarbeit.

Besonders bedanken für die gemeinsame Zeit und lustige Zusammenarbeit im Institut möchte ich mich bei meiner Kollegin Dr. Hevi Wihadmadyatami. Es gibt kein wissenschaftliches Problem, über das man nicht lachen könnte.

Außerdem möchte ich mich bei den Teams des Thrombozyten, Granulozyten und HLA-Labors bedanken für die Unterstützung, das Testen meiner Zellkulturen und die Vermittlung von Grundlagentechniken der Laborarbeit.

Zuletzt auch besonderer Dank an meine Freunde und Eltern, ohne die es nicht möglich gewesen wäre, die schwierigen Phasen des wissenschaftlichen Arbeitens zu überstehen. Danke Tanja, Philipp, Hannah, Alina, Gerhard S., Ujjwal, Mario, Sabrina, Max, Elisa, Gerhard M., Mustapha, Omar, Felix, Melanie, Jessica, Bora, Jenny, Ines, Annika, Florian, Mareike, Fabian, Sophia, Manuel, Silja, Mazen, Daniel, Meike, Jakob, Elisabeth, Tobias, Matthias, Maria, Dominik, Volker, Andreina, Aki.