

**Seltene / private Thrombozytenantigene und ihre klinische  
Bedeutung im Krankheitsbild der fetalen / neonatalen  
Alloimmunthrombozytopenie am Beispiel eines bisher  
unbekannten Alloantigens auf Glykoprotein Ia**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
Feldmann, Korinna Pauline, geb. Köhl  
aus Gießen

Gießen, 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Institut für klinische Immunologie, Transfusionsmedizin und Hämostaseologie

Gutachter: Prof. Dr. med. Bein

Gutachter: PD Dr. med. Sethi

Tag der Disputation: 05. Oktober 2023

*MEINEM VATER*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	<b>Fetale / neonatale Alloimmunthrombozytopenie</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Ätiologie und Pathogenese .....	1
1.1.2	Krankheitsbild, Diagnostik und Therapie .....	2
1.2	<b>Zellbiologische und immunologische Grundlagen</b> .....	<b>4</b>
1.2.1	Thrombozyten und ihre Funktion .....	4
1.2.2	Thrombozytopathie .....	4
1.2.3	Thrombozytopenie .....	5
1.2.4	Antigene auf Thrombozyten .....	6
1.2.5	Geschichte der spezifischen Thrombozytenantikörper.....	10
1.2.6	Thrombozytenimmunologie .....	10
1.3	<b>Falldarstellung</b> .....	<b>11</b>
1.4	<b>Fragestellung</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
2.1	<b>Material</b> .....	<b>14</b>
2.1.1	Geräte .....	14
2.1.2	Verbrauchsmaterial .....	14
2.1.3	Personen.....	15
2.1.4	Chemika und Biochemika.....	15
2.2	<b>Methoden</b> .....	<b>16</b>
2.2.1	Isolierung von Thrombozyten .....	16
2.2.2	Antikörper .....	16
2.2.3	<i>MAIPA</i> -Assay.....	17
2.2.4	Immunpräzipitation .....	18
2.2.5	Amplifikation von Thrombozyten RNA .....	19
2.2.6	Amplifikation von genomischer DNA.....	22
2.2.7	Sequenzierung der PCR-Produkte.....	23
2.2.8	Genotypisierung des Swi <sup>a</sup> -Alloantigen durch Enzymverdau (RFLP) ....	23
2.2.9	Konstruktion eines GPIa – Allel-Expressions-Vektor.....	23
2.2.10	Stabile Transfektion des Swi <sup>a</sup> -Alloantigen in CHO-Zellen .....	24
2.2.11	Adhäsion der transfektierten CHO-Zellen auf Kollagen.....	24
2.2.12	Thrombozyten Aggregation .....	25

<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>26</b>
3.1.1	Serologische Identifikation des Antikörpers anti-Swi <sup>a</sup> .....	26
3.1.2	Immunchemische Befunde.....	28
3.1.3	Genetische Analyse.....	29
3.1.4	Analyse einer rekombinanten GPIa allelischen Isoform .....	32
3.1.5	Effekte des Thr <sub>1087</sub> Met Polymorphismus und anti-Swi <sup>a</sup> Alloantikörpers auf die Zellfunktion .....	34
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>36</b>
4.1	<b>Nachweis eines neuen thrombozytären Antigens auf dem Glykoprotein GP Ia .....</b>	<b>36</b>
4.2	<b>Andere „private“ Alloantigene auf dem Glykoprotein GP Ia.....</b>	<b>38</b>
4.3	<b>Assoziation des häufigsten Antikörpers gegen Glykoprotein GP Ia (Anti-HPA-5b) mit dem klinischen Schweregrad der FNAIT.....</b>	<b>40</b>
4.4	<b>Prädiktoren für einen schweren Verlauf der FNAIT (Anti-HPA-1a, HLA DRB3*01:01).....</b>	<b>42</b>
4.5	<b>Fazit und Ausblick.....</b>	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung / Abstract.....</b>	<b>46</b>
5.1	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>46</b>
5.2	<b>Abstract .....</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungen .....</b>	<b>49</b>
<b>8</b>	<b>Tabellen.....</b>	<b>49</b>
<b>9</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>50</b>
<b>10</b>	<b>Publikationsverzeichnis .....</b>	<b>56</b>
<b>11</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>57</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>58</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Fetale / neonatale Alloimmunthrombozytopenie

### 1.1.1 Ätiologie und Pathogenese

Bei der fetalen oder neonatalen Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT) kommt es durch mütterliche Antikörper gegen kindliche Thrombozytenantigene (HPA) zu einer Thrombozytopenie des Fetus oder Neugeborenen.

Historisch wurde die Übertragung eines Faktors auf das Neugeborene, der eine maternale Thrombozytopenie auslöste, bereits im 19. Jahrhundert in einem Fallbericht von Professor Dr. med. Rudolf Dohrn aus Marburg 1874 beschrieben. Er beschrieb einen „Morbus maculosus Werlhofii übertragen von der Mutter auf die Frucht“.<sup>1</sup> Eine Bestimmung von Antikörpern war zu dieser Zeit noch nicht möglich. Vermutlich handelte es sich um eine maternale Immunthrombozytopenie, die durch einen Autoantikörper verursacht war.

Erst ca. 80 Jahre später konnte Harrington et al. die Agglutination von mütterlichem Serum mit den kindlichen Thrombozyten, nicht aber mit den mütterlichen Thrombozyten als immunologische Reaktion in Fällen neonataler Thrombozytopenie nachweisen.<sup>2</sup> Daher wurde ein dem Morbus haemolyticus neonatorum ähnlicher Pathomechanismus vermutet. Wenig später erfolgte die Erstbeschreibung eines thrombozytären Alloantigens  $Pl^{A1}$ , heute *Human Platelet Antigen 1a* (HPA-1a),<sup>3</sup> und der Nachweis des korrespondierenden mütterlichen Anti- Antikörpers.<sup>4</sup>

Die Inzidenz der FNAIT mit Differenzierung in verschiedene klinische Schweregrade (Thrombozytenzahl und das Auftreten von schweren Blutungskomplikationen mit Interventionen) ist in prospektiven Studien schwierig zu beurteilen, da eine pränatale Therapie die Häufigkeit von schweren Verläufen vermindert.<sup>5</sup> In verschiedenen Metaanalysen von prospektiven Screening-Studien pränatal und postnatal wurde die Inzidenz für das Auftreten von schweren Thrombozytopenien mit Thrombozytenzahlen von  $< 50 \times 10^9/l$  auf 40 pro 100.000 Neugeborene bestimmt. Für das Auftreten von intrakraniellen Blutungen zeigte sich eine Inzidenz von 10 pro 100.000. Das Krankheitsbild ist damit zwar selten, jedoch eine der wichtigsten Differentialdiagnosen bei einer schweren, isolierten Thrombozytopenie eines sonst unauffälligen Neugeborenen.<sup>5</sup>

Da es sich bei den Alloantikörpern um IgG-Antikörper handelt, werden diese über den Fc-Rezeptor neonatal (FcRn) durch die Plazenta in die fetale Zirkulation transportiert. Häufig kommt es im Verlauf der ersten Schwangerschaft zu einer Immunisierung der Mutter.<sup>6</sup> In retrospektiven Untersuchungen einer klinisch apparenten FNAIT zeigt sich diese zu 40-60% bereits in der 1. Schwangerschaft.<sup>7</sup> Auch der Nachweis von intrakraniellen Blutungen erfolgt in 60-75% der Fälle bereits in Gravida 1 etwa ab der 18. Schwangerschaftswoche und in ca. 55% vor der 28. Schwangerschaftswoche.<sup>8,9</sup> Der genaue Mechanismus der Immunisierung ist bislang nicht vollständig bekannt. Ab etwa der 16. Schwangerschaftswoche können fetale thrombozytäre Glykoproteine bestimmt werden.<sup>10</sup> Die Alloantigen-tragenden Untereinheiten (Integrine) der Glykoproteine sind nicht Thrombozyten-spezifisch und werden unter anderem auch auf den Synzytiotrophoblastzellen exprimiert (z.B. die  $\beta_3$  Integrin-Kette).<sup>11</sup> Diese sind in der Plazenta in direktem Kontakt mit mütterlichem Blut. Abbauprodukte können schon im 1. Trimenon der Schwangerschaft im mütterlichen Blut nachgewiesen werden. Das  $\beta_3$  Integrin, auf dem der HPA-1a/1b Polymorphismus exprimiert wird, ist sowohl auf dem Synzytiotrophoblasten ( $\alpha\beta_3$ -Integrin; Vitronektin-Rezeptor) als auch auf Thrombozyten ( $\alpha 2\beta_3$ -Integrin; Fibrinogen-Rezeptor) exprimiert. Die Hypothese, dass die Schwangere durch Antigene des Synzytiotrophoblasten immunisiert wird, könnte das frühe Auftreten von Anti-HPA-1a Antikörpern bereits in der ersten Schwangerschaft erklären.<sup>11</sup>

### **1.1.2 Krankheitsbild, Diagnostik und Therapie**

In der Mehrzahl der Fälle wird der Verdacht auf das Vorliegen einer fetalen / neonatalen Alloimmunthrombozytopenie post partum gestellt. Klinisch sollte bereits bei Hinweisen auf eine hämorrhagische Diathese eine Diagnostik mittels Bestimmung der Thrombozytenzahlen des Kindes erfolgen. Das klinische Erscheinungsbild kann von milden Zeichen wie Petechien oder Purpura bis zu schweren intrakraniellen Blutungen reichen. Dabei ist die Thrombozytenzahl nicht unbedingt ein Prädiktor für die Schwere der Blutungen. Als Indikation zur Thrombozyten-Transfusion gilt jedoch unabhängig von aktuellen Blutungszeichen eine Thrombozytopenie von  $< 30\text{G/l}$ , da das Risiko für intrakraniellen Blutungen bei niedrigen Thrombozytenzahlen deutlich erhöht erscheint.<sup>12</sup>

Bei lebensbedrohlichen Blutungen sollte so schnell wie möglich eine Thrombozyten-Transfusion mit HPA-kompatiblen Thrombozytenkonzentraten erfolgen. Durch die serologische Bestimmung von plättchenspezifischen Antikörpern der Mutter sowie molekularbiologische Sicherung der materno-fetalen Inkompatibilität für das implizierte

Antigen kann die Diagnose einer FNAIT gesichert werden. Nach der Geburt sollte die Thrombozytenzahl in Abhängigkeit vom Verlauf überwacht werden.<sup>13</sup>

Klinisch inapparente Fälle einer FNAIT treten nebenbefundlich auf, falls die Thrombozytenzahl des Neugeborenen aus anderen Gründen bestimmt wird. Auch hier ist eine serologische Diagnostik bei der Mutter empfohlen, um eine Risikostratifizierung für kommende Schwangerschaften zu ermöglichen.<sup>14</sup>

Zeigt sich die FNAIT bereits pränatal, z.B. im Rahmen einer sonographisch nachgewiesenen intrakraniellen Blutung, ist nach entsprechender serologischer Diagnosesicherung das weitere Vorgehen, z.B. eine vorzeitige Entbindung, interdisziplinär abzustimmen.

Ist eine Sensibilisierung der Mutter bereits bekannt, sollte bei einer erneuten Schwangerschaft eine Risikostratifizierung vorgenommen werden, zu der ggf. die non-invasive fetale HPA-Typisierung gehört.<sup>15</sup>

Je nachdem ob in vorhergehenden Schwangerschaften eine intrakranielle Blutung beim Fetus oder Neugeborenen aufgetreten ist, sollte eine hochdosierte Immunglobulingabe (IVIg) bei der Mutter bereits zu Beginn des ersten Trimesters, spätestens jedoch vor der 24. Schwangerschaftswoche erfolgen.<sup>13</sup> Belastbare Daten zur fetalen Blutungsprophylaxe mit IVIg gibt es vor allem für FNAIT durch anti-HPA-1a-Antikörper, die in der kaukasischen Bevölkerung am häufigsten eine FNAIT hervorrufen (ca. 85% aller FNAIT Fälle).

Am zweithäufigsten werden in der kaukasischen Bevölkerung in FNAIT-Verdachtsfällen anti-HPA-5b Antikörper identifiziert. In einer Metaanalyse unter Verwendung der MEDLINE Datenbank von Alm et al. aus dem Jahr 2022 zeigte sich nur eine schwache Evidenz für das Auftreten von milden Thrombozytopenien bei Schwangerschaften, in denen ein anti-HPA-5b Antikörper gefunden wurde.<sup>16</sup>

Die serologische Diagnostik der mütterlichen Antikörper ist durch den *MAIPA*-Assay langjährig evaluiert. Für die häufigsten Antigene in der kaukasischen Bevölkerung existieren auch Antigen-Schnelltests (HPA1a und HPA5b), jedoch sollte in jedem begründeten Fall einer FNAIT auch ein *MAIPA* sowie ein *cross-match* im indirekten *MAIPA* durchgeführt werden, um ggf. seltene sog. *low-frequency* Antigene (LFHPA) zu entdecken. Dabei wird untersucht, ob maternales Serum Antikörper gegen paternale, ggf. seltene Antigene enthält.

## 1.2 Zellbiologische und immunologische Grundlagen

### 1.2.1 Thrombozyten und ihre Funktion

Thrombozyten gehören zu den zellulären Bestandteilen des Blutes. Die Thrombopoese findet im Knochenmark durch Abschnürung von Megakaryozyten statt. Das renale Hormon Thrombopoietin fördert dabei die Reifung und Proliferation der Zellen. Thrombozyten sind kernlos, discoïd und haben einen Durchmesser von ca. 1,5-3,0 µm. Die Anzahl im Blut variiert zwischen 150.000 und 380.000 /µl als Normwert bei gesunden Erwachsenen. Die Lebensdauer von Thrombozyten beträgt in der Regel 9-12 Tage, bevor sie in Milz, Lunge und Leber abgebaut werden.<sup>17</sup>

Thrombozyten haben eine zentrale Funktion im menschlichen Gerinnungssystem für die Blutstillung (der Hämostase). Über Kollagen, ADP und den von-Willebrand-Faktor (vWF) aus der Gefäßwand wird bei Verletzungen eine Adhäsion der Thrombozyten an das Endothel und die Bildung eines „weißen“ Plättchenthrombus erreicht.<sup>18</sup> Der Glykoprotein-Komplex GP Ib/IX bildet dabei den Rezeptor für den von-Willebrand-Faktor, der bei einer Verletzung der Gefäßwand aus dem Blutstrom an extrazellulärer Matrix adhärirt. Die Thrombozyten werden über die Adhäsion aktiviert und schütten ihrerseits weitere Faktoren aus (vWF, Thromboxan A<sub>2</sub>, ADP, PDGF, Serotonin und PAF). Diese Faktoren führen einerseits zur Vasokonstriktion und Verlangsamung des Blutstroms, andererseits aktivieren sie weitere Thrombozyten. Durch die verschiedenen Aktivatoren kommt es zu einer Aktivierung der Thrombozyten mit Veränderung der Oberfläche und Ausstülpung von Pseudopodien. Durch Thrombin wird die Thrombozytenaggregation der aktivierten Thrombozyten untereinander gefördert. Der Glykoprotein-Komplex GP IIb/IIIa spielt dabei eine zentrale Rolle, weil er nach Aktivierung vermehrt exprimiert wird und über die Bindung zu Fibrinogen die Vernetzung des Thrombus ermöglicht. Außerdem verstärkt er über Fibronectin-Rezeptoren des Endothels die Adhäsion.<sup>19</sup>

### 1.2.2 Thrombozytopathie

Thrombozytopathien sind Funktionsstörungen der Thrombozyten. Sie können eingeteilt werden in die zur Störung führende Pathologie oder in angeborene und erworbene Erkrankungen. Sie fallen meistens durch eine verlängerte Blutungszeit mit postoperativen Blutungskomplikationen auf.<sup>20</sup>

Die häufigsten angeborenen Thrombozytopathien betreffen die Störung der Speichergranula (*Storage pool disorders*). Zu den angeborenen Thrombozytopathien gehören die Defekte in bestimmten Glykoproteinen, z.B. das Bernard-Soulier-Syndrom

(Defekt GP Ib/IX/V), die Glanzmann-Thrombasthenie (Defekt GP IIb/IIIa) oder Defekte von bestimmten Rezeptoren (ADP, Kollagen, Thromboxan A<sub>2</sub>).

Klinisch zeigen sich im Rahmen des Bernard-Soulier-Syndroms vor allem subkutane Hämatome, Nasenbluten, Menorrhagie, Petechien und Purpura bei einer meistens nur milden Thrombozytopenie.<sup>21</sup> Die Glanzmann-Thrombasthenie zeigt sich klinisch in Blutungskomplikationen wie Petechien und Schleimhautblutungen bis hin zu intrazerebralen Blutungen abhängig von der Thrombozytenzahl (< 40.000/μl bis < 10.000/μl).<sup>22</sup>

Erworbene Thrombozytopathien sind vor allem durch Medikamente bedingte Funktionseinschränkungen der Thrombozytenfunktion (z.B. Einnahme von nicht-steroidalen Antiphlogistika, Thrombozytenaggregationshemmer) oder Störungen der Thrombozytenbildung im Knochenmark im Rahmen von myelodysplastischen Syndromen oder Leukämien.<sup>23</sup>

Eine Erhöhung der Plasmaprotein-Spiegel im Rahmen von Speichererkrankungen bei der Amyloidose oder dem multiplen Myelom bewirken durch Anlagerung an verschiedene Rezeptoren ebenfalls eine Funktionseinschränkung der Thrombozyten.<sup>24</sup>

### 1.2.3 Thrombozytopenie

Thrombozytopenien verschiedener Genese sind am häufigsten ursächlich für eine hämorrhagische Diathese. Dabei unterscheidet man in der Ätiologie einen Mangel durch verminderte oder gestörte Bildung der Thrombozyten im Knochenmark und einen Thrombozytenmangel durch einen erhöhten peripheren Verbrauch oder Umsatz. Auch ein vermehrtes *Pooling* in der Milz bei Hypersplenismus führt zu einer Thrombozytopenie. Im Normalfall zirkulieren ca. 2/3 der Thrombozyten im Blut, ca. 1/3 ist in der Milz gespeichert.<sup>25</sup>

Ein erhöhter peripherer Verbrauch besteht vor allem bei der disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) unterschiedlicher Genese (z.B. Sepsis, Schock, Einschwemmung von Prothrombinaktivatoren oder ein extrakorporaler Kreislauf). Es kommt zu einer Thrombozytopenie und einem Mangel an Gerinnungsfaktoren. Daraus resultiert eine Verbrauchskoagulopathie mit hämorrhagischer Diathese. Die Therapie besteht einerseits in der Behandlung der kausalen Ursache, andererseits symptomorientiert in der Gabe von Thrombozytenkonzentraten und Gerinnungsfaktoren.<sup>26</sup>

Bei einem erhöhten oder beschleunigten Abbau der Thrombozyten spielen oft thrombozytäre Antikörper eine bedeutende Rolle. Durch Reaktion der Antikörper mit den Thrombozyten kommt es zu einem beschleunigten Abbau im mononukleär-

phagozytären System. Daraus resultiert eine Thrombozytopenie bei reaktiv gesteigerter Thrombozytopenie und vermehrter Megakaryozytenzahl im Knochenmark. Durch die Thrombozytopenie kommt es zu einer Störung in der primären Hämostase und Blutungsneigung mit Blutungen vom petechialen Blutungstyp.<sup>27</sup>

#### **1.2.4 Antigene auf Thrombozyten**

Auf der Oberfläche der Thrombozyten befindet sich eine Vielzahl von Glykoprotein-Komplexen. Die humanen Plättchen-Antigene (HPA) entstehen durch molekulare Polymorphismen im Bereich der Aminosäuren in den jeweiligen Glykoproteinen.<sup>28</sup>

Die Glykoproteine sind durch Ligand-Rezeptor Interaktionen für viele Funktionen der Thrombozyten verantwortlich. Aufgebaut sind sie aus  $\alpha$ - und  $\beta$ - Integrin Ketten mit einer non-kovalenten Bindung und bilden einen Glykoprotein-Komplex auf der Zellmembran.

Das HPA-1a Antigen liegt auf dem Glykoprotein-Komplex GP IIb/ IIIa (Integrin  $\alpha$ 2b, CD41/ Integrin  $\beta$ 3, CD61). Dieser Glykoprotein-Komplex fungiert ebenfalls als Rezeptor für Fibrinogen, Fibronectin, von Willebrand-Faktor, Vitronectin und Faktor VIII der Blutgerinnung.

Der Glykoprotein-Komplex GP Ia/IIa (Integrin  $\alpha$ 2 $\beta$ 1/ CD49b, CD29) fungiert als Kollagen-Rezeptor der Thrombozyten und ist Träger des Antigen HPA-5b.<sup>29</sup>

Immunologisch befinden sich auf der Oberfläche der Thrombozyten sowohl Typ I-Antigene als auch Typ II-Antigene. Die Typ I-Antigene sind auch auf anderen Blut- und Gewebezellen vorkommend und sind auf den Thrombozyten vor allem ABH-Antigene, sowie HLA-Antigene der Klasse I.<sup>30</sup> Die Typ II-Antigene sind überwiegend Thrombozyten spezifisch und werden in das HPA-System eingeteilt. Die thrombozytären Alloantigene sind durch Alloantikörper definiert, die in der Regel erstmals bei im Rahmen von Familienuntersuchungen bei FNAIT Verdachtsfällen nachgewiesen wurden. Aktuell sind über 35 verschiedene HP-Antigensysteme auf der thrombozytären Oberfläche identifiziert.

Tabelle 1 Human Platelet Antigene (HPA) Database

System	Antigen	Original names	Glycoprotein	CD	Reference
HPA-1	HPA-1a HPA-1b	Zw <sup>a</sup> , Pl <sup>A1</sup> Zw <sup>b</sup> , Pl <sup>A2</sup>	GPIIIa	CD61	van Loghem et al, Vox Sang 4:161-9 (1959) Shulman et al, J Clin Invest 40:1597-1620 (1961) van der Weerd et al, Vox Sang 8:513-30 (1963)
HPA-2	HPA-2a HPA-2b	Ko <sup>b</sup> Ko <sup>a</sup> , Sib <sup>a</sup>	GPIb $\alpha$	CD42b	van der Weerd et al, Proc. 8th Congress European Society of Haematology, Vienna 1961. Karger, Basel .P379 van der Weerd Thesis 1965, University of Amsterdam
HPA-3	HPA-3a HPA-3b	Bak <sup>a</sup> , Lek <sup>a</sup> Bak <sup>b</sup>	GPIIb	CD41	von dem Borne et al, Vox Sang 39:113-20 (1980) Kickler et al, Blood 71:894-8 (1988)
HPA-4	HPA-4a HPA-4b	Yuk <sup>b</sup> , Pen <sup>a</sup> Yuk <sup>a</sup> , Pen <sup>b</sup>	GPIIIa	CD61	Friedman et al, Blood 65:1412-5 (1985) Shibata et al, Vox Sang 50:177-80 (1986) Shibata et al, Vox Sang 51:334-6 (1986)
HPA-5	HPA-5a HPA-5b	Br <sup>b</sup> , Zav <sup>b</sup> Br <sup>a</sup> , Zav <sup>a</sup> , Hc <sup>a</sup>	GPIa	CD49b	Kiefel et al, Vox Sang 54:101-6 (1998) Kiefel et al, Blood 73:2219-23 (1989) Santoso et al, Br J Haematol 72:191-8 (1989)
	HPA-6b	Ca <sup>a</sup> , Tu <sup>a</sup>	GPIIIa	CD61	Kekomaki et al, Br J Haematol 83:306-10 (1993) McFarland et al, Blood 81:3318-23 (1993)
	HPA-7b	Mo <sup>a</sup>	GPIIIa	CD61	Kuijpers et al, Blood 81:70-6 (1993)
	HPA-8b	Sr <sup>a</sup>	GPIIIa	CD61	Kroll et al, Blood 76:2296-302 (1990)

	HPA-9b	Max <sup>a</sup>	GPIIb	CD41	Noris et al, Blood 86:1019-26 (1995)
	HPA-10b	La <sup>a</sup>	GPIIIa	CD61	Peyruchaud et al, Blood 89:2422-8 (1997)
	HPA-11b	Gro <sup>a</sup>	GPIIIa	CD61	Simsek et al, Vox Sang 67:302-6 (1994)
	HPA-12b	Iy <sup>a</sup>	GPIIbeta	CD42c	Kiefel, et al, Vox Sang 69:250-4 (1995)
	HPA-13b	Sit <sup>a</sup>	GPIa	CD49b	Santoso et al, Blood 94:4103-11 (1999)
	HPA-14b	Oe <sup>a</sup>	GPIIIa	CD61	Santoso et al, Blood 99:1205-14 (2002)
HPA-15	HPA-15a HPA-15b	Gov <sup>b</sup> Gov <sup>a</sup>	CD109	CD109	Kelton et al, Blood 75:2172-6 (1990) Smith et al, Blood 86:2807-14 (1995)
	HPA-16b	Duv <sup>a</sup>	GPIIIa	CD61	Jallu et al, Blood 99:4449-56 (2002)
	HPA-17b	Va <sup>a</sup>	GPIIb/IIIa	CD61	Kekomaki et al, Transfus Med 2:27-33 (1992)
	HPA-18b	Cab <sup>a</sup>	GPIa	CD49b	Bertrand et al, Transfusion 49:2076-83 (2009)
	HPA-19b	Sta	GPIIIa	CD61	Peterson et al, Transfusion (2009)
	HPA-20b	Kno	GPIIb	CD41	Peterson et al, Transfusion (2009)
	HPA-21b	Nos	GPIIIa	CD61	Peterson et al, Transfusion (2009)
	HPA-22b	Sey	GPIIb	CD41	Peterson et al, Transfusion (2012)

	HPA-23b	Hug	GPIIIa	CD61	Peterson et al, Transfusion (2012)
	HPA-24b	Cab2 <sup>a+</sup>	GPIIb	CD41	Jallu et al, Transfusion (2011)
	HPA-25b	Swi <sup>a</sup>	GPIa	CD49b	Kroll et al, Transfusion (2011)
	HPA-26b	Sec <sup>a</sup>	GPIIIa	CD61	Sachs et al, Thromb Haemost (2012)
	HPA-27b	Cab3 <sup>a+</sup>	GPIIb	CD41	Jallu et al, Transfusion (2013)
	HPA-28b	War	GPIIb	CD41	Poles et al, published online (2013)
	HPA-29b	Kha <sup>b</sup>	GPIIIa	CD61	Sullivan et al, Transfusion (2015)
	HPA-30b	Lab <sup>a</sup>	GPIIb / Q806H	CD41	Wihadmadyatami et al, Transfusion (2015)
	HPA-31b	Cab4 <sup>b+</sup>	GPIX / P123L	CD42a	Jallu et al, J Thromb Haemost (2017)
	HPA-32b	Dom <sup>b</sup>	GPIIIa / N174S	CD61	Sullivan et al, Transfusion (2017)
	HPA-33b	Bl <sup>a</sup>	GPIIIa / D458G	CD61	Poles et al, Transfusion (2019)
	HPA-34b	Bzh <sup>a</sup>	GPIIIa / R91W	CD61	Bertrand et al, Transfusion (2019)
	HPA-35b	Efs <sup>a</sup>	GPIIIa / R479H	CD61	Bertrand et al, Transfusion (2019)

*Tab. 1 Human Platelet Antigene (HPA) Database*  
<https://www.versiti.org/products-services/human-platelet-antigen-hpa-database>

### 1.2.5 Geschichte der spezifischen Thrombozytenantikörper

Die erste Beschreibung eines spezifischen Thrombozytenantigens erfolgte 1959 durch van Loghen et al.<sup>3</sup> Er beschrieb den heutigen anti-HPA-1a (damals Zw<sup>a</sup>) Antikörper durch serologische und genetische Untersuchungen. Der Antikörper wurde erstmals bei einer Frau nach mehrfachen Transfusionen entdeckt und reagierte mit Thrombozyten von 97,6% der getesteten Spender. Es folgte die Entdeckung eines zweiten Antigens 1961 (HPA-2b, Koa) und die Entdeckung des zweiten Allels von HPA-1 (HPA-1b, Zw<sup>b</sup>) 1963 durch van der Weerd et al.<sup>31</sup> Damit war HPA-1 das erste spezifische Thrombozytenantigen-System, in dem Antikörper gegen beide Allele nachgewiesen worden sind. Bis heute sind anti-HPA-1a Antikörper klinisch am bedeutsamsten. Im Verlauf der nächsten Jahrzehnte wurde eine Vielzahl weiterer Antikörper bestimmt und die molekulare Grundlage der korrespondierenden Antigene aufgeklärt. Die historische Bezeichnung nach den Familiennamen der Patienten wurde abgelöst durch eine international einheitlich Nomenklatur (HPA-System).<sup>32</sup> Die abgekürzten Familiennamen werden jedoch weiterhin mitgeführt, ebenfalls der betroffene Glykoprotein-Komplex. Bei vielen seltenen sogenannten „privaten“ oder „low frequency“ Antigenen (*LFHPA*) ist bislang nur der Antikörper gegen das seltene Allel bekannt.

### 1.2.6 Thrombozytenimmunologie

Thrombozytäre Antikörper werden unterschieden in Autoantikörper, Alloantikörper, Isoantikörper und medikamentenabhängige Antikörper.

Autoantikörper gegen Thrombozyten werden zum Beispiel bei der akuten (postinfektiösen) Immunthrombozytopenie gebildet. Meistens geht diesem Krankheitsbild oft bei Kindern eine Virusinfektion voraus. Bei der chronischen primären Immunthrombozytopenie (ITP, Morbus Werlhof) richten sich die Autoantikörper hauptsächlich gegen GP IIb/IIIa und GP Ib/IX und verursachen einen vermehrten Abbau in der Milz.<sup>33</sup>

Sekundär können verschiedene immunmodulatorische Krankheiten, z.B. maligne Lymphome, HIV-Erkrankung und Autoimmunkrankheiten (z.B. Systemischer Lupus Erythematodes, Sjögren-Syndrom) zur Bildung von thrombozytären Autoantikörpern führen und eine Immunthrombozytopenie verursachen.<sup>34</sup>

Alloantikörper sind ursächlich für die FNAIT und ein seltenes Krankheitsbild, die Posttransfusionspurpura (PTP) verantwortlich. Zugrundeliegend ist eine

vorhergehende Sensibilisierung durch Transfusionen oder Schwangerschaften gegen spezifische Plättchenantigene (in 85% d. Fälle HPA 1a). Es kommt nach Transfusion typischerweise mit einer Latenz von 5-12 Tagen zu einer ausgeprägten Thrombozytopenie bis zu Werten unter 10 G/L. Auslöser sind vermutlich hochaffine Alloantikörper, die mit autologen Thrombozyten, die das Alloantigen nicht tragen, kreuzreagieren. Eine passive Alloimmunthrombozytopenie durch Transfusion von HPA-Antikörpern in gefrorenem Frischplasma ist ebenfalls möglich und verursacht akute febrile nicht-hämolytische Transfusionsreaktionen, die meist wesentlich kürzer andauern.<sup>35</sup> Ein Refraktärzustand gegenüber Thrombozyten-Transfusionen wird auch auf thrombozytäre Alloantikörper zurückgeführt. Wesentliche Bedeutung für den Refraktärzustand haben jedoch Antikörper gegen HLA-I-Antigene.<sup>36</sup>

Isoantikörper gegen Thrombozyten sind gegen ein Glykoprotein gerichtet, das dem Patienten fehlt. Sie werden nach Immunisierung (z.B. Transfusionen oder Schwangerschaft) gebildet und reagieren mit den entsprechenden Glykoproteinen der Spenderthrombozyten.<sup>37</sup>

Medikamentenabhängige Antikörper können nach Einnahme von bestimmten Medikamenten gebildet werden. Die Reaktion der Antikörper mit den Thrombozyten ist nur unter Einwirkung des Medikaments oder seiner Metabolite möglich. Nach Absetzen des Medikaments ist die Thrombozytopenie reversibel. Auch serologisch ist ein Nachweis der Antikörper nur in Gegenwart des entsprechenden Medikaments oder seiner Metabolite möglich.<sup>38</sup>

### **1.3 Falldarstellung**

In dem uns vorliegenden Fall handelte es sich um eine Familie mit Nachweis einer fetalen Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT). Die erste Schwangerschaft der Mutter verlief unauffällig. Auch postpartal wurde bei dem Kind keine hämorrhagische Diathese dokumentiert. In der zweiten Schwangerschaft kam es zu einem Abort in der 35. Schwangerschaftswoche. Nach anfänglich unauffälligem Verlauf der Schwangerschaft und dokumentiert normaler Entwicklung des Fetus (Ultraschall in der 29. Schwangerschaftswoche) verspürte die Mutter in der 35. Schwangerschaftswoche keine Kindsbewegungen mehr. Sonographisch wurden ein großer Hydrocephalus und eine fehlende Herzaktion nachgewiesen. In der Autopsie des Fetus fand sich ein Hydrocephalus aufgrund einer intrakraniellen Massenblutung als Todesursache. In der

serologischen Diagnostik des mütterlichen Serums fanden sich starke Antikörper gegen HPA-1a und außerdem gegen ein bislang unbekanntes Antigen.

Ein Jahr nach dem Nachweis einer fetalen Alloimmunthrombozytopenie wurde die Mutter erneut schwanger (3. Gravida). In der 24. Schwangerschaftswoche zeigte sich in der fetalen Blutprobe eine Thrombozytopenie mit 7.000/ $\mu$ l. Im weiteren Schwangerschaftsverlauf wurden 12 wöchentliche intrauterine Thrombozyten-Transfusionen durchgeführt. Trotz guten Ansprechens auf die Transfusionen zeigte sich wiederholt eine fetale Thrombozytopenie mit minimal 12.000/ $\mu$ l als Ausdruck für die starke klinische Relevanz der mütterlichen Antikörper. In der 36. Schwangerschaftswoche wurde eine Sectio caesaria durchgeführt. Eine sofortige Thrombozyten-Transfusion ließ die Thrombozytenzahl des Kindes auf 320.000/ $\mu$ l ansteigen. Bis zum Tag 7 post partum fiel die Thrombozytenzahl erneut auf minimal 92.000/ $\mu$ l ab und normalisierte sich im weiteren Verlauf wieder. Die Gabe von Immunglobulinen beim Kind war nicht notwendig. Blutungskomplikationen traten nicht auf, das Kind konnte gesund entlassen werden.

## 1.4 Fragestellung

Die überwiegende Zahl der fetalen und neonatalen Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT) werden durch einen Antikörper gegen das Thrombozytenantigen HPA-1a ausgelöst.<sup>7,39,40</sup> Durch Einsatz eines glykoproteinspezifischen Testverfahrens im *cross-match* zwischen maternalem Serum und paternalen Thrombozyten wurden im Verlauf der letzten Jahrzehnte Antikörper gegen seltene oder „private“ Antigene nachgewiesen.

Durch die serologische Untersuchung eines mütterlichen Serums mit nachgewiesener fetaler Alloimmunthrombozytopenie und fetaler intrakranieller Blutung konnte in unserem Fall neben einem anti-HPA-1a Antikörper noch ein weiterer Antikörper gegen ein bisher unbekanntes Antigen auf dem väterlichen Glykoprotein Ia (Integrin alpha 2; CD49b) nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit sollte nach Resequenzierung des väterlichen kodierenden Gens *ITGA2* ein etwaiger bislang unbekannter Polymorphismus nachgewiesen werden. Außerdem sollte der Polymorphismus nach zielgerichteter Mutagenese eines *ITGA2* tragenden Plasmids und Transfektion in CHO-Zellen eine entsprechende Konfigurationsänderung der Integrin-Kette des Glykoproteins hervorgerufen und auf der Oberfläche exprimiert werden. Das neue Antigen sollte sowohl serologisch als auch durch

Immunpräzipitation des mutierten Proteins nachweisbar sein. Ferner sollte eine diagnostische Methode zum Nachweis der putativen Mutation (PCR-Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus, RFLP) zur Identifizierung antigenpositiver Individuen entwickelt werden.

Die weitere Familie des Vaters wie auch eine Stichprobe von 500 gesunden Blutspendern sollte untersucht werden, um den Erbgang in der Familie und die Allelfrequenz in der mittelhessischen Bevölkerung zu bestimmen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

- *Thermocycler*: Gene Amp PCR System 9600, Firma Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA
- Spannungsquelle: PHERO Stab 500, Firma Biotec-Fischer, Reiskirchen, Deutschland
- Elektrophoresekammer: Firma Keutz, Reiskirchen, Deutschland
- Sofortbildkamera: *Quick Shooter* QSP 46400 Firma IBI Scientific, Dubuque, Iowa, USA
- Transluminator: UVT 400 M, Firma IBI Scientific, Dubuque, Iowa, USA
- Zellzähler: Sysmex F-820 TOA, Firma Medical Electronics, Hamburg, Deutschland
- Sequenziergerät: ABI-Prism 310 Genetic Analyser, Firma Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA
- Plattenphotometer: Titertek, Firma Multiskan MC, Norwegen
- Trio-Thermoblock: Firma Biometra, Göttingen, Deutschland
- Magnetrührer: Ikamag RET, Firma Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
- Zentrifuge: Biofuge A, Firma Heraeus, Hanau, Deutschland
- Vakuumzentrifuge: Firma Keutz, Reiskirchen, Deutschland
- Vortex: VF2, Firma Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
- Durchflusszytometer: Firma Ortho Diagnostic, Neckargemünd, Deutschland
- Rotator: Roto-Rack, Firma Fisher Scientific, Kirchheim, Deutschland
- Schüttelinkubator: Firma GFL, Mannheim, Deutschland
- *Fluoreszenz-microplate-Reader*: Flx-800, Biotek, Neufahrn, Deutschland
- Aggregometer: APACT, Labor Timer, Ahrensburg, Deutschland

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

- Eppendorf-Pipetten, -Multipipetten, -Kombitips: Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Pipettenspitzen: Safe Seal-Tips 1000µl, 100µl, 10µl, Firma Biozym, Oldendorf, Deutschland
- Reaktionsgefäße: 1,7ml, 0,65ml, Firma Sorenson Bioscience, Salt Lake City, Utah, USA

- *White-Caps*: 12ml, Firma Falcon, Heidelberg, Deutschland
- *Blue-Caps*: 50ml, 15ml, Firma Greiner, Nürtingen, Deutschland
- ELISA Mikortiterplatten: Firma Greiner, Nürtingen, Deutschland
- Einmalpipetten: 25ml, 10ml, 5ml, 1ml, Firma Greiner, Nürtingen, Deutschland
- PCR-Gefäße: *STRIP-Ease-8*, 0,2ml, Firma Robbins Scientific, Sunnyvale, California, USA
- Sequenzier-Gefäße: 0,5ml *ABI-Prism Genetic Analyser*, Firma Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA

### 2.1.3 Personen

Es wurden 500 Blutspender im Zentrum für Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums Gießen im Rahmen der immunologischen Typisierung mittels *MAIPA*-Assay mit dem Serum Swi<sup>a</sup> getestet. Die Blutspender waren im Alter von 18 – 68 Jahren und entsprachen den allgemeinen Voraussetzungen zur Blutspende (gesund, mindestens 50 kg Körpergewicht, keine Operationen oder andere chirurgische Eingriffe in den letzten 4 Monaten vor der Spende).

Die Proben wurden entsprechend dem Ethikvotum vom 08.02.2000, AZ: 05/00, dem Ethikvotum vom 02.07.2009, AZ.: 82/09 und dem ergänzenden Amendment vom 07.04.2014 als Restmaterial von Blutspenden gewonnen und verwendet. Eine entsprechende Einverständniserklärung der Spender wurde eingeholt.

### 2.1.4 Chemika und Biochemika

Verwendete Puffer:

- Phosphatgepufferte Salzlösung (*phosphate buffered saline, PBS*): 80g NaCl; 2g KCl; 14,4g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,4g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> auf 1.000ml Aqua-Bidest pH 4,5
- Tris-gepufferte Salzlösung (*tris-buffered saline, TBS*): 3,03g Tris (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>, NO<sub>3</sub>), 22g NaCl, 12,5ml Nonidet P40 (Sigma, Dreieich, Deutschland), 1,25ml Tween (Sigma, Dreieich, Deutschland), 1,25ml 1M CaCl<sub>2</sub>, in 2,5l Aqua-Bidest
- Coating-Puffer: 1,59g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; 2,93g NaHCO<sub>3</sub>; 0,2g NaN<sub>3</sub>; in 1.000ml Aqua-Bidest pH 9,6
- Solubilisierungs-Puffer: 1,21 g Tris, 5 ml Triton X-100, in 1.000 ml isotoner Kochsalzlösung pH 7,4

Es wurden folgende Reaktions-Kits verwendet:

- *Roti Quick Kit*, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- *Ready-To-Go Kit*, GE Healthcare, München, Deutschland

- *DNeasy*, Qiagen, Düsseldorf, Deutschland
- *QIAquick*, Qiagen, Hilden, Deutschland
- *QuickChange*, Stratagene, Heidelberg, Deutschland

Die einzelne Verwendung wird im Abschnitt Methoden näher bezeichnet.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Isolierung von Thrombozyten

Venöses Blut wurde zunächst mit EDTA (13,4mM in NaCl 0,9%) versetzt, um eine Koagulation zu verhindern (9ml Blut + 1ml EDTA). Dann erfolgte eine Zentrifugation für 25min bei 100g und das plättchenreiche Plasma (PRP) wurde mit der Pipette abgehoben. Nach erneuter Zugabe von EDTA (13,4mM in NaCl 0,9%) erfolgte eine weitere Zentrifugation für zehn Minuten bei 1400g. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und verworfen. Das Thrombozytensediment wurde mit 1ml NaCl 0,9%, pH 6,5 resuspendiert und mit 9ml NaCl 0,9% aufgefüllt („gewaschen“). Es folgten zwei weitere Waschvorgänge mit Zentrifugation, Verwerfen des Überstandes und Resuspension. Zum Schluss wurde das Thrombozytensediment in 1ml NaCl 0,9% mit 25,4mM NaN<sub>3</sub> (0,1%) gelöst und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

### 2.2.2 Antikörper

HPA-5a und HPA-5b Antikörper wurden aus dem Serum von Müttern mit FNAIT sowie von mehrfach transfundierten Patienten im Thrombozytenlabor, Gießen gewonnen.

Monoklonale Antikörper Gi5 und Gi9 gegen GP- Komplex IIb/IIIa und GP- Komplex Ia/IIa wurden in unserem Labor in Gießen hergestellt.<sup>41</sup>

Der Monoklonale Antikörper FMC25 gegen GP-Komplex Ib/IX wurde von der Firma AbD Serotec (*Bio-Rad*, Kidlington / Oxford, UK) erworben.

Die monoklonalen Antikörper gegen die  $\beta_2$ -Mikroglobulin Subunit von HLA Klasse I Antigen (Klon B1G6),  $\alpha_5$ -Integrin Subunit (Klon SAM-1) und  $\beta_1$ -Integrin Subunit (Klon A1A5) wurden von der Firma Immunotech (*Coulter-Immunotech* GmbH, Hamburg, Deutschland) bezogen.

Außerdem wurde zum *Coaten* der Mikrotiterplatten der Ziege-Anti-Maus-IgG (*Jackson ImmunoResearch*, Nr. 115-005-071) verwendet.

### 2.2.3 MAIPA-Assay

Monoklonale antikörper-spezifische Immobilisation von Thrombozyten-Antigenen (*Platelet Antigen*), Durchführung des MAIPA-Assays gemäß der Beschreibung in Kiefel V., 1992.<sup>42</sup>

Beschichten (*Coaten*) von Mikrotiterplatten:

- 5500µl *Coating* Puffer pH 9,65 + 11µl *Goat-Anti-Mouse* (GAH) IgG zugeben
- je 100µl der Lösung in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettieren
- bei Raumtemperatur (20°C) drei Stunden, bei 4°C über Nacht inkubieren (24 Stunden)
- Vor der Verwendung wurden die Platten fünfmal mit TBS-Puffer gewaschen. Beim fünften Waschvorgang wurde der TBS-Puffer für 15 Minuten in den Vertiefungen der Platte belassen, um die Platte zu blockieren und um unspezifische Bindungen zu verhindern.

Isolierte Thrombozyten (zuvor in 0,9% NaCl mit NaN<sub>3</sub> gelöst) in Eppendorf Reaktionsgefäßen:

- Erneut mit 10.000 U/min für eine Minute zentrifugieren und die Überstände absaugen.
- Anschließend erfolgte eine Resuspension mit je 30µl PBS-Puffer.

Inkubation mit AK-Serum Swi<sup>a</sup> und monoklonalem Antikörper Gi 9 (GP Ia/IIa):

- Pro Test wurde eine Positiv-Kontrolle des Antigens (Thrombozyten des Vaters Swi) und eine Kontrolle HPA-5a Antigen positiv getesteter Thrombozyten (Br<sup>a</sup>, ebenfalls GPIa) mitgeführt.
- Zu den in PBS-Puffer suspendierten Thrombozyten HPA-5a-positiv wurde 10µl anti-HPA-5a-Serum (Br<sup>a</sup>-AK) hinzugefügt.
- Zu den in PBS-Puffer suspendierten Thrombozyten der Spender und des Vaters wurden je 20µl Serum-Swi dazugegeben.
- Thrombozyten-Antikörper Suspension wurde bei 37°C für 30 Minuten inkubiert.
- Anschließend wurde je 100µl NaCl 0,9% hinzugegeben, erneut zentrifugiert (10.000U/min, eine Minute), Überstände abgesaugt und mit je 30µl PBS-Puffer resuspendiert.
- Im Anschluss wurden je Ansatz 10µl monoklonaler Antikörper Gi9 (GP Ia/IIa) hinzugegeben und erneut für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Solubilisation, Transfer auf Mikrotiterplatte und Konjugation mit GAH IgG:

- Nach Inkubation wurden je Ansatz erneut 100µl NaCl 0,9% dazugegeben, kurz zentrifugiert (10.000U/min, eine Minute) und die Überstände abgesaugt. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt.
- Danach wurden die Thrombozyten mit je 100µl Solubilisationspuffer resuspendiert und 30 Minuten bei 4°C inkubiert.
- Nach 30 Minuten Zentrifugation (13.000 U/min) bei 4°C wurden die oberen 50µl des Zentrifugats abpipettiert und in neue Eppendorf Reaktionsgefäße mit je 200µl TBS-Puffer gegeben.
- Die zuvor beschichtete / *coated* und gewaschene Mikrotiterplatte wurde getrocknet und dann 100µl jeder Probe in jeweils zwei Vertiefungen gefüllt.
- Die beladene Mikrotiterplatte wurde bei 4°C für 90 Minuten inkubiert.
- In dieser Zeit wurde das Konjugat GAH IgG 1:3000 verdünnt (4µl GAH IgG + 396µl TBS = 1:100, davon 190µl + 5510 µl TBS = 1:3000).
- Nach der Inkubation wurde die Mikrotiterplatte fünfmal mit TBS-Puffer gewaschen und anschließend je 100µl verdünntes Konjugat GAH IgG dazugegeben.
- Anschließend erfolgte eine erneute Inkubation bei 4°C für 120 Minuten.

Anfärbung zur Messung der Extinktion im Photometer:

- Nach der Inkubation wurde die Mikrotiterplatte erneut fünfmal mit TBS-Puffer gewaschen.
- Die Substratlösung wurde mit 6ml Aqua dest. + 2 Tabletten Opd (2 mg; Dakopatts, Hamburg, Deutschland) und 2,5µl Perhydrol hergestellt.
- Durch die Zugabe von je 100µl der Substratlösung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurde die Reaktion gestartet und dann für 15 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit belassen.
- Der Vorgang wurde dann mit je 50µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und im Photometer wurde die Extinktion bei 492nm Wellenlänge gemessen.

#### **2.2.4 Immunpräzipitation**

Thrombozyten und stabile transfektierte CHO-Zellen wurden mit 5mmol/L NHS-LC-Biotin (Pierce, Rockford, IL) oberflächenmarkiert und die Oberflächen-Glykoproteine wurden entsprechend der Beschreibung in Santoso et al.,1994, präzipitiert.<sup>43</sup>

Insgesamt 100µl bis 300µl des markierten Zell-Lysates wurde mit 50µl Serum oder monoklonaler Antikörper (20µg/ml) über Nacht bei 4°C und mit je 100µl Protein G Perlen (Pierce, Rockford, IL) inkubiert. Nach dem Waschen mit Immunpräzipitations-Puffer (50mmol Tris, 150mmol NaCl, 1% Triton X-100), wurden die gebundenen Proteine durch Zugabe von Sodium Dodecyl-Sulfat-(SDS-0,5%)-Puffer für fünf Minuten bei 100°C eluiert. Die Eluate wurden in 7,5% SDS Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) unter *reducing conditions* analysiert.

Separierte Proteine wurden auf Nitrozellulose Membranen transferiert und mit Peroxidase-markiertem Streptavidin sowie einem Chemilumineszens-System (ECL, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) entwickelt.

In einigen Tests wurden markierte Thrombozyten-Lysate dreimal mit dem monoklonalen Antikörper Gi5 (anti-GP IIb/IIIa Komplex) gewaschen, um eine Überlagerung der Banden in der Gel-Elektrophorese durch Verunreinigung zu verhindern. Anschließend erfolgte dann die Immunpräzipitation mit menschlichem Serum.

### 2.2.5 Amplifikation von Thrombozyten RNA

Die Gesamt-RNA wurde durch Anwendung eines Isolationssystems (*Roti Quick Kit*, Roth, Karlsruhe, Deutschland) aus gewaschenen Thrombozyten nach Anleitung des Herstellers isoliert. Die Thrombozyten wurden zuvor aus 10ml EDTA-Blut gewonnen (siehe 2.2.1).

Um die codierende Region von GPIa mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) zu amplifizieren, wurden acht überlappende *Primer-Sets* basierend auf der publizierten cDNA-Sequenz (NM\_002203.3) konstruiert (MWG Biotech GmbH, Ebersberg, Deutschland). Zudem wurden drei weitere *Primer-Sets* ausgewählt, um die teilweise nur kurzen Überlappungen oder Lücken zwischen den acht Regionen sicher vollständig abzudecken (Region 2-3, 3-4 und 5-6).

Orientierung Nr.	Position GP Ia IIa cDNA Sequenzen (5'-3')
V 1	88 – 114 CTG CTG GTG TTA GCG CTC AGT CAA GGC
R 5	3616 – 3593 CAC TGC AGG TAG GTC TGC TGG TTC
R 8	1535 – 1511 CAC AGC ACA CTA CCA AAA TAG GAG C

V 10	1470 – 1495
	CAA TAT CAC GGT TAT TCA GGC TCA CC
R 11	1939 – 1914
	CCC CAT TTA AAT CTC CAT AGC CAT CC
V 12	1486 – 1512
	CAG GCT CAC CGA GGT GAC CAG ATT GGC
V 13	1860 – 1887
	CTT GGG ATC CGA TGG AGC CTT TAG GAG C
R 14	2351 – 2323
	CTA GTG CCA GGG TTT TCC AGA CTG ATG TC
R 17	2851 – 2824
	CAT ACA GGA GAG GAA TTT TGA GGT TGA C
V 18	2304 – 2328
	CTC TTT GGA TTT GCG TGT GGA CAT C
V 21	2772 – 2797
	CAG TTT CCA AGC CTT AAG TGA AAG CC
V 22	128 – 152
	GTT TGG CCT ACA ATG TTG GTC TCC C
R 23	3661 – 3638
	CCA TGC ACG CAA ACA GCA AAC CCT
V 24	646 – 668
	CAA GGC CTT GAT ATA GGC CCC AC
V 27	13 – 32
	ACC CAG CGC AAC TAC GGT CC
R 28	453 – 433
	CCA CAG AGG ACC ACA TGT GAG
R 29	1900 – 1881
	AGT ACT GGA GAT GGC TCC TA
V 35	1670 – 1689
	AAT TTC TTG AAG GCC CCG AG
R 40	2858 – 2839
	TCA GCA TCA TAC AGG AGA GG
V 48	2212 – 2229
	GAA AGG TGC CTG CAG AAG
V 49	2901 – 2921
	CTC TTC GGA TGG GAA TGT TCC
V 65	3002 – 3022
	GCA TGG CAA CTG TAA TCA TCC

R 66	3126 – 3109
	CAG TGG ATT GAT ATC TGC
V 2/3	554 – 580
	CCC TCA TAG ATG TTG TGG TTG TGT GTG
R 2/3	985 – 959
	AGT ACC CAA GAA CTG CTA TGC CAA ACC
Rn 2/3	876 – 851
	CAT TAC TTT CGT AGC ACT TCG TCG CC
V 3/4	1267 – 1292
	GTC CAG AAG ACA TCT CAT GGC CAT TT
R 3/4	1981 – 1957
	GTT GAA CCA CTT GTC CAA AGG CAC C
Vn 3/4	1354 – 1380
	GGT TAC TCT GTG GCT GCA ATT TCT ACT

*Tabelle 2 Verwendete Primer mit Sequenz*

(V: vorwärts; R: rückwärts, Vn: vorwärts nested PCR, Rn: rückwärts nested PCR)

Nummerierung laborintern

A: Adenin      T: Thymin

C: Cytosin     G: Guanin

Region	Primer 1.PCR	Position 5'-3'	Primer 2.PCR	Position 5'-3'	Länge (Basenpaare Bp)
1	V27 - R39		V27 - R28	42 - 437	395
2	V1 - R39		V22 - R39	184 - 675	491
3	V1 - R8		V24 - R8	728 - 1421	693
4	V10 - R11		V12 - R29	1479 - 1854	375
5	V35 - R14		V13 - R14	1894 - 2340	446
6	V48 - R40		V18 - 40	2360 - 2853	493
7	V21 - R23		V21 - R66	2815 - 3121	306
8	V49 - R5		V65 - R5	3082 - 3610	528
2-3	V2/3 - R2/3		V2/3 - Rn2/3	605 - 875	270
3-4	V3/4 - R3/4		Vn3/4 - R3/4	1397 - 1970	573
5-6	V13 - R40		V13 - R17	1906 - 2530	624

*Abbildung 1 Übersicht Regionen der PCR und nested PCR*

Um die cDNA-Amplifikation der Region, welche die Nukleotide 3098 bis 3772 enthält, zu erreichen, wurden folgende *Primer* (Region 8) verwendet:

*Forward Primer* V49 (2997-3077)

*Reverse Primer* R5 (3772-3689)

*Nested Primer* V65 (3098-3120)

Die reverse Transkription der Proben mit 30µl Thrombozyten RNA erfolgte mit dem *Ready-To-Go Kit* (GE Healthcare, München, Deutschland) nach Herstellerangaben.

5µl cDNA wurden in 10x PCR Puffer mit 1,25µl von jedem *Primer* (V49, R5; 5µmol/l), 2,5µl dNTP (1,25mmol/l jedes Nukleotid) und 1,25U *Taq Gold Polymerase* (Perkin Elmer, Vaterstetten, Deutschland) in einem Gesamtvolumen von 25µl gelöst.

Die Amplifikation wurde in einem DNA *Thermal Cycler* der Firma Applied Biosystems (Modell 480, Weiterstadt, Deutschland) durchgeführt. Die Bedingungen für die PCRs sind in Tabelle 3 beschrieben:

PCR-Bedingungen:	° Celsius - Minuten	
Vorlauf	96° - 10'	
<i>Denaturation</i>	93° - 1'	30 Zyklen
<i>Annealing</i>	58° - 1'	
<i>Polymerisation</i>	72° - 1'	
Nachlauf	72° - 10'	
Gesamt-Dauer	110'	

*Tabelle 3 PCR-Bedingungen*

Nach einem anfänglichen Vorlauf bei 96°C für 10 Minuten wurden 30 Zyklen von 93°C für eine Minute, 58°C für eine Minute und 72°C für eine Minute durchgeführt. Am Ende erfolgte eine Verlängerung der Phase bei 72°C für 10 Minuten (Nachlauf). Anschließend wurden je 1µl der PCR-Produkte für 32 Zyklen unter der Verwendung des *Nested Primers* V65 und des *Reverse Primers* R5 unter den gleichen PCR-Bedingungen wie zuvor amplifiziert.

Die PCR-Produkte wurden in 1,6%ige Agarose Gel-Elektrophorese (Biozyme, Hamel, Deutschland) mit Ethidium Bromid analysiert.

### **2.2.6 Amplifikation von genomischer DNA**

Genomische DNA wurde aus EDTA-Blut mittels eines Blut- und Gewebe-Kit (*DNeasy*, Qiagen, Düsseldorf, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben gewonnen. Die Amplifizierung erfolgte mit 100ng genomischer DNA unter Verwendung des *Forward Primers* (nt 52382.547-565) und des *Reverse Primers* (nt 52383.067-047), 2,5µl dNTP (1,25mmol/l jedes Nukleotid) und 1,25U *Taq Gold Polymerase* (Perkin Elmer, Vaterstetten, Deutschland) in einem Gesamtvolumen von 50µl. Es erfolgten 32 Zyklen mit jeweils einer *Denaturation* bei 95°C für eine Minute, einem *Annealing* bei 58°C für eine Minute und einer *Extension* bei 72°C für eine Minute.

### 2.2.7 Sequenzierung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte der amplifizierten cDNA und der genomischen DNA wurden durch eine Gel-Elektrophorese (*SeaKemGTG*, Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) separiert, mit einem Reinigungs-Set (*QIAquick*, Qiagen, Hilden, Deutschland) gereinigt und mit PCR-Primer unter der Verwendung einer *Cycle* Sequenzierung (*Taq-FS dye terminator*, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) sequenziert. Die Analyse erfolgte im Anschluss mit Hilfe des Genanalysator (ABI PRISM, Model 310, Applied Biosystems).

### 2.2.8 Genotypisierung des Swi<sup>a</sup>-Alloantigen durch Enzymverdau (RFLP)

2µl der genomischen DNA (100ng/µl) wurden amplifiziert unter der Verwendung von Intron *Forward Primer* (Exon 28-108, 5'-GCTCTTGTCACATTCCACCAGG-3') und *Reverse Primer* (Exon 28+207, 5'-GGCATGGAGGAAGGCAAGTGTA-3'). Die PCR-*Amplifikation* erfolgte unter folgenden Bedingungen: 30 Zyklen mit *Denaturation* bei 93°C für eine Minute, *Annealing* bei 57°C für eine Minute, *Extension* bei 72°C für eine Minute, sowie eine finale *Extension* von zehn Minuten bei 72°C. Proben mit 8µl des PCR-Produktes wurden mit 5U der Msl I Endonuklease (New England, Biolabs, Frankfurt/ Main, Deutschland) für vier Stunden bei 37°C verdaut. Die Restriktions-Fragmente wurden auf einem 1,6%igen Agarose Gel unter der Verwendung von Tris-Borat-Puffer-System (Biozyme) analysiert. Die Genotypisierung für HPA-1, -2, -3, -5 und -13bw und der GPIa C<sub>759</sub>T - Dimorphismus erfolgten wie durch Santoso et al., 1999, und Carl et al., 2000, beschrieben.<sup>44,45</sup>

### 2.2.9 Konstruktion eines GPIa – Allel-Expressions-Vektor

Eine vollständige GPIa cDNA mit der GPIa Glu<sub>505</sub>Met<sub>1087</sub> Isoform (HPA-5a, Swi<sup>a</sup>) in dem Säugetier-Vektor pMPSV wurde durch *site-directed* Mutagenese unter der Verwendung eines entsprechenden Kits, gemäß den Herstellerangaben, hergestellt (*QuickChange*, Stratagene, Heidelberg, Deutschland).<sup>46</sup>

Für die PCR-Amplifikation wurden *site-directed* Mutagenese *Primer* hergestellt, welche die Nukleotide 3330 bis 3364 der GPIa cDNA umfassen. Nach der Denaturation bei 95°C für 30 Sekunden, wurden Proben von 20ng des Plasmids für zwölf Zyklen amplifiziert (*Denaturation* bei 95°C für 30 Sekunden, *Annealing* bei 55°C für 60 Sekunden, *Extension* bei 65°C für zwölf Minuten). Die PCR-Produkte wurden mit der

Dpn Endonuklease für eine Stunde bei 37°C verdaut und in DH5 $\alpha$  *high-efficiency* kompetente *Escherichia coli* Bakterien (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) transformiert. Die Plasmid DNA der HPA-5a-positiven Klone wurde durch Sequenzierung der Nukleotide wie unter 2.2.7 beschrieben verifiziert.

#### **2.2.10 Stabile Transfektion des Swi<sup>a</sup>-Alloantigen in CHO-Zellen**

CHO-Zellen (*American Type Tissue Collection*, Rockvill, MD) wurden gezüchtet und mit allel-spezifischen GPIa-Konstrukten transfektiert, welche die Isoform Thr<sub>1087</sub> oder Met<sub>1087</sub> enthielten wie von Santoso et al., 1999, beschrieben.<sup>46</sup> Stabil exprimierende Zellen wurden mit Genecitin (G418, 1mg/ml; Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland) selektiert und durch Adhäsion auf Petrischalen mit Kollagen Typ 1 (50 $\mu$ g/ml; Sigma, Dreieich, Deutschland) angereichert. Anschließend wurden die Expression des rekombinanten GPIa/IIa Komplex auf der Zelloberfläche über eine Fluss-Zytometrie gemessen.

#### **2.2.11 Adhäsion der transfektierten CHO-Zellen auf Kollagen**

1ml der transfektierten CHO-Zellen (5x10<sup>6</sup> Zellen) in  $\alpha$ -MEM (PAA, Marburg, Deutschland) wurden mit 35 $\mu$ l 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(und -6)-carboxyfluorescein (*Molecular Probes*, Invitrogen) für 30 Minuten bei 37°C markiert. Die markierten Zellen wurden im Anschluss zweimal mit je 5ml  $\alpha$ -MEM Medium gewaschen und auf eine Konzentration von 1x 10<sup>6</sup>/ml angepasst. Jeweils 300 $\mu$ l Zellsuspension wurden mit 150 $\mu$ l AB Serum, 150 $\mu$ l anti-Swi<sup>a</sup> oder 30 $\mu$ l des monoklonalen Antikörper Gi9 (30 $\mu$ g) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die benötigten Microtiter Platten wurden über Nacht mit Kollagen Typ I (50 $\mu$ g/ml; Sigma, Dreieich, Deutschland), bovinem Serumalbumin (10mg/ml; Sigma) oder monoklonalen Antikörpern Gi14 (10 $\mu$ g/ml) *gecoated*. Anschließend wurden sie dreimal mit 200 $\mu$ l PBS (*phosphate-bufferd-saline*) gewaschen und mit 200 $\mu$ l 1%igem bovinen Serumalbumin (BSA) in PBS für eine Stunde bei 37°C blockiert.

Die Proben der markierten Zellen wurden in dreifacher Ausführung auf die mit BSA oder Kollagen oberflächenbehandelten (*gecoateten*) Platten gegeben. Die Adhäsionszeit betrug 30 Minuten bei 37°C. Nicht-adhärente Zellen wurden vorsichtig aspiriert und durch zweimaliges Waschen von den Platten entfernt. Die gebundenen Zellen wurden in einem *Fluoreszenz-microplate-Reader* (Flx-800, Biotek, Neufahrn, Deutschland) gemessen.

### **2.2.12 Thrombozyten Aggregation**

Thrombozyten reiches Plasma (PRP) aus ACD-antikoaguliertem Blut der Swi<sup>a</sup>-positiven Familienmitglieder und von Swi<sup>a</sup>-negativen Individuen wurde ausgeglichen auf  $3 \times 10^{11}$  PLT/l durch Verdünnung mit autologem Plasma. Die Proben mit 180  $\mu$ l PRP wurden mit 20  $\mu$ l Kollagen (Sigma, Dreieich, Deutschland) in verschiedenen Konzentrationen (2,5  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml, oder 10  $\mu$ g/ml) versetzt. Danach wurde die Lichttransmission mit einem Aggregometer (APACT, Labor *Timer*, Ahrensburg, Deutschland) bei konstanten 37°C gemessen. Für einzelne Tests wurde das Thrombozyten reiche Plasma (PRP) zuvor mit anti-Swi<sup>a</sup> Alloantikörper inkubiert, um eine Auswirkung des Antikörpers auf die Thrombozyten Aggregation zu messen (siehe 3.1.5).

## 3 Ergebnisse

### 3.1.1 Serologische Identifikation des Antikörpers anti-Swi<sup>a</sup>

Die Ergebnisse der *MAIPA*-Assays von mütterlichem Serum Swi gegen die väterlichen Thrombozyten ergaben eine starke Reaktion gegen die immobilisierten Glykoproteine GP IIb/IIIa und GP Ia/IIa. Eine Reaktion mit GP Ib/IX und HLA-I Antigenen konnte nicht beobachtet werden. Zur weiteren Spezifizierung erfolgte die serologische Testung mit bekannten Thrombozyten-Antigenen auf GP IIb/IIIa und GP Ia/IIa. In den Analysen mit Testthrombozyten mit den Antigenen HPA-1, -3, -5, und -13b zeigte sich ein potenter Antikörper gegen HPA-1a, nicht jedoch gegen HPA-1b, HPA-3a/b, HPA-5a/b und HPA-13b. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen war HPA-18b noch nicht beschrieben.

Zur weiteren Differenzierung des zweiten, mit GP Ia/IIa (Integrin  $\alpha_2\beta_1$  / CD49b, CD29) reagierenden Antikörpers wurden weitere Untersuchungen (*MAIPA*-Assays) unter der Verwendung von immobilisierten monoklonalen Antikörpern gegen verschiedene  $\beta_1$ -Integrin-Komplexe durchgeführt. Es wurden jeweils die Thrombozyten des Vaters mit dem mütterlichen Serum (anti-Swi<sup>a</sup>) oder mit anti-HPA-5a inkubiert. Hier zeigte sich eine positive Reaktion des mütterlichen Serums unter der Verwendung von anti- $\alpha_2\beta_1$  (Klon Gi9) und eine negative Reaktion unter Verwendung von anti- $\alpha_5\beta_1$  (Klon SAM-1). Unter Verwendung von anti- $\beta_1$  (Klon A1A5) mit mütterlichem Serum zeigte sich eine schwach positive Reaktion in der Messung der optischen Dichte (OD 492nm).

Der Antikörper anti-HPA-5a reagierte ebenfalls mit anti- $\alpha_2\beta_1$  (Klon Gi9) und auch mit anti- $\beta_1$  (Klon A1A5). Die Testung von anti-HPA-5a mit anti- $\alpha_5\beta_1$  (Klon SAM-1) zeigte eine negative Reaktion bei bekannter Lokalisation des Polymorphismus auf der  $\alpha_2$ -Integrin-Kette.<sup>41</sup>

Mit der Analyse konnte ein bislang unbekanntes Alloantigen auf der Subunit  $\alpha_2$ -Integrin des Thrombozyten-Glykoproteins GP Ia/IIa nachgewiesen werden.

In der Familie des Vaters konnten 3 weitere Personen (Mutter, Bruder und Schwester des Vaters) mit Nachweis des unbekanntes Alloantigen serologisch über den *MAIPA*-Assay identifiziert werden.

Eine Untersuchung von 500 gesunden Blutspendern im *MAIPA*-Assay ergab keine weiteren Swi<sup>a</sup> positiven Befunde.

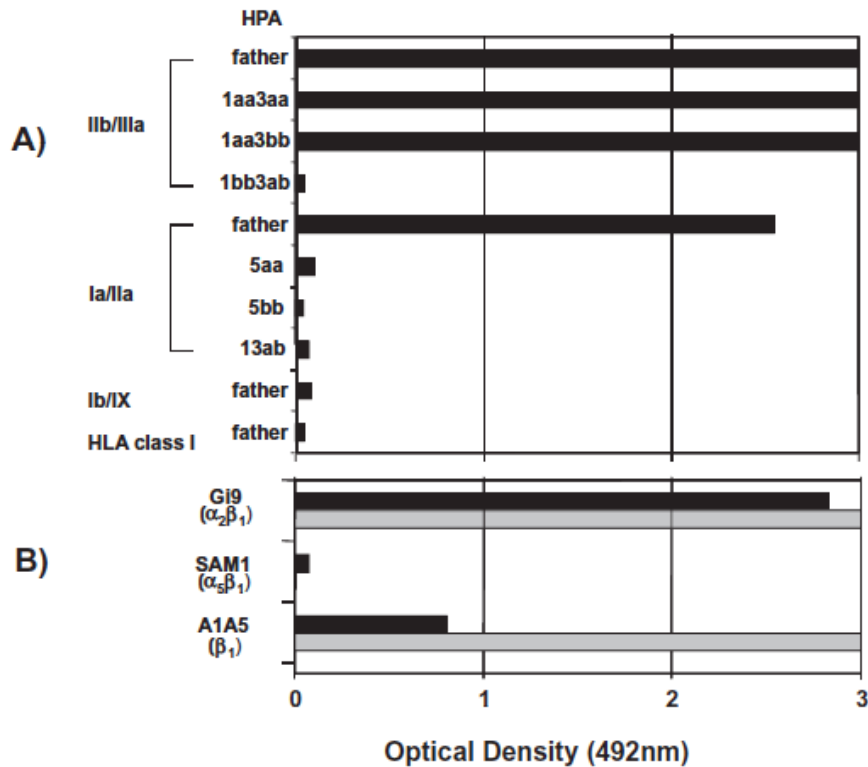


Abbildung 2 Ergebnisse MAIPA-Assay

- A) Mütterliches Serum mit den Thrombozyten des Vaters und bereits genotypisierten Thrombozyten bei immobilisiertem GP IIb/IIIa.  
Mütterliches Serum mit den Thrombozyten des Vaters bei immobilisiertem GP Ia/Ia und bereits genotypisierten Thrombozyten HPA-5aa, HPA-5bb und HPA-13a/b  
Mütterliches Serum mit den Thrombozyten des Vaters bei immobilisiertem GP Ib/IX und HLA class I Antigen.
- B) Inkubation der Thrombozyten des Vaters mit anti-Sw<sup>a</sup> (schwarz) oder mit anti-HPA-5a (grau) unter Verwendung von immobilisierten monoklonalen Antikörpern (MoAbs) gegen unterschiedliche  $\beta_1$ -Integrin-Komplexe  $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$  und  $\beta_1$ .

### 3.1.2 Immunchemische Befunde

Um die Lokalisation des Swi<sup>a</sup> Alloantigen auf dem GPIa/IIa Komplex nachzuweisen, wurde eine Immunpräzipitation mit Biotin markierten Glykoproteinen der väterlichen Thrombozyten durchgeführt. Es zeigte sich eine starke Reaktion des mütterlichen Serums mit GP IIb/IIIa durch den bekannten anti-HPA-1a Antikörper. In Kontrollversuchen mit bekannten anti-HPA-1a und anti-HPA-5a Antikörpern wurden erwartungsgemäß GP IIb/IIIa (Spur 3 in Abb. 6A) und GP Ia/IIa (Spur 4 in Abb. 6A) präzipitiert. Das mütterliche Serum präzipitierte GP Ia (in Abb. 6A als schwache Bande sichtbar) und das erwartete GP IIa war von einem breiten GP IIb Band überlagert. Nach vollständigem Pre-clearing von GP IIb/IIIa der Thrombozytenlysate mit dem monoklonalen Antikörper Gi5 (MoAb) gelang ein Nachweis von GP Ia/IIa durch Präzipitation mit anti-Swi<sup>a</sup>.

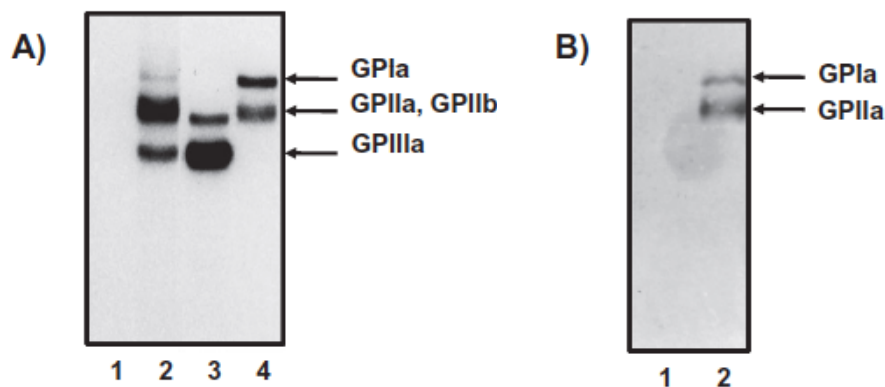


Abbildung 3 Immunpräzipitation väterliche Thrombozyten

- A) 1 – Negativprobe  
2 – mütterliches Serum  
3 – anti-HPA-1a  
4 – anti-HPA-5a
- B) Nach Pre-clearing mit MoAb Gi5 von GP IIb/IIIa  
1 – Präzipitation mit anti-HPA-1a  
2 – Präzipitation mit mütterlichem Serum (anti-Swi<sup>a</sup>)

### 3.1.3 Genetische Analyse

Die väterliche Thrombozyten mRNA wurde nach reverser Transkription mittels acht überlappenden *Primer* Paaren für die kodierende *ITGA2B* Sequenz durch PCR amplifiziert und durch Sanger-Sequenzierung analysiert. Mit den initial geplanten acht *Primer*-Paaren wurden teilweise nur sehr knapp überlappende Sequenzen analysiert. Außerdem zeigten sich Lücken (siehe Abb. zwischen Region 2 und 3, sowie 5 und 6), so dass drei weitere Paare gebildet wurden, um die Übergänge zu erfassen.

Die Nukleotid-Sequenz Analyse der 674 Basenpaare zwischen den Nukleotiden 3098 – 3772 zeigte einen Basenaustausch von C nach T in Position 3347.

Die Analysen der anderen Abschnitte zeigten keine unbekanntenen Polymorphismen im Vergleich zur öffentlichen Gen-Datenbank. Dieses Ergebnis konnte bei direkter Sequenzierung von genomischer DNA der anderen Swi<sup>a</sup>-positiven Personen in der Familie des Vaters reproduziert werden.

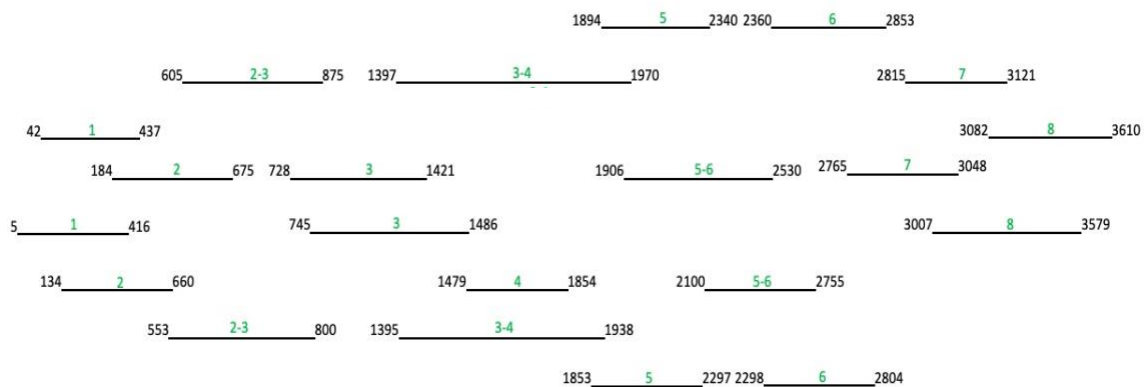


Abbildung 4 Schema der 8 sequenzierten Regionen des *ITGA2B* Gens

*Schema der 8 sequenzierten Regionen des ITGA2B Gens inkl. der Überlappungszonen 2-3, 3-4, 5-6*

- Nummerierung jeweils erstes und letztes erfasstes Nukleotid
- Je Region eine vorwärts und einer rückwärts Sequenz
- Region 4 ist bei Verunreinigung nur vorwärts zu verwenden gewesen, keine Wiederholung der Rückwärts-Sequenz bei Erfassung des Bereichs in Region 3-4

Der Basenaustausch führt zu einem Austausch von Threonin<sub>1087</sub> (ACG) bei Swi<sup>a</sup>-negativen Individuen zu Methionin<sub>1087</sub> (ATG) bei Swi<sup>a</sup>-positiven Individuen. Der C<sub>3347</sub>T Austausch befindet sich am Ende von Exon 28 nur zwei Basen aufwärts der Exon-Intron Bindungsstelle (Abb. 5 B).

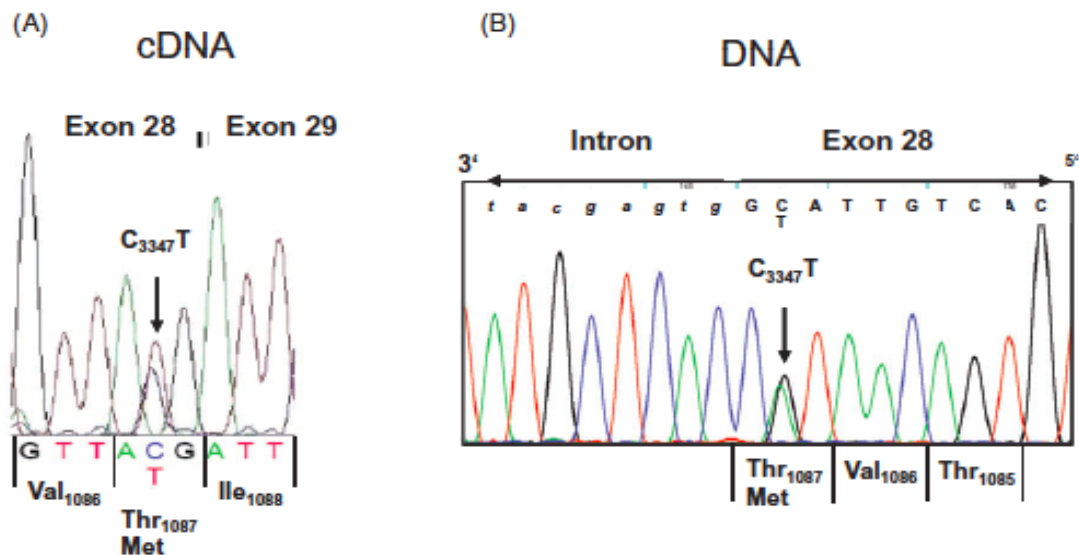


Abbildung 5 Nukleotid Sequenzierung der INDEX Familie Swi

- A) Sequenzierung der cDNA mit Punktmutation C > T in Position 3347
- B) Sequenzierung der DNA mit Darstellung der Exon-Intron Bindungsstelle und der Punktmutation in Position 3347 C > T
- A / B) Darstellung des Aminosäuren-Austauschs von Threonin<sub>1087</sub> (ACG) zu Methionin<sub>1087</sub> (ATG)

Der Austausch führt außerdem zu einer Restriktionsstelle für die Endonuklease Msl I. Daraufhin konnte ein Enzymverdau etabliert werden, der eine Genotypisierung des Swi<sup>a</sup>-Alloantigen mittels PCR-RFLP ermöglichte. Durch Restriktion des 362 Basenpaare (bp) langen PCR-Produkts bei Swi<sup>a</sup>-negativen Individuen in zwei Fragmente mit 150bp und 212bp bei Swi<sup>a</sup>-positiven Individuen gelang eine einfache Genotypisierung (Abb. 6 B)

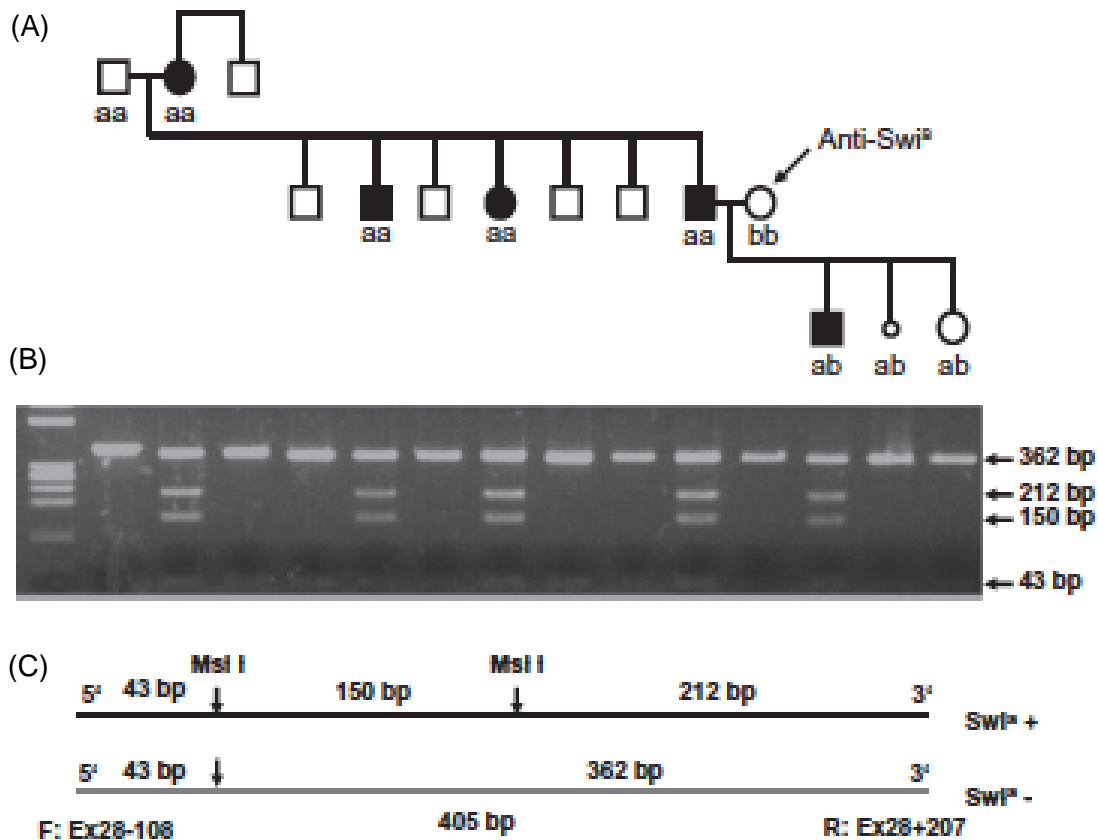


Abbildung 6 Stammbaum der Familie

Stammbaum der Familie mit Genotyp, PCR-RFLP und schematische Darstellung der Fragmente durch die Endonuklease Msl I

- A) Stammbaum der Familien mit Darstellung der Swi<sup>a</sup>-positiven Personen (weiblich ● / männlich ■) und Swi<sup>a</sup>-negativen Personen (weiblich ○ / männlich □) HPA-1a Genotyp (aa, bb, ab) unterhalb der Symbole
- B) PCR-Restriction fragment length polymorphism (RFLP) der Familienmitglieder der Abb. A) entsprechend nach Elektrophorese in 1,6% Agarose Gel mit Ethidiumbromid nach Restriktion durch die Endonuklease Msl I
- C) PCR-Amplifikation mit vorwärts-Primer (F: Exon 28-108 Nukleotide) und rückwärts-Primer (R: Exon 28+207 Nukleotide) und Darstellung der Restriktionsstellen der Endonuklease Msl I durch Pfeile bei Swi<sup>a</sup>-positiven (oben) und Swi<sup>a</sup>-negativen Proben (unten)

In der Index-Familie Swi wurden fünf heterozygote Personen in drei Generationen gefunden. Die fünf Personen waren außerdem alle homozygot bezüglich HPA-5aa. Dies spricht für eine gemeinsame Vererbung des Swi<sup>a</sup>-Alloantigens mit dem HPA-5a Allel. Die Genotypisierung mittels PCR-RFLP der Familie stimmte in jedem Fall mit der serologischen Analyse im *MAIPA*-Assay überein. In der Genotypisierung von 100 gesunden Blutspendern als Stichprobe aus den serologisch mittels *MAIPA*-Assay untersuchten 500 Blutspendern konnte mittels PCR-RFLP kein Swi<sup>a</sup>-positives Individuum gefunden werden. Damit stimmen stichprobenartig die Ergebnisse des PCR RFLP mit den serologischen Ergebnissen von 500 gesunden Blutspendern überein.

#### **3.1.4 Analyse einer rekombinanten GPIa allelischen Isoform**

Um zu überprüfen ob der Aminosäuren-Austausch in Position 1087 tatsächlich zur Bildung des Swi<sup>a</sup>-Antigens führt, wurden Allel-spezifische Konstrukte kodierend für den Wild-Typ (Glu<sub>505</sub>Thr<sub>1087</sub>) und die Mutation (Glu<sub>505</sub>Met<sub>1087</sub>) in stabile CHO-Zellen transfektiert. Die transfektierten Zellen mit GP Ia/IIa Komplex wurden mit NHS-LC-Biotin (Pierce, Rockford, IL) markiert und mittels Immunpräzipitation analysiert.

In der Kontrolle zeigte sich eine Darstellung des GP Ia/IIa Komplexes durch anti-HPA-5a sowohl beim Wild-Typ als auch bei der Mutation. Es zeigte sich jedoch keine Präzipitation durch anti-Swi<sup>a</sup> mit dem Wild-Typ, dafür jedoch nachweislich eine Präzipitation des rekombinanten Proteins mit der GP Ia Mutation (Met<sub>1087</sub>). Dies konnte ebenfalls reproduziert werden, indem die transfektierten Zellen Met<sub>1087</sub> GP Ia im *MAIPA*-Assay mit anti-Swi<sup>a</sup> reagierten.

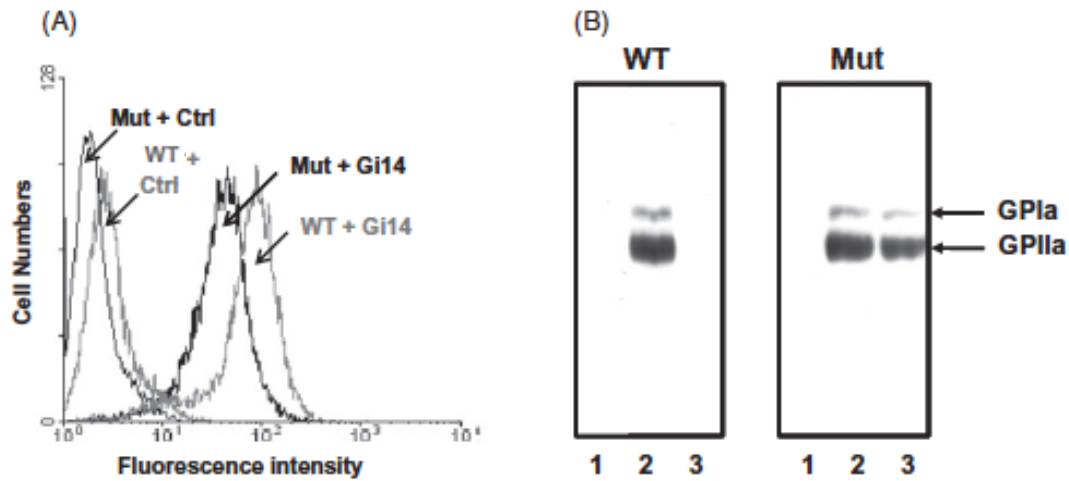


Abbildung 7 Analyse der transfektierten CHO-Zellen

- A) Messung der stabilen transfektierten Zellen in der Durchfluss-Zytometrie mit Expression der Mutation (Mut) und dem Wildtyp (WT) jeweils mit einer isotypischen Kontrolle (Ctrl) und mit dem MoAb Gi14 (anti- $\alpha_2\beta_1$ )
- B) PCR-RFLP Immunpräzipitation der CHO-Zellen als Wildtyp (WT) und Mutation (Mut) jeweils mit
- (1) AB-Serum      (2) Anti-HPA-5a      (3) Anti-Sw<sup>a</sup>

### **3.1.5 Effekte des Thr<sub>1087</sub>Met Polymorphismus und anti-Swi<sup>a</sup> Alloantikörpers auf die Zellfunktion**

Da der GP Ia/IIa Komplex eine Funktion in der Kollagen-Bindung der Thrombozyten hat, wurden Aggregations-Tests durchgeführt. Unter hohen (50µg/ml) und niedrigen (1µg/ml) Konzentrationen von Kollagen zeigte sich kein Unterschied in der Thrombozytenaggregation zwischen Swi<sup>a</sup>-positiven und Swi<sup>a</sup>-negativen Thrombozyten. Es zeigte sich keine Verminderung der Thrombozytenaggregation unter Zugabe von anti-Swi<sup>a</sup> Antikörpern. Diese Ergebnisse konnten durch Analyse der Adhäsion von transfektierten CHO-Zellen auf immobilisiertem Kollagen bestätigt werden. Die Adhäsion von Wild-Typ und Mutation war nicht signifikant unterschiedlich, auch die Zugabe von anti-Swi<sup>a</sup> Antikörpern brachte keine Veränderung der Ergebnisse. In einer Kontrolle mit dem monoklonalen Antikörper Gi9, welcher spezifisch für ein funktional relevantes Epitop des GP Ia/IIa Komplexes ist, wurde dagegen bei allen transfektierten Zellen die Adhäsion mit Kollagen signifikant vermindert.

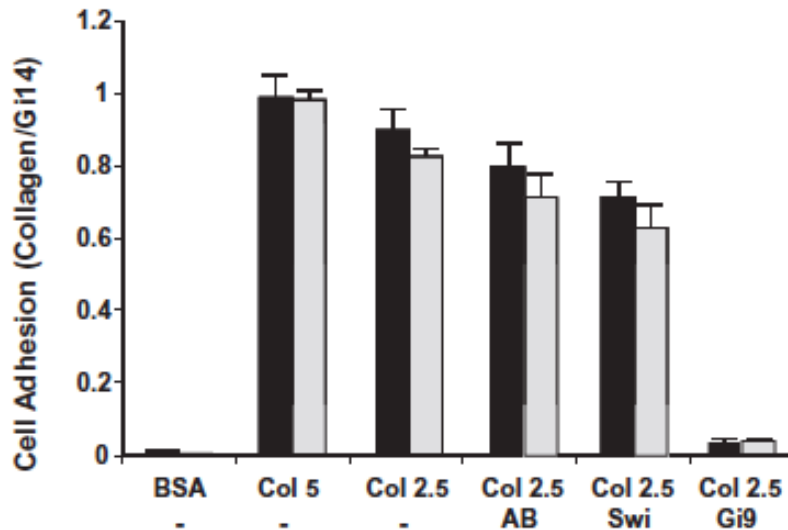


Abbildung 8 Adhäsion CHO-Zellen in der Fluoreszenzmessung

Adhäsion CHO-Zellen auf gecoateten Mikrotiter Platten in der Fluoreszenzmessung

- CHO Zellen mit Wildtyp
- CHO Zellen mit Mutation Thr<sub>1087</sub>Met
- Die Bindung wurde im Verhältnis Collagen-gecoatete Platten zu MoAb Gi14- gecoatete Platten gemessen.
- Keine Adhäsion bei Coating mit BSA
- Normale Adhäsion der Zellen (Wildtyp und Mutation) auf Collagen Typ I unterschiedlicher Konzentration
- Keine signifikant verringerte Adhäsion durch Inkubation der Zellen mit anti-Swi<sup>a</sup> und AB-Serum
- Deutlich verringerte Adhäsion durch Inkubation mit Gi9 MoAb

## 4 Diskussion

### 4.1 Nachweis eines neuen thrombozytären Antigens auf dem Glykoprotein GP Ia

In den letzten Jahrzehnten sind durch die Einführung glykoproteinspezifischer Tests und das *cross-match* im *MAIPA*-Assay zwischen maternalem Serum und paternalen Thrombozyten bei FNAIT Verdachtsfällen sogenannte seltene oder private Thrombozyten-Antigene (LFHPA) nachgewiesen worden. Die klinische Bedeutung dieser Thrombozytenantigene im Rahmen einer fetalen / neonatalen Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT) muss aufgrund der aktuellen Studienlage beurteilt werden, um eine Behandlung zur Prävention von schweren Verläufen empfehlen zu können. Aufgrund der hohen Mortalitätsrate (48%) und Morbiditätsrate bei FNAIT mit intrakranieller Blutung trotz Gabe von Thrombozytenkonzentraten und intravenösen Immunglobulinen (IVIG) wurde nach Prädiktoren einer intrakraniellen Hämorrhagie (ICH) gesucht.<sup>47</sup>

In retrospektiven Studien konnte gezeigt werden, dass die absolute Thrombozytenzahl des Fetus mit der Menge an HPA-Antikörpern der Mutter korreliert. Das Auftreten von schweren Blutungen ließ sich jedoch nicht vorhersagen.<sup>48-50</sup> Intrakranielle Blutungen sind fast immer mit sehr niedrigen Thrombozytenzahlen ( $< 30 \times 10^9/l$ ) assoziiert, jedoch zeigen viele Neugeborene trotz niedriger Thrombozytenzahlen keine Blutungszeichen. In der kaukasischen Bevölkerung sind ausgeprägte Thrombozytopenien mit oder ohne hämorrhagische Diathese vor allem auf eine Immunisierung gegen HPA-1a zurückzuführen.

Zur genaueren Beurteilung der Blutungsgefahr bei Immunisierung gegen HPA-25b sollte die Studienlage zur Bedeutung von anti-HPA-5b Antikörpern näher diskutiert werden. HPA-5b liegt ebenfalls auf dem Glykoprotein GP Ia und ist in der kaukasischen Bevölkerung in Zusammenhang mit einer Untersuchung von FNAIT Verdachtsfällen am zweithäufigsten nachweisbar (ca. 15%).<sup>39,51,52</sup>

In unserem Fall erfolgte die Immunisierung der Mutter im Rahmen der ersten Schwangerschaft. Das erste Kind war HPA-25b-positiv (Swi<sup>a</sup>). Der Fetus mit intrakranieller Blutung (2. Gravida) und das 3. Kind der Mutter waren beide keine Merkmalsträger von HPA-25b (Swi<sup>a</sup>), litten jedoch an einer ausgeprägten

Thrombozytopenie auf Grund des starken anti-HPA-1a Antikörpers der Mutter. Die Genotypisierung von HPA-1 zeigte eine homozygote Verteilung der Allele 1b1b bei der Mutter und 1a1a beim Vater. Somit wiesen alle 3 Kinder den Genotyp HPA-1a1b auf.

Die Geburt des ersten Kindes (HPA-25b positiv, HPA-1a1b) verlief anamnestisch komplikationslos und ohne Hinweis auf eine hämorrhagische Diathese. Eine Blutentnahme zur Kontrolle der Thrombozytenzahl ist nicht dokumentiert, so dass eine Thrombozytopenie durch die mütterlichen anti-HPA-1a und anti-HPA-25b Antikörper zwar nicht ausgeschlossen wurde, jedoch klinisch nicht apparent war.

Die Beteiligung des Antikörpers gegen HPA-25b am schweren Verlauf der FNAIT während der 2. und 3. Schwangerschaft ist unwahrscheinlich und könnte nur indirekt über eine vermehrte hämorrhagische Diathese erfolgt sein. Die Mechanismen und der aktuelle Stand der Literatur bzgl. einer vermehrten hämorrhagischen Diathese bei Nachweis von Thrombozyten-Antikörpern werden in Abschnitt 4.3 und 4.4 näher diskutiert.

Die verschiedenen Möglichkeiten einer Genotypisierung der Thrombozyten wurden im Rahmen dieser Arbeit parallel genutzt. Der serologische Nachweis mittels *MAIPA*-Assay ist zunächst von dem Vorhandensein eines antikörperhaltigen Serums abhängig. Als Screening-Untersuchung zum Nachweis verschiedener Antikörper im Serum ist er sehr gut geeignet. Trotz des zeitlichen Aufwands und der Fehleranfälligkeit durch das mehrfache manuelle Titrieren gibt es zur Antikörpersuche bisher keine zuverlässigere Alternative.<sup>53</sup> Außerdem ist eine Eingrenzung und der Nachweis von bislang unbekanntem Antigenen wie in unserem Fall serologisch durch *cross-match* und Verwendung von immobilisierten Antikörpern möglich.

Die Genotypisierung von Thrombozyten kann durch TaqMan-PCR oder PCR-RFLP erfolgen. Während bei der heute meistens verwendeten TaqMan-PCR (Real-Time-PCR) die Genabschnitte über Fluoreszenzsignale durch entsprechende Polymerasen (TaqMan-Polymerase) sichtbar gemacht werden, erfolgte bei dem PCR-RFLP nach der PCR mit Zugabe spezifischer Endonukleasen ein Nachweis der Dimorphismen im Agarose-Gel. Die Sequenzierung der cDNA wurde im Rahmen dieser Arbeit explorativ genutzt.

Durch die Etablierung eines spezifischen Enzymverdau (PCR-RFLP) für HPA-25b (Swi<sup>a</sup>) kann eine gezielte Untersuchung auf diesen Dimorphismus auch ohne Vorliegen des ursprünglichen Antikörpers erfolgen. Die Sensitivität der Methode wurde durch genotypische Kontrolle der Familienmitglieder in den Sequenzierungen kontrolliert. Die Spezifität wurde stichprobenartig mit den Ergebnissen der gesunden Blutspender im

*MAIPA*-Assay kontrolliert. Es zeigte sich eine 100% Sensitivität und eine Spezifität von 100%.

Nach Etablierung der Nachweismethode konnte im Gegenzug durch transfektierte CHO-Zellen und Immunpräzipitation bestätigt werden, dass der gefundene Aminosäure-Austausch in der kodierenden Sequenz von GP Ia eine Formationsänderung des Epitops und die spezifische Bindung von anti-HPA-25b Antikörpern ermöglicht.

## 4.2 Andere „private“ Alloantigene auf dem Glykoprotein GP Ia

Nach Detektion des HPA-5a/b Antigen-Systems auf GP Ia durch Kiefel et al. wurden retrospektiv mutmaßliche FNAIT Fälle, bei denen bislang kein bekannter Antikörper nachgewiesen werden konnte, im *MAIPA*-Assay untersucht.<sup>54,55</sup> Anti-HPA-5b Antikörper konnten in Assoziation mit FNAIT, Thrombozytopenie und Blutungskomplikationen nachgewiesen werden. Insgesamt erschienen die klinischen Verläufe jedoch weniger schwer als in vergleichbaren durch anti-HPA-1a ausgelösten Fällen.<sup>55</sup>

In der Erstbeschreibung des thrombozytenspezifischen Antikörpers anti-HPA-5b (anti-Br<sup>a</sup>) von Kiefel et al. 1988 wurden vier Fallberichte vorgestellt, in denen im *cross-match* im *MAIPA*-Assay ein bis dahin unbekannter Alloantikörper auf dem Glykoprotein-Komplex GP Ia/IIa im Serum der Mutter und das korrespondierende Antigen auf den väterlichen Thrombozyten nachgewiesen werden konnte. Die Thrombozytenzahlen der vier Kinder lagen zwischen  $19 \times 10^9/l$  und  $75 \times 10^9/l$  und erholten sich in allen vier Fällen im Verlauf innerhalb von maximal 14 Tagen spontan. Es traten bei keinem der vier Kinder schwere Blutungskomplikationen auf.<sup>56</sup>

In den weiteren Untersuchungen konnte HPA-5b bei 21 von 105 (20%) getesteten Blutspendern im *MAIPA*-Assay unter Verwendung des Index-Serums nachgewiesen werden, anders als in den ebenfalls in der Diagnostik verwendeten Immunfloreszenz-Tests. Eine Erklärung für die Häufigkeit des Nachweises von HPA-5b wäre eine im Vergleich zu GP IIb/IIIa relativ niedrigere Zahl an Glykoprotein-Komplexen GP Ia/IIa auf der Zelloberfläche und der damit schwierigere direkte Nachweis in den Immunfloreszenz-Tests.<sup>57</sup> Im *MAIPA*-Assay unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern spezifisch gegen GP Ia/IIa konnten die Antigene HPA-5a und HPA-5b dagegen sicher identifiziert werden.

Zwei weitere Fallberichte mit Nachweis von Thrombozyten-Antikörpern gegen bislang unbekannte Antigene auf GP Ia wurden publiziert.

1999 konnte Santoso et al. eine weitere Punktmutation auf der Subunit  $\alpha_2$ -Integrin des GP Ia mit Bildung eines bislang unbekanntes Antigens HPA-13b (Sit<sup>a</sup>) nachweisen.<sup>46</sup> Klinisch zeigte sich das Bild einer schweren Thrombozytopenie mit Nachweis von  $31 \times 10^9/l$  Thrombozyten am Tag der Geburt. Bei weiter fallenden Thrombozytenzahlen wurde eine Therapie mit Prednisolon ab Tag 2, IVIG an Tag 3-5 und Thrombozyten-Transfusionen durchgeführt. Klinisch zeigten sich an Tag 4 Petechien, jedoch keine intrakranielle Blutung.

Ähnlich wie in unserem Fall erfolgte zunächst die Untersuchung des mütterlichen Serums im *MAIPA*-Assay unter Verwendung eines Test-Thrombozyten Panels mit bekannten HPA-Antigenen sowie den väterlichen Thrombozyten als *cross-match*.

Der Nachweis der Punktmutation Thr<sub>799</sub>Met auf der  $\alpha_2$ -Integrin Kette erfolgte durch Sequenzierung der cDNA der Thrombozyten. In der Untersuchung von 400 gesunden Blutspendern wurde 1 weiterer HPA-13b-positiver Träger gefunden. Es handelt sich somit um ein *low-frequency* Antigen. In einer Messung zeigte sich eine verminderte Thrombozytenaggregation. Dies konnte jedoch in den Messungen zur Adhäsion an Kollagen nicht bestätigt werden. Klinisch zeigte sich bei den anti-HPA-13b-positiven Individuen keine vermehrte Blutungsneigung.

Eine retrospektive Beurteilung des klinischen Verlaufs der FNAIT ist in solchen Fällen nur eingeschränkt verwertbar. Es trat keine intrakranielle Blutung auf, jedoch erfolgte eine suffiziente Behandlung ab Tag 1 post partum und eine Diagnose-Sicherung an Tag 4. Der klinische Verlauf ohne Therapie ist hypothetisch.

Die fehlende Standardisierung der postnatalen Dokumentation der hämorrhagischen Diathese und der Kontrollen der Thrombozytenzahlen erschweren einen Vergleich von Fallberichten.<sup>58</sup>

Im Jahr 2009 konnten Bertrand et al. einen weiteren unbekanntes Thrombozyten-Antikörper mit korrespondierendem Antigen auf GP Ia nachweisen (HPA-18b, Cab<sup>a</sup>).<sup>59</sup> Es handelte sich ebenfalls um einen Fall einer schweren Thrombozytopenie eines Neugeborenen (minimal  $16 \times 10^9/l$ ). Das Kind bekam insgesamt 4 Thrombozyten-Transfusionen bei nur langsam ansteigenden Thrombozytenzahlen in den Kontroll-Messungen. Eine Gabe von IVIG erfolgte an Tag 3 und 4 postnatal, erst dann zeigte sich ein langsamer Anstieg der Thrombozytenzahl im Blut. Bei Entlassung zeigten sich stabil normale Thrombozytenzahlen; eine Blutung, insbesondere eine intrakranielle Blutung, konnte ausgeschlossen werden.

In der serologischen Diagnostik konnte auch hier äquivalent zu den vorbeschriebenen Fällen ein positives *cross-match* mit den väterlichen Thrombozyten und ein Ausschluss einer Reaktion mit bekannten HPA die Diagnose einer FNAIT durch einen bislang unbekanntem Antikörper sichern. Unter Verwendung von glykoproteinspezifischen monoklonalen Antikörpern im *MAIPA*-Assay konnte das väterliche Antigen auf GP Ia/Ila lokalisiert werden. In der Sequenzierung von GP Ia zeigte sich eine Punktmutation in Position 2235 G > T, welche zu einem Aminosäure-Austausch Gln<sub>716</sub>His in GP Ia Exon 17 führte. In den weiteren Untersuchungen zeigt sich ebenfalls keine Verminderung der Adhäsion an Kollagen bei Cab<sup>a</sup>-positiven CHO-Zellen oder unter Verwendung des anti-HPA-18b-positiven Serums.

Somit sind bislang drei verschiedene Thrombozyten-Antigene bzw. Antigen-Systeme auf GP Ia lokalisiert worden. In den Index-Fällen kam es bei keinem der betroffenen Kinder zu einer intrakraniellen Blutung. Es zeigten sich eher milde Verläufe mit spontanem Anstieg der Thrombozytenzahlen bei HPA-5b. Die Berichte mit einer schweren Thrombozytopenie < 30 x 10<sup>9</sup>/l konnten erfolgreich durch intravenöse Immunglobulin-Gabe und Thrombozyten-Transfusionen behandelt werden.

#### **4.3 Assoziation des häufigsten Antikörpers gegen Glykoprotein GP Ia (Anti-HPA-5b) mit dem klinischen Schweregrad der FNAIT**

In zwei älteren (1994 und 1995) prospektiven europäischen Screening-Studien von gesunden Schwangeren konnte keine intrakranielle Blutung durch FNAIT bei anti-HPA-5b-positiven Schwangerschaften nachgewiesen werden. Auch die Thrombozytenzahlen waren nicht signifikant erniedrigt.<sup>60,61</sup> Nach einer Meta-Analyse im Jahre 2022 von fünf europäischen Studien lag die Prävalenz von anti-HPA-5b Antikörpern bei Schwangeren oder Frauen nach einer Schwangerschaft gepoolt bei 1,96% (95% Konfidenzintervall (CI) 1,11-2,84%).<sup>16</sup>

In einer prospektiven Studie aus Japan von Ohto et al. aus dem Jahr 2000, in der eine Korrelation zwischen Antikörper-Titer und Prävalenz einer Thrombozytopenie bei Nachweis von anti-HPA-5b Antikörpern untersucht wurde, zeigte sich bei einem Antikörper-Titer > 64 ein positiv prädiktiver Wert von 50% bzgl. des Auftretens einer Thrombozytopenie (<150 x 10<sup>9</sup>/l). Bei einem Antikörper-Titer von < 64 zeigte sich ein 100% negativer prädiktiver Wert.<sup>62</sup> In der Studie wurden insgesamt über 21.000

Schwangere im ersten Trimester auf anti-HPA-5b Antikörper untersucht. Es zeigten sich 1049 HPA-5b-negative Frauen, von denen bei 138 (0.65%; 95% Konfidenzintervall (CI) 0.54-0.75%) ein positiver Antikörpernachweis erfolgte. Die Antikörpertiter wurden zunächst im 3. Trimester quantifiziert und die Thrombozyten von Mutter und Kind genotypisiert. Postnatal wurde die Thrombozytenzahl aus dem Nabelschnurblut sowohl an Tag 1 als auch an Tag 3 ermittelt. Es zeigten sich an Tag 3 statistisch signifikant leicht verminderte Thrombozytenzahlen  $220 \times 10^9/l$  ( $P < 0,05$ ) der Neugeborenen bei HPA-5b-Inkompatibilität im Vergleich zu  $267 \times 10^9/l$  Thrombozyten bei HPA-5b-kompatiblen Kindern. Schwere Thrombozytopenien oder intrakranielle Blutungen wurden nicht beschrieben. Insgesamt zeigten 5 Kinder eine milde Thrombozytopenie ( $50-149 \times 10^9/l$ ) ohne klinische Blutungszeichen. Bei den Kindern mit Thrombozytopenie zeigte sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied von HPA-5b-inkompatiblen zu HPA-5b-kompatiblen Schwangerschaften. Zusammenfassend gesagt, kann ein niedriger Antikörpertiter im 3. Trimester als negativ prädiktiver Wert bzgl. des Auftretens einer relevanten Thrombozytopenie ( $< 150 \times 10^9/l$ ) gewertet werden. Ein Antikörpertiter  $> 64$  erhöht zwar die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer milden Thrombozytopenie, jedoch unabhängig von einer HPA-5a/b-Inkompatibilität und ohne klinisch relevante Blutungszeichen.<sup>62</sup>

In einer zweiten großen prospektiven Studie mit insgesamt 24.630 Teilnehmern untersuchte der Autor das Auftreten der FNAIT in der japanischen bzw. asiatischen Bevölkerung. Es erfolgte ein Screening auf anti-HPA-4b, anti-HPA-5a und -5b sowie anti-Nak(a). Insgesamt konnten in 0,93% (223 von 24630) der Schwangerschaften spezifische Thrombozyten-Antikörper gefunden werden, davon 168 Fälle anti-HPA-5b (0,68%). Es zeigte sich in 48 HPA-5b-inkompatiblen Schwangerschaften im Vergleich zu einer Kontroll-Gruppe von 161 Schwangerschaften ohne Nachweis von Thrombozyten Antikörpern eine mit 17% versus 2,42% signifikant erhöhte Zahl von milden Thrombozytopenien ( $< 150 \times 10^9/l$ ).<sup>63</sup> Im Vergleich der anti-HPA-5b-positiven Mütter mit HPA-5b-inkompatiblen Schwangerschaften mit HPA-5b-kompatiblen Schwangerschaften zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied (17%, 8/48 inkompatibel zu 8%, 4/53 kompatibel) für das Auftreten einer Thrombozytopenie.<sup>63</sup>

De Vos et al. untersuchten 2021 retrospektiv in einer Kohortenstudie 1864 Verdachtsfälle einer FNAIT. Aufgrund der hohen Prävalenz von anti-HPA-5b Antikörpern insbesondere bei multigravida Patientinnen sollte das Auftreten eines kausalen Zusammenhangs zu schweren intrakraniellen Blutungen analysiert werden.<sup>64</sup>

Von den 1864 Verdachtsfällen auf FNAIT wurden in 161 Fällen (8,6%) anti-HPA-1a Antikörper und in 60 Fällen (3,2%) anti-HPA-5b Antikörper nachgewiesen. Insgesamt wurden in 262 Fällen thrombozytenspezifische Antikörper nachgewiesen, interessanterweise wurden 12 Fälle bei Nachweis von mehr als einen Thrombozyten-Antikörper ausgeschlossen, davon 11 Fälle mit anti-HPA-5b. Eine ähnliche Antikörper-Konstellation wie in unserem Fall wurde somit nicht mit eingeschlossen.

In beiden Gruppen fand sich ein Anteil von 10-11% mit schweren Blutungen (anti-HPA-1a 14/129; anti-HPA-5b 4/40). Im Serum von multigravida Patientinnen mit Thrombozyten-Antikörpern zeigte sich zu 100% (81/81) eine deutliche Thrombozytopenie bei Inkompatibilität von HPA-1a zwischen Mutter und Kind.

Bei Nachweis der anti-HPA-5b Antikörper zeigte sich jedoch nur bei 79% der Thrombozytopenien eine Inkompatibilität (38/48). In 21% der Fälle waren anti-HPA-5b Antikörper demnach vorhanden, jedoch das Kind ebenfalls HPA-5b-negativ.

Das Ergebnis in dieser Studie zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen einer FNAIT durch anti-HPA-1a und anti-HPA-5b. Das Auftreten von Blutungen (76% versus 39%), schweren Thrombozytopenien ( $< 25 \times 10^9/l$  (70% versus 28%) und die Zahl der Thrombozyten im Median ( $17 \times 10^9/l$  versus  $80 \times 10^9/l$ ) waren signifikant unterschiedlich. Die FNAIT-Fälle mit Nachweis von anti-HPA-5b scheinen einen weniger schweren Verlauf mit nur milden Thrombozytopenien zu zeigen. Aufgrund der hohen Prävalenz der anti-HPA-5b Antikörper bei Multigravida sollte bei vermuteter FNAIT eine feto-maternale Inkompatibilität nachgewiesen werden, um Zufallsbefunde auszuschließen. Weiterhin sind schwere Verläufe der FNAIT durch anti-HPA-5b selten und bislang nur durch Einzelfallberichte belegt.<sup>64</sup>

#### **4.4 Prädiktoren für einen schweren Verlauf der FNAIT (Anti-HPA-1a, HLA-DRB3\*01:01)**

Den Ergebnissen in den prospektiven Studien mit einer geringen Anzahl an relevanten Thrombozytopenien und keinen intrakraniellen Blutungen bei Nachweis eines anti-HPA-5b Antikörpers stehen Einzelfallberichte über fatale Blutungen oder schwere Thrombozytopenien bei FNAIT mit Beteiligung eines Antikörpers gegen den GP Ia/Ila-Komplex gegenüber. Auffallend ist in den Fallberichten eine Blutungsneigung (hämorrhagische Diathese), ohne dass schwere Thrombozytopenien ( $< 30 \times 10^9/l$ ) vorlagen.

Der HPA-25b-Polymorphismus liegt wie der HPA-5b Polymorphismus auf dem  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin. Das  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin ist auf verschiedenen Zelltypen exprimiert. Das Expressionslevel variiert jedoch stark, so dass bei niedrigem Expressionslevel auch eine verminderte Phagozytose der antikörperbeladenen Thrombozyten durch Leukozyten denkbar ist und damit eine relevante Thrombozytopenie eher selten ist.<sup>65</sup>

In einer weiteren Untersuchung wurden  $\alpha_2$ -Integrin-*Knock-out*-Mäuse (*ITGA2* *-/-*) beobachtet. Es zeigte sich eine normale Lebenserwartung der Mäuse. Auch die Reproduktion so wie die Blutungszeit waren nicht signifikant verändert.<sup>66</sup>

Das  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin ist außerdem an der Leukozyten Aktivierung beteiligt. In Modellen, in denen die Aktivierung blockiert wurde, zeigte sich keine verminderte Thrombozytenzahl und keine erhöhte Blutungsneigung. Der Wirkstoff Vatelizumab wurde zur Behandlung der Multiplen Sklerose entwickelt und blockiert die  $\alpha_2\beta_1$ -Integrin vermittelte Leukozyten-Aktivierung. In den Zulassungsstudien zur Therapie der Multiplen Sklerose zeigten sich keine signifikant erhöhten Blutungskomplikationen.<sup>67</sup>

Im Rahmen der Untersuchungen wurde auch eine mögliche Beeinflussung der Mutation auf die Rezeptorfunktionen der thrombozytären Glykoproteine diskutiert. Da das Glykoprotein Ia an der Thrombozyten-Adhäsion beteiligt ist, bestand die Möglichkeit einer Veränderung dieser Funktion im Kontakt mit Kollagen. Unsere Aggregationstests zeigten jedoch keinen Unterschied zwischen Swi<sup>a</sup>-positiven und Swi<sup>a</sup>-negativen Merkmalsträgern. Dies bestätigte die Ergebnisse aus den Index-Fällen der ebenfalls auf GP Ia lokalisierten HPA-Antigene HPA-5a/b, HPA-13b und HPA 18b.<sup>46,54,59</sup>

Für eine Beeinflussung der Rezeptorfunktionen von Glykoproteinen im Rahmen der FNAIT durch anti-HPA-1a Antikörper (GP IIb/IIIa) gibt es allerdings Hinweise. In den Untersuchungen wurde eine verminderte Fibrinogen-Bindung unter Anwesenheit von anti-HPA-1a Antikörpern in neonatalen Blutproben gefunden. Dies könnte eine schwere klinische Verlaufsform der FNAIT durch anti-HPA-1a zusätzlich unterstützen.<sup>68</sup>

Um das Auftreten einer intrakraniellen Blutung bei FNAIT besser zu verstehen und eine etwaige pränatale prophylaktische Therapie besser zu steuern, wurden von Santoso et al. anti-HPA-1a-Antikörper von Müttern mit und ohne intrakranielle Blutung bei FNAIT untersucht. Es zeigte sich, dass ein Antikörper-Subtyp anti- $\alpha v\beta_3$  eine stärkere Bindung zu den Endothelzellen zeigte als die anderen Subtypen. Der anti- $\alpha v\beta_3$  Subtyp wurde nur in der Gruppe der Antikörper mit intrakranieller Blutung gefunden, nicht jedoch in

der Gruppe mit FNAIT ohne intrakranielle Blutung. In den weiteren Untersuchungen konnte das Auslösen einer Apoptose der Endothelzellen durch die spezifische Bindung der anti-HPA-1a Antikörper des anti- $\alpha\beta 3$  Subtyps nachgewiesen werden.<sup>69</sup>

Die intrakraniellen Blutungen im Rahmen einer FNAIT sind daher am ehesten auf die Interaktion der HPA-Antikörper mit der Endothelfunktion zurückzuführen und weniger eine Beeinträchtigung der primären Hämostase über die Thrombozytopenie.

Bereits in den prospektiven Screening-Studien zeigt sich ein deutlicher Unterschied in der Inzidenz von nachgewiesenen anti-HPA-1a Antikörpern (200 pro 100 000) im Vergleich zur Inzidenz einer Thrombozytopenie oder intrakraniellen Blutung (40, bzw. 10 pro 100 000).<sup>70</sup> Retrospektiv konnte in einer Fallstudie mit FNAIT durch HPA-1a Antikörper bei 98% der Patientinnen das HLA-Klasse-II-Allel HLA-DRB3\*01:01 nachgewiesen werden. Intrakranielle Blutungen traten bei HLA-DRB3\*01:01-negativen Patientinnen nicht auf.<sup>71</sup> Das HLA-Molekül der Patientinnen präsentierte die  $\beta 3$ -Integrinkette mit dem HPA-1a Antigen wirkungsvoller gegenüber den T-Helferzellen als die HLA-DRB3\*01:01-negativen Patientinnen. Die humorale Immunantwort wurde so durch das Vorhandensein von HLA-DRB3\*01:01 bei den Trägerinnen verstärkt.<sup>72</sup>

Es besteht eine enge Verbindung zwischen der Alloimmunisierung von Müttern mit HPA-1b1b und dem Vorhandensein des HLA-DRB3\*01:01-Allel.<sup>73</sup>

Eine Genotypisierung von HLA-DRB3\*01:01 erscheint daher vor allem zur Risikobewertung für das Auftreten einer fetalen oder neonatalen Alloimmunthrombozytopathie bei HPA-1b1b-Trägerinnen sinnvoll zu sein. In der aktuellen Literatur wird daher befürwortet, ein Screening aller Mütter in ihrer ersten Schwangerschaft auf HPA-1b1b durchzuführen. Allerdings besteht hier bislang hinsichtlich der Kosten und der Effektivität nur eine geringe Evidenz. Für ein Screening von Schwangeren auf seltene Thrombozytenantigene ist bislang keine Evidenz vorhanden.

## 4.5 Fazit und Ausblick

Im klinischen Alltag erscheint es zunächst wichtig, im Rahmen einer neonatalen Alloimmunthrombozytopenie die beteiligten Antikörper schnellstmöglich zu identifizieren (*MAIPA-Assay* mit *cross-match*) und entsprechend kompatible Thrombozytenkonzentrate zur Transfusion bereit zu stellen. Ist eine Immunisierung der Mutter wie im beschriebenen Fall mit vorangegangener intrakranieller Blutung bekannt,

sollte eine regelmäßige Gabe von intravenösem Immunglobulin (IVIG) ab der 12.–16. Schwangerschaftswoche erfolgen.

Aufgrund der aktuellen Forschungsergebnisse ist die intrauterine Thrombozyten-Transfusion zur Aufrechterhaltung einer ausreichenden Thrombozytenzahl nicht mehr indiziert. Diese sollte aufgrund der deutlich invasiveren Behandlung und des damit verbundenen Komplikationsrisikos nur in Sonderfällen erfolgen.<sup>13</sup>

Bei immunisierten Frauen erscheint nicht nur die Typisierung der Antikörper sinnvoll, sondern insbesondere nach dem Auftreten einer intrakraniellen Blutung im Rahmen der FNAIT auch eine Subtypisierung auf anti- $\alpha\text{v}\beta 3$  als möglicher Risikofaktor für schwere Komplikationen. Einerseits, um beratend bei weiteren Schwangerschaften das Risiko von schweren intrakraniellen Blutungen einzuschätzen, andererseits, um frühzeitige Therapien einzuleiten. Eine Subtypisierung des HPA-1a Antikörpers auf anti- $\alpha\text{v}\beta 3$  fand in unserem Fall zum Zeitpunkt der Untersuchungen nicht statt. Die Rolle des anti-HPA-1a Antikörpers in Interaktion mit dem Endothel als Auslöser der intrakraniellen Blutung ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

In welchem Ausmaß und unter welchen Kofaktoren Antikörper gegen seltene Thrombozytenantigene das Risiko einer schweren Komplikation bei einer fetalen / neonatalen Alloimmunthrombozytopenie erhöhen, ist ebenfalls Gegenstand der aktuellen Forschung. Aufgrund der aktuellen Studienlage besteht jedoch bei alleinigem Nachweis eines Antikörpers gegen ein seltenes Thrombozytenantigen auf GP Ia kein erhöhtes Risiko für eine klinisch relevante Thrombozytopenie und entsprechend keine Indikation zur prophylaktischen Gabe von IVIG während der Schwangerschaft.

## 5 Zusammenfassung / Abstract

### 5.1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch Analyse des Serums einer Schwangeren mit fetaler und neonataler Alloimmunthrombozytopenie ein neues Blutgruppen-Alloantigen auf dem Glykoprotein GP Ia ( $\alpha_2$ -Integrin) beschrieben werden. Durch ein *cross-match* zwischen mütterlichem Serum und paternalen Thrombozyten in einem glykoprotein-spezifischen Testverfahren wurde das Antigen auf GP Ia lokalisiert. Die Resequenzierung des *ITGA2*-Gens zeigte eine Mutation an Position 3347. Durch gezielte Mutagenese in einem Expressionsvektor und Expression des mutierten Proteins auf CHO-Zellen konnte der resultierende Aminosäure-Austausch an Position 1087 als ursächlich für das Neoantigen bestätigt werden. In der HPA-Nomenklatur wird die Variante HPA-25b bezeichnet, entsprechend dem Namen der Index-Familie wird Swi<sup>a</sup> mitgeführt. Zusätzlich wurde ein PCR-RFLP zur vereinfachten Diagnostik des Dimorphismus entwickelt.

Für den letalen Verlauf der fetalen / neonatalen Alloimmunthrombozytopenie in dem genannten Fall war jedoch ein ebenfalls vorhandener anti-HPA-1a Antikörper der Mutter verantwortlich, da der Fetus kein Merkmalsträger von HPA-25b war.

Die Antikörper-Konstellation und das klinische Erscheinen entsprechen damit den aktuellen Erkenntnissen, nach denen schwere intrakranielle Blutungen vor allem durch anti-HPA-1a Antikörper ausgelöst werden.

Die Rolle der seltenen Thrombozytenantigene (LFHPA) im Rahmen einer klinisch nachweisbaren fetalen oder neonatalen Alloimmunthrombozytopenie ist Gegenstand der aktuellen wissenschaftlichen Diskussion. Aufgrund der niedrigen Prävalenz der fetalen / neonatalen Alloimmunthrombozytopenie existieren wenige prospektive Studien, die meisten Studien basieren auf retrospektiven Fallanalysen. Um das Risiko für das Auftreten einer FNAIT und die Therapie beim Nachweis von seltenen Thrombozyten Antikörpern beurteilen zu können, sind weitere große prospektive Studien notwendig.

Die aktuelle Studienlage weist auf ein niedriges Risiko durch mütterliche Antikörper gegen GP Ia hin. Somit ist eine prophylaktische Therapie mit IVIG bei einem Nachweis von Thrombozyten-Antikörpern gegen GP Ia während einer Schwangerschaft vermutlich nicht indiziert.

## 5.2 Abstract

Within the context of this work, a new blood group alloantigen on the glycoprotein GP Ia ( $\alpha_2$ -Integrin) was described by analyzing the serum of a pregnant woman with fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. By cross-matching maternal serum and paternal platelets in a glycoprotein-specific assay, the antigen was localized on GP Ia. Resequencing of the *ITGA2*-gene revealed a mutation at position 3347. By targeted mutagenesis in an expression vector and expression of the mutant protein on CHO-cells, the resulting amino-acid exchange at position 1087 could be confirmed as causative for the neoantigen. In the HPA nomenclature, the variant is designated HPA-25b, and Swi<sup>a</sup> is listed in accordance with the name of the index family. In addition, a PCR-RFLP was developed to simplify the diagnosis of the dimorphism.

The lethal course of the fetal / neonatal alloimmune thrombocytopenia in the case mentioned was, however, due to the presence of an anti-HPA-1a antibody in the mother, as the fetus was not a carrier of HPA-25b.

The antibody constellation and the clinical appearance thus correspond to recent evidence according to which severe intracranial hemorrhages are mainly triggered by anti-HPA-1a antibodies.

The role of low-frequency platelet antigens (LFHPA) in clinically detectable fetal or neonatal alloimmune thrombocytopenia is the subject of current scientific debate. Due to the low prevalence of fetal / neonatal alloimmune thrombocytopenia, few prospective studies exist; most studies are based on retrospective case analyses. To be able to assess the risk for the occurrence of FNAIT and the therapy when rare platelet antibodies are detected, further large prospective studies are necessary.

Current studies indicate a low risk from maternal antibodies against GP Ia. Accordingly, prophylactic therapy with IVIG is probably not indicated if platelet antibodies against GP Ia are detected during pregnancy.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

In alphabetischer Reihenfolge:

- ADP Adenosindiphosphat
- BSA Bovines Serumalbumin
- CHO *Chinese hamster ovary*
- DIC Disseminierte intravasale Koagulopathie
- DNA Desoxyribonukleinsäure
- EDTA Ethylendiamintetraessigsäure
- FNAIT Fetale / neonatale Alloimmunthrombozytopathie
- GAH-IgG *Goat anti-human* Immunglobulin G
- GP Glykoprotein
- Glu Glutaminsäure
- HIV Humanes Immundefizienz Virus
- HLA Humanes Leukozyten Antigen
- HPA *Human Platelet Antigen* / humanes Thrombozyten Antigen
- ICH Intrakranielle Hämorrhagie
- IgG Immunglobulin G
- ITGA Integrin  $\alpha$
- ITP Idiopathische thrombozytopenische Purpura
- IVIG Intravenöses Immunglobulin
- LFHPA *Low Frequency Platelet Antigen*
- MAIPA Monoklonale antikörper-spezifische Immobilisation von Thrombozyten Antigenen (*Platelet Antigen*)
- Met Methionin
- MoAb Monoklonaler Antikörper (*monoclonal Antibody*)
- NaCl Natriumchlorid
- NaN<sub>3</sub> Natriumazid
- Opd 1,2- phenylendiamine
- PAF *Platelet activation factor*
- PBS-Puffer *Phosphate-buffered Saline*
- PCR Polymerase Ketten-Reaktion
- PDGF *Platelet-derived growth factor*
- PRP Plättchen angereichertes Plasma
- PTP Posttransfusionelle Purpura
- RFLP Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus

- RNA / mRNA Ribonukleinsäure / *messenger* Ribonukleinsäure
- TBS-Puffer *Tris-buffered Saline*
- Thr Threonin

## 7 Abbildungen

Abbildung 1 Übersicht Regionen der PCR und nested PCR .....	21
Abbildung 2 Ergebnisse <i>MAIPA</i> -Assay.....	27
Abbildung 3 Immunpräzipitation väterliche Thrombozyten .....	28
Abbildung 4 Schema der 8 sequenzierten Regionen des <i>ITGA2B</i> Gens .....	29
Abbildung 5 Nukleotid Sequenzierung der <i>INDEX</i> Familie Swi .....	30
Abbildung 6 Stammbaum der Familie.....	31
Abbildung 7 Analyse der transfektierten CHO-Zellen .....	33
Abbildung 8 Adhäsion CHO-Zellen in der Fluoreszenzmessung.....	35

## 8 Tabellen

Tabelle 1 Human Platelet Antigene (HPA) Database .....	7
Tabelle 2 Verwendete Primer mit Sequenz .....	21
Tabelle 3 PCR-Bedingungen .....	22

## 9 Literatur

1. Dohrn R. Ein Fall von Morbus maculosus Werlhofii übertragen von der Mutter auf die Frucht. *Arch Gynecol.* 1874;6:486-487. doi:10.1007/BF02001246
2. Harrington WJ, Sprague CC, Minnich V, Moore CV, Aulvin RC, Dubach R. Immunologic mechanisms in idiopathic and neonatal thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med.* Mar 1953;38(3):433-69. doi:10.7326/0003-4819-38-3-433
3. Van Loghem Jj J, Dorfmeijer H, Van Hart M, Schreuder F. Serological and genetical studies on a platelet antigen (Zw). *Vox Sang.* Apr 1959;4(2):161-9.
4. Shulman NR, Aster RH, Leitner A, Hiller MC. Immunoreactions Involving Platelets. V. Post-Transfusion Purpura Due to a Complement-Fixing Antibody against a Genetically Controlled Platelet Antigen. A Proposed Mechanism for Thrombocytopenia and Its Relevance in "Autoimmunity". *J Clin Invest.* Sep 1961;40(9):1597-620. doi:10.1172/JCI104383
5. Kamphuis MM, Paridaans NP, Porcelijn L, Lopriore E, Oepkes D. Incidence and consequences of neonatal alloimmune thrombocytopenia: a systematic review. *Pediatrics.* Apr 2014;133(4):715-21. doi:10.1542/peds.2013-3320
6. Schneider H, Malek A, Sager R. Transfer von Immunglobulinen durch die menschliche Plazenta. *PerinatalMedizin.* 1997;9(1):37-39.
7. Mueller-Eckhardt C, Kiefel V, Grubert A, et al. 348 cases of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Lancet.* Feb 1989;1(8634):363-6.
8. Tiller H, Kamphuis MM, Flodmark O, et al. Fetal intracranial haemorrhages caused by fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: an observational cohort study of 43 cases from an international multicentre registry. *BMJ Open.* Mar 22 2013;3(3)doi:10.1136/bmjopen-2012-002490
9. Jin JC, Lakkaraja MM, Ferd P, et al. Maternal sensitization occurs before delivery in severe cases of fetal alloimmune thrombocytopenia. *Am J Hematol.* Aug 2019;94(8):E213-E215. doi:10.1002/ajh.25503
10. Gruel Y, Boizard B, Daffos F, Forestier F, Caen J, Wautier JL. Determination of platelet antigens and glycoproteins in the human fetus. *Blood.* Aug 1986;68(2):488-92.
11. Kumpel BM, Sibley K, Jackson DJ, White G, Soothill PW. Ultrastructural localization of glycoprotein IIIa (GPIIIa, beta 3 integrin) on placental syncytiotrophoblast microvilli: implications for platelet alloimmunization during pregnancy. *Transfusion.* Oct 2008;48(10):2077-86. doi:10.1111/j.1537-2995.2008.01832.x

12. Baker JM, Shehata N, Bussel J, et al. Postnatal intervention for the treatment of FNAIT: a systematic review. *J Perinatol*. Oct 2019;39(10):1329-1339. doi:10.1038/s41372-019-0360-7
13. Lieberman L, Greinacher A, Murphy MF, et al. Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: recommendations for evidence-based practice, an international approach. *Br J Haematol*. May 2019;185(3):549-562. doi:10.1111/bjh.15813
14. de Vos TW, Winkelhorst D, de Haas M, Lopriore E, Oepkes D. Epidemiology and management of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfus Apher Sci*. Feb 2020;59(1):102704. doi:10.1016/j.transci.2019.102704
15. Wienzek-Lischka S, Krautwurst A, Fröhner V, et al. Noninvasive fetal genotyping of human platelet antigen-1a using targeted massively parallel sequencing. *Transfusion*. 2015;55(6pt2):1538-1544. doi:<https://doi.org/10.1111/trf.13102>
16. Alm J, Duong Y, Wienzek-Lischka S, et al. Anti-human platelet antigen-5b antibodies and fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia; incidental association or cause and effect? *British Journal of Haematology*. 2022;198(1):14-23. doi:<https://doi.org/10.1111/bjh.18173>
17. Kaushansky K. Thrombopoietin. *N Engl J Med*. Sep 10 1998;339(11):746-54. doi:10.1056/NEJM199809103391107
18. Weiss HJ. Platelet physiology and abnormalities of platelet function (first of two parts). *N Engl J Med*. Sep 11 1975;293(11):531-41. doi:10.1056/NEJM197509112931105
19. Santoso S. Platelet polymorphisms in thrombotic disorders. *Transfus Clin Biol*. Jun 2001;8(3):261-6.
20. Citla Sridhar D, Sidonio RF, Jr., Cheng D, Ahuja S. Surgery-Associated Bleeding Risk in Patients with Platelet Function Disorders - a Cross Sectional Study with the American Thrombosis and Hemostasis Network Dataset (ATHNdataset). *Blood*. 2021;138(Supplement 1):180-180. doi:10.1182/blood-2021-148753
21. López JA, Andrews RK, Afshar-Kharghan V, Berndt MC. Bernard-Soulier syndrome. *Blood*. 1998/06// 1998;91(12):4397-4418.
22. George JN, Caen JP, Nurden AT. Glanzmann's thrombasthenia: the spectrum of clinical disease. *Blood*. 1990;75(7):1383-1395.
23. Luu S, Gardiner EE, Andrews RK. Bone Marrow Defects and Platelet Function: A Focus on MDS and CLL. *Cancers*. 2018;10(5):147.
24. Sucker C, Hetzel GR, Grabensee B, Stocksclaeder M, Scharf RE. Amyloidosis and Bleeding: Pathophysiology, Diagnosis, and Therapy. *American Journal of*

- Kidney Diseases*. 2006/06/01/ 2006;47(6):947-955.  
doi:<https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2006.03.036>
25. Smock K, Perkins S. Thrombocytopenia: an update. *International journal of laboratory hematology*. 2014;36(3):269-278.
  26. Levi M. Pathogenesis and diagnosis of disseminated intravascular coagulation. *International journal of laboratory hematology*. 2018;40:15-20.
  27. Cooper N, Ghanima W. Immune thrombocytopenia. *New England Journal of Medicine*. 2019;381(10):945-955.
  28. Kunicki TJ, Newman PJ. The molecular immunology of human platelet proteins. *Blood*. Sep 15 1992;80(6):1386-404.
  29. Curtis BR, McFarland JG. Human platelet antigens – 2013. *Vox Sanguinis*. 2014;106(2):93-102. doi:<https://doi.org/10.1111/vox.12085>
  30. Claas FH, Smeenk RJ, Schmidt R, van Steenbrugge GJ, Eernisse JG. Alloimmunization against the MHC antigens after platelet transfusions is due to contaminating leukocytes in the platelet suspension. *Exp Hematol*. Jan 1981;9(1):84-9.
  31. Van Der Weerd CM, Veenhoven-Vonriesz LE, Nijenhuis LE, Van Loghem J. The Zw Blood Group System in Platelets. *Vox Sang*. Sep-Oct 1963;8:513-30.
  32. Versiti. HPA Database. Accessed October, 2020. <https://www.versiti.org/hpa>
  33. CHONG BH, HO S-J. Autoimmune thrombocytopenia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2005;3(8):1763-1772. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2005.01376.x>
  34. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2009;113(11):2386-2393.
  35. Hawkins J, Aster RH, Curtis BR. Post-transfusion purpura: current perspectives. *Journal of Blood Medicine*. 2019;10:405.
  36. Christie DJ, Pulkrabek S, Putnam JL, Slatkoff ML, Pischel KD. Posttransfusion purpura due to an alloantibody reactive with glycoprotein Ia/IIa (anti-HPA-5b). *Blood*. Jun 15 1991;77(12):2785-9.
  37. Sadani DT, Urbaniak SJ, Bruce M, Tighe JE. Repeat ABO-incompatible platelet transfusions leading to haemolytic transfusion reaction. *Transfusion Medicine*. 2006;16(5):375-379. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2006.00684.x>
  38. Greinacher A, Eichler P, Lubenow N, Kiefel V. Drug - induced and Drug - dependent Immune Thrombocytopenias. *Reviews in Clinical and Experimental Hematology*. 2001;5(3):166-200.

39. Davoren A, Curtis BR, Aster RH, McFarland JG. Human platelet antigen-specific alloantibodies implicated in 1162 cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*. Aug 2004;44(8):1220-5. doi:10.1111/j.1537-2995.2004.04026.x
40. Ertel K, Al-Tawil M, Santoso S, Kroll H. Relevance of the HPA-15 (Gov) polymorphism on CD109 in alloimmune thrombocytopenic syndromes. *Transfusion*. Mar 2005;45(3):366-73. doi:10.1111/j.1537-2995.2005.04281.x
41. Santoso S, Kalb R, Walka M, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C, Newman PJ. The human platelet alloantigens Br(a) and Brb are associated with a single amino acid polymorphism on glycoprotein Ia (integrin subunit alpha 2). *J Clin Invest*. Nov 1993;92(5):2427-32. doi:10.1172/JCI116849
42. Kiefel V. The MAIPA assay and its applications in immunohaematology. *Transfus Med*. Sep 1992;2(3):181-8.
43. Santoso S, Kalb R, Kroll H, et al. A point mutation leads to an unpaired cysteine residue and a molecular weight polymorphism of a functional platelet beta 3 integrin subunit. The Sra alloantigen system of GPIIIa. *J Biol Chem*. Mar 1994;269(11):8439-44.
44. Santoso S, Kunicki TJ, Kroll H, Haberbosch W, Gardemann A. Association of the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism with nonfatal myocardial infarction in younger patients. *Blood*. Apr 1999;93(8):2449-53.
45. Carl B, Kroll H, Bux J, Bein G, Santoso S. B-lymphoblastoid cell lines as a source of reference DNA for human platelet and neutrophil antigen genotyping. *Transfusion*. Jan 2000;40(1):62-8.
46. Santoso S, Amrhein J, Hofmann HA, et al. A point mutation Thr(799)Met on the alpha(2) integrin leads to the formation of new human platelet alloantigen Sit(a) and affects collagen-induced aggregation. *Blood*. Dec 1999;94(12):4103-11.
47. Kaplan C. Immune thrombocytopenia in the foetus and the newborn: diagnosis and therapy. *Transfus Clin Biol*. Jun 2001;8(3):311-4.
48. Bertrand G, Kaplan C. How do we treat fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia? *Transfusion*. Jul 2014;54(7):1698-703. doi:10.1111/trf.12671
49. Kjaer M, Bertrand G, Bakchoul T, et al. Maternal HPA-1a antibody level and its role in predicting the severity of Fetal/Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia: a systematic review. *Vox Sang*. Jan 2019;114(1):79-94. doi:10.1111/vox.12725
50. Killie MK, Husebekk A, Kjeldsen-Kragh J, Skogen B. A prospective study of maternal anti-HPA 1a antibody level as a potential predictor of alloimmune thrombocytopenia in the newborn. *Haematologica*. Jun 2008;93(6):870-7. doi:10.3324/haematol.12515

51. Kroll H, Yates J, Santoso S. Immunization against a low-frequency human platelet alloantigen in fetal alloimmune thrombocytopenia is not a single event: characterization by the combined use of reference DNA and novel allele-specific cell lines expressing recombinant antigens. *Transfusion*. Mar 2005;45(3):353-8. doi:10.1111/j.1537-2995.2005.04218.x
52. Ghevaert C, Campbell K, Walton J, et al. Management and outcome of 200 cases of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*. May 2007;47(5):901-10. doi:10.1111/j.1537-2995.2007.01208.x
53. Kjaer M, Kjeldsen-Kragh J, Fiskum C, Leinan I, Skogen B, Husebekk A. Screening for fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia - lessons learned from a Norwegian screening program. *Acta Obstet Gynecol Scand*. Jun 2018;97(6):766-767. doi:10.1111/aogs.13320
54. Kiefel V, Santoso S, Katzmann B, Mueller-Eckhardt C. The Bra/Brb alloantigen system on human platelets. *Blood*. Jun 1989;73(8):2219-23.
55. Kaplan C, Morel-Kopp MC, Kroll H, et al. HPA-5b (Br(a)) neonatal alloimmune thrombocytopenia: clinical and immunological analysis of 39 cases. *Br J Haematol*. Jul 1991;78(3):425-9.
56. Kiefel V, Santoso S, Katzmann B, Mueller-Eckhardt C. A new platelet-specific alloantigen Bra. Report of 4 cases with neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Vox Sang*. 1988;54(2):101-6. doi:10.1111/j.1423-0410.1988.tb01625.x
57. Santoso S, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. Immunochemical characterization of the new platelet alloantigen system Bra/Brb. *Br J Haematol*. Jun 1989;72(2):191-8.
58. Rousseau J, Goldman M, David M. HPA-5b (Bra) neonatal alloimmune thrombocytopenia in Quebec: incidence and clinical outcome in 31 cases. *Transfusion*. Jun 2004;44(6):844-8. doi:10.1111/j.1537-2995.2004.03304.x
59. Bertrand G, Jallu V, Saillant D, Kervran D, Martageix C, Kaplan C. The new platelet alloantigen Cab a: a single point mutation Gln 716 His on the alpha 2 integrin. *Transfusion*. Oct 2009;49(10):2076-83. doi:10.1111/j.1537-2995.2009.02240.x
60. Panzer S, Auerbach L, Cechova E, et al. Maternal alloimmunization against fetal platelet antigens: a prospective study. *Br J Haematol*. Jul 1995;90(3):655-60. doi:10.1111/j.1365-2141.1995.tb05597.x
61. Ribera A, Parra R, Gallardo D, Perez P, Rodriguez J, Pujol M. Frequency of platelet antibodies against HPA-5b in Spanish pregnant women. *Vox Sang*. 1994;67(supplement 2):12.
62. Ohto H, Yamaguchi T, Takeuchi C, Tohyama Y, Sato A, Morita S. Anti-HPA-5b-induced neonatal alloimmune thrombocytopenia: antibody titre as a predictor.

- Collaborative Study Group. *Br J Haematol*. Jul 2000;110(1):223-7.  
doi:10.1046/j.1365-2141.2000.02146.x
63. Ohto H, Miura S, Ariga H, et al. The natural history of maternal immunization against foetal platelet alloantigens. *Transfus Med*. Dec 2004;14(6):399-408.  
doi:10.1111/j.1365-3148.2004.00535.x
  64. de Vos TW, Porcelijn L, Hofstede-van Egmond S, et al. Clinical characteristics of human platelet antigen (HPA)-1a and HPA-5b alloimmunised pregnancies and the association between platelet HPA-5b antibodies and symptomatic fetal neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Br J Haematol*. Nov 2021;195(4):595-603. doi:10.1111/bjh.17731
  65. Kunicki TJ, Kritzik M, Annis DS, Nugent DJ. Hereditary variation in platelet integrin alpha 2 beta 1 density is associated with two silent polymorphisms in the alpha 2 gene coding sequence. *Blood*. Mar 1997;89(6):1939-43.
  66. Holtkotter O, Nieswandt B, Smyth N, et al. Integrin alpha 2-deficient mice develop normally, are fertile, but display partially defective platelet interaction with collagen. *J Biol Chem*. Mar 29 2002;277(13):10789-94.  
doi:10.1074/jbc.M112307200
  67. Breuer J, Schneider-Hohendorf T, Ostkamp P, et al. VLA-2 blockade in vivo by vatelizumab induces CD4+FoxP3+ regulatory T cells. *Int Immunol*. May 21 2019;31(6):407-412. doi:10.1093/intimm/dxz018
  68. Refsum E, Meinke S, Gryfelt G, Wikman A, Hoglund P. Adding to the complexity of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: Reduced fibrinogen binding in the presence of anti-HPA-1a antibody and hypo-responsive neonatal platelets. *Thromb Res*. Feb 2018;162:69-76. doi:10.1016/j.thromres.2017.12.017
  69. Santoso S, Wihadmadyatami H, Bakchoul T, et al. Antiendothelial  $\alpha\beta 3$  Antibodies Are a Major Cause of Intracranial Bleeding in Fetal/Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Aug 2016;36(8):1517-24. doi:10.1161/ATVBAHA.116.307281
  70. Kamphuis MM, Paridaans N, Porcelijn L, et al. Screening in pregnancy for fetal or neonatal alloimmune thrombocytopenia: systematic review. *BJOG*. Oct 2010;117(11):1335-43. doi:10.1111/j.1471-0528.2010.02657.x
  71. Wienzek-Lischka S, Konig IR, Papenkort EM, et al. HLA-DRB3\*01:01 is a predictor of immunization against human platelet antigen-1a but not of the severity of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*. Mar 2017;57(3):533-540. doi:10.1111/trf.13950
  72. Anani Sarab G, Moss M, Barker RN, Urbaniak SJ. Naturally processed peptides spanning the HPA-1a polymorphism are efficiently generated and displayed from

platelet glycoprotein by HLA-DRB3\*0101-positive antigen-presenting cells. *Blood*. Aug 27 2009;114(9):1954-7. doi:10.1182/blood-2009-04-211839

73. Kjeldsen-Kragh J, Killie MK, Tomter G, et al. A screening and intervention program aimed to reduce mortality and serious morbidity associated with severe neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood*. Aug 1 2007;110(3):833-9. doi:10.1182/blood-2006-08-040121

## 10 Publikationsverzeichnis

- Kroll, H., Feldmann, K., Zwingel, C., Hoch, J., Bald, R., Bein, G. & Santoso, S. (2011). A new platelet alloantigen, Swia, located on glycoprotein Ia identified in a family with fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*, 51(8), 1745-1754.

## 11 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, 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

## 12 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Gregor Bein für seine wissenschaftliche Unterstützung und Motivation zum Abschluss meiner Dissertation danken.

Mein großer Dank gilt Herrn Dr. med. Hartmut Kroll, für die Vergabe des Themas und das Vertrauen bis zum Abschluss. Zusammen mit Herrn Dr. rer. nat. Sentot Santoso machte Herr Dr. med. Hartmut Kroll diese Arbeit möglich, begleitete und unterstützte mich in der methodischen Bearbeitung stets durch zielführende Diskussionen und anhaltende Hilfestellung.

Herrn Prof. Dr. med. Oliver Dörr danke ich für die zahlreichen und unermüdlichen fachlichen Gespräche und Ratschläge, die mir auf dem Weg zur fertigen Arbeit sehr geholfen haben.

Allen Mitarbeiter:innen des Thrombozytenlabors, insbesondere Frau Claudia Zwingel, Frau Astrid Giptner-Rieger, Frau Petra Ziegler und Frau Silke Schmidt, sowie allen Beteiligten meiner Studien bin ich sehr dankbar für die gute und zahlreiche Unterstützung sowie die konstruktive und angenehme Zusammenarbeit.

Mein herzlicher Dank geht an meinen Mann und meine zwei Töchter für ihre Geduld, ihre Motivation und ihr Vertrauen.