

---

**Komplement-Bindende Autoantikörper  
in immune thrombocytopenic purpura**



**INAUGURALDISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von **Abderrahim Najaoui**

aus **Frankfurt am Main**

**Gießen, 2011**

---

Aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der

Justus-Liebig-Universität Gießen

Direktor: Prof. Dr. med. Gregor Bein

Gutachter: PD Dr. med. Ulrich J. H. Sachs

Gutachter: Prof. Dr. med. Alfred Reiter

Tag der Disputation: 01.09.2011

---

**MEINEN ELTERN**

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	IV
Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme .....	VIII
Abbildungsverzeichnis .....	X
Tabellenverzeichnis .....	XIII
1 Einleitung .....	1
1.1 Thrombozyten allgemein.....	1
1.2 Thrombozytenadhäsion .....	1
1.3 Thrombozytenaggregation.....	3
1.4 Thrombozytäre Membranglykoproteine.....	4
1.4.1 Integrine.....	4
1.4.2 Glykoproteinkomplex IIb/IIIa (GPIIb/IIIa, $\alpha 2\beta 3$ -Integrin).....	5
1.4.3 Integrin $\alpha 2\beta 1$ .....	7
1.4.4 Leucinreiche Glykoproteine .....	8
1.4.5 Glykoproteinkomplex Ib/V/IX (GPIbIX + GP V) .....	8
1.4.6 Aufgaben des GP Ib/V/IX-Komplexes.....	9
1.4.7 Bernard-Soulier-Syndrom .....	11
1.4.8 Glanzmann Thrombasthenie.....	11
1.5 Autoimmunerkrankungen allgemein .....	12
1.5.1 Induktion von Autoimmunreaktionen .....	13
1.5.2 Bedeutung natürlich vorkommender Autoantikörper.....	14
1.5.3 Klinische Bedeutung des Nachweises von Autoantikörpern .....	14
1.6 Immunthrombozytopenie .....	15
1.6.1 Ätiologie und Epidemiologie .....	15
1.6.2 Biomarker der Thrombopoese.....	18
1.6.3 Biomarker der Immunreaktion .....	21

1.6.4	Klinik und Diagnose.....	26
1.6.5	Therapie und Verlauf.....	28
1.6.6	Therapie.....	28
1.6.7	Neue Therapieansätze.....	34
1.6.8	Verlauf und Prognose.....	35
1.7	Wichtige Methoden zum Nachweis von thrombozytären Autoantikörpern.....	36
1.7.1	Indikationen des Autoantikörper-Screenings .....	36
1.7.2	Funktionelle Tests .....	36
1.7.3	Immunoblot-Assays.....	37
1.7.4	MAIPA .....	38
1.7.5	Durchflusszytometrie .....	38
1.7.6	Komplementbindungsreaktion .....	38
1.8	Das Komplementsystem.....	39
1.8.1	Thrombozyten und Komplement.....	42
1.8.2	Komplement: Initiation und Aktivierung.....	42
1.8.3	C1-Inhibitor, C4-Binding-Protein und Faktor I vermittelte Inaktivierung des C4b.....	48
2	Material und Methoden .....	49
2.1	Material .....	49
2.1.1	Geräte .....	49
2.1.2	Chemikalien.....	50
2.1.3	Antikörper .....	51
2.1.4	Marker .....	51
2.1.5	Enzyme und Proteine.....	51
2.1.6	Gebrauchsfertige Reagenzien, Lösungen und Puffer .....	52
2.1.7	Auswahl der Patienten und Seren.....	52
2.2	Methoden.....	53
2.2.1	Immunologische und biochemische Methoden.....	53
2.2.2	Durchflußzytometrie .....	64
2.2.3	Antigen-Beschichtung der Partikel .....	64
3	Fragestellung .....	67

---

4	Ergebnisse .....	70
4.1	Untersuchungen zum Nachweis von Autoantikörper gegen GPV .....	70
4.2	Untersuchungen zum Nachweis von Autoantikörper gegen GP IIb/IIIa .....	73
4.2.1	Etablierung des Systems zur Beurteilung der Ergebnisse in der Mikrokomplementbindungsreaktion .....	73
4.2.2	Analyse der ITP-Seren mit Thrombozyten von gesunden Spendern und von Patienten mit Morbus Glanzmann im Komplementbindungs-Test und in Aggregometrie.....	76
4.2.3	Analyse der gereinigten IgG-Fraktionen aus ITP-Seren mit normalen Thrombozyten und mit Thrombozyten von Patienten mit Morbus- Glanzmann im Komplementbindungs-Test.....	82
4.2.4	Analyse von ITP-Seren nach Ausfällen von Immunkomplexen.....	83
4.2.5	Analyse der ITP-Seren mit Thrombozyten von gesunden Spendern, mit Thrombozyten von Glanzmann-Patienten und von BSS-Patienten in der MKBR und in der Aggregometrie.....	85
4.2.1	Durchflusszytometrische Charakterisierung der BSS-Thrombozyten .....	86
4.3	Analyse der C1q-Bindung an GPIIb/IIIa mit Hilfe der Durchflusszytometrie .....	92
4.3.1	Qualitätskontrolle des Systems mit einem neu entwickelten Testverfahren für die FACS-Analyse .....	94
4.3.2	Systemaufbau für die FACS-Analyse .....	95
4.3.3	Komplementbindungs-Test mit Seren von verschiedenen Patientenkollektiven .....	95
4.3.4	Mikropartikel.....	98
4.3.5	Abgrenzung der Thrombozyten gegen andere Zellen .....	98
5	Diskussion .....	100
6	Zusammenfassung .....	118
7	Summary .....	120
	Literaturverzeichnis .....	122

Veröffentlichungen zum Thema.....	139
Anhang	141
Ehrenwörtliche Erklärung.....	142
Danksagung .....	143

## Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

<i>Abb.</i>	<i>Abbildung</i>
<i>ACD</i>	<i>Acid citrate dextrose</i>
<i>ADP</i>	<i>Adenosindiphosphat</i>
<i>AG-AK</i>	<i>Antigen-Antikörper Komplex</i>
<i>AITP</i>	<i>Autoimmunthrombozytopenie</i>
<i>APC</i>	<i>Antigenpräsentierende Zelle</i>
<i>Arg</i>	<i>Arginin</i>
<i>AS</i>	<i>Aminosäure</i>
<i>Bp</i>	<i>Basenpaare</i>
<i>BSA</i>	<i>Bovine serum albumin</i>
<i>CD</i>	<i>Cluster of differentiation</i>
<i>C1</i>	<i>Komplementkomponente C1</i>
<i>CFT</i>	<i>Complement-Fixation Test</i>
<i>Cys</i>	<i>Cystein</i>
<i>d</i>	<i>Tag</i>
<i>DC</i>	<i>Dendritische Zelle</i>
<i>DNA</i>	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
<i>EDTA</i>	<i>Ethylendiamintetraacetat</i>
<i>ELISA</i>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<i>FACS</i>	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
<i>FcRn</i>	<i>neonataler Fc Rezeptor</i>
<i>FITC</i>	<i>Fluorescein-Isothiocyanate</i>
<i>FKS</i>	<i>fötales Kälberserum</i>
<i>FNAIT</i>	<i>Fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie</i>
<i>Gln</i>	<i>Glutamin</i>
<i>GP</i>	<i>Glykoprotein</i>
<i>GPI</i>	<i>Glycophosphatidylinositol</i>
<i>h</i>	<i>Stunden</i>
<i>H</i>	<i>Heavy chain</i>
<i>HB</i>	<i>Hautblutung</i>
<i>HBK</i>	<i>Hammelblutkörperchen</i>
<i>HIV</i>	<i>Human immune deficiency virus</i>
<i>HNK</i>	<i>Hämolytische Neugeborenenenerkrankung</i>
<i>HLA</i>	<i>Human leucocyte antigen</i>
<i>HPA</i>	<i>Human platelet antigen</i>
<i>HSNP</i>	<i>Human single nucleotide polymorphism</i>
<i>ICH</i>	<i>Intracranial haemorrhage</i>
<i>Ig</i>	<i>Immunglobulin</i>
<i>Ile</i>	<i>Isoleucin</i>
<i>IUTT</i>	<i>Intrauterine Thrombozytentransfusion</i>
<i>IV</i>	<i>Intravenös</i>
<i>Ko</i>	<i>Kontrolle</i>
<i>L</i>	<i>Light chain</i>
<i>Leu</i>	<i>Leucin</i>
<i>MACE</i>	<i>Monoclonal antibody specific capture assay</i>
<i>MAIPA</i>	<i>Monoclonal antibody immobilisation of platelet antigens</i>
<i>mAK</i>	<i>monoklonaler Antikörper</i>
<i>MFI</i>	<i>Mean fluorescence intensity</i>
<i>MHC</i>	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
<i>min</i>	<i>Minuten</i>
<i>MKBR</i>	<i>Mikrokomplementbindungsreaktion</i>
<i>Mr</i>	<i>Molekulargewicht</i>
<i>mRNA</i>	<i>messenger RNA</i>
<i>MW</i>	<i>Mittelwert</i>
<i>Neu</i>	<i>Neuraminidase</i>
<i>NHS-LC</i>	<i>N-Hydroxy-Succinimido LC</i>

<i>NHS</i>	<i>Humanes Normalserum</i>
<i>NK</i>	<i>Negative Kontrolle</i>
<i>PAIFT</i>	<i>Plättchen-Adhäsions-Immunfluoreszenztest</i>
<i>PaIgG</i>	<i>Plättchen-assoziiertes IgG</i>
<i>PBS</i>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<i>PCR</i>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<i>PGE1</i>	<i>Prostaglandin E1</i>
<i>PI</i>	<i>Phosphoinositol</i>
<i>PK</i>	<i>Positive Kontrolle</i>
<i>PLAP</i>	<i>Plazentare alkalische Phosphatase</i>
<i>PO</i>	<i>Peroxidase</i>
<i>PP</i>	<i>Polypropylen</i>
<i>PPP</i>	<i>Platelet poor plasma</i>
<i>Pro</i>	<i>Prolin</i>
<i>PRP</i>	<i>Plättchenreiches Plasma</i>
<i>PSI</i>	<i>Plexine, Semaphorine, Integrine</i>
<i>PTP</i>	<i>Posttransfusionelle Purpura</i>
<i>PTR</i>	<i>Platelet Transfusion Refractoriness</i>
<i>R</i>	<i>Rückwärts</i>
<i>RES</i>	<i>Retikuloendoplasmatisches System</i>
<i>RFLP</i>	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
<i>rhu</i>	<i>rekombinant human</i>
<i>RNA</i>	<i>Ribonukleinsäure</i>
<i>RT</i>	<i>Raumtemperatur</i>
<i>RU</i>	<i>Resonance Units</i>
<i>s</i>	<i>Sekunden</i>
<i>s.</i>	<i>siehe</i>
<i>SDS-PAGE</i>	<i>Sodium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>
<i>Ser</i>	<i>Serin</i>
<i>SPR</i>	<i>Surface plasmon resonance</i>
<i>STABW</i>	<i>Standardabweichung</i>
<i>Upm</i>	<i>Umdrehungen pro Minute</i>
<i>V</i>	<i>Vorwärts</i>
<i>Val</i>	<i>Valin</i>
<i>VNTR</i>	<i>Variable number of tandem repeats</i>
<i>Vs.</i>	<i>Versus</i>
<i>WGA</i>	<i>Wheat-Germ-Agglutin</i>

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1-1 *Model for platelet adhesion to the subendothelial matrix at site of vascular injury. The initial contact (tethering) to the ECM is mediated predominantly by GPIIb $\alpha$ -vWF interactions. The GPIIb $\alpha$ -vWF interaction is essential at high shear rates (>500sec<sup>-1</sup>) but may not be required at lower-shear rates. In a second step, GPVI-collagen interactions initiate cellular activation followed by shifting of integrins to high-affinity state and the release of second-wave agonists, most importantly ADP, ATP, and TxA<sub>2</sub>. GPIIb-mediated signaling may amplify GPVI-induced activation pathways. In parallel, exposed tissue factor (TF) locally triggers the formation of thrombin, which in addition to GPVI, mediates cellular activation. Depending on the nature of the injury, 1 of the 2 activation pathway may prevail and sufficient to arrest and activate platelets. Finally, firm adhesion of platelet to collagen through activated  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 (directly) and  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (indirectly via vWF or other ligands) results in sustained GPVI signaling, enhanced release, and procoagulant activity. In this process,  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 and  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 have partially redundant roles. Released ADP, ATP, and TxA<sub>2</sub> amplify Integrin activation on adherent platelets and mediate thrombus growth by activating additional platelets. The scheme does not exclude the involvement of other receptor-ligand interactions (Ulrich J.H. Sachs and Bernhard Nieswandt, Circulation Research, 2007).....* 2
- Abb. 1-2 *Pathomechanismus der Autoimmunthrombozytopenie und daraus ableitbare Biomarker (nach Sachs UJ, Haemostaseologie 2008) (Sachs, 2008).....*17
- Abb. 1-3 *Der klassische Weg wird ausgelöst durch die Bindung des Faktors C1 an IgG oder IgM auf der Oberfläche von Mikroorganismen. C1q hat die Form eines Tulpenstraußes, dessen „Blüten“ an die Fc-Region von Antikörpern binden. Dies aktiviert C1r, eine Serinprotease, die die Kaskade des klassischen Weges einleitet. Zunächst wird C4 proteolytisch zu C4b aktiviert, das wiederum C2 in C2a und C2b spaltet. C4b und C2a bilden zusammen die C3-Konvertase, die schließlich die Spaltung von C3 in C3a und C3b katalysiert. (K.B.M. Reidt) .....*45
- Abb. 2-1 *Prinzip der MKBR: sind im Serum Antikörper enthalten, wird das Komplement durch den Antigen-Antikörper-Komplex verbraucht. Die Erythrozyten bleiben intakt. Somit fällt der Test positiv aus. Enthält das Serum dagegen kein Antikörper, steht das Komplement zur Verfügung, was zur Lyse der Erythrozyten führt .....*63
- Abb. 4-1 *Funktionelle Analyse im Mikrokomplementbindungstest (MKBR). Antigen-Antikörper-Komplexe aktivieren das Komplementsystem und führen zum Verbrauch von Komplementfaktoren. Der Verbrauch dieser Komplementfaktoren ist die Messgröße für die Menge an Antikörpern im Blutserum. Der Verbrauch von Komplementfaktoren wurde über antikörperbeladene Erythrozyten sichtbar gemacht (hämolytisches System). Der Hemmgrad der Erythrozytenlyse wurde mikroskopisch beurteilt: Grad 4: > 80 % Hämolyse, keine Komplementfixierung oder keine Antikörper (A); Grad 3: 50 – 75 % Hämolyse, schwache Autoantikörperreaktivität (B); Grad 2: 25 – 50 % Hämolyse, moderate*

	<i>Autoantikörperreaktivität (C); Grad 1: &lt; 10 % Hämolyse, starke Antikörperreaktivität (D); Grad 0: keine Hämolyse (Ringbildung), sehr starke Antikörperreaktivität (E) (Deutsche Norm: Serodiagnostik von Infektionskrankheiten, 1989).....</i>	<i>75</i>
Abb. 4-2	<i>Seren von 126 ITP-Patienten und 50 gesunde Kontrollen getestet in Komplementbindungs-Test..</i>	<i>76</i>
Abb. 4-3	<i>Die gleichen, vorher getesteten Kollektive, wurden im Komplementbindungs-Test mit Thrombozyten von Glanzmann-Patienten getestet.....</i>	<i>80</i>
Abb. 4-4	<i>Ergebnisse der ITP-Seren in Komplementbindungs-Test mit normalen Blutplättchen und Plättchen von Patienten mit Morbus-Glanzmann zusammengefasst .....</i>	<i>81</i>
Abb. 4-5	<i>Silberfärbung bestätigt die Reinheit der isolierten IgG-Fraktion aus ITP-Seren. IgG wurde mit Hilfe des Melon<sup>TM</sup> Gel IgG Spin Purification Kits (Pierce, Rockford, USA) isoliert und nach Auftrennung der Proteine unter reduzierten Bedingungen in der Silberfärbung analysiert. Es sind die Fc<math>\gamma</math> (75kDa), F(ab)'<sub>2</sub> (50kDa) und Fab (25kDa) Fragmente eindeutig zu erkennen .....</i>	<i>82</i>
Abb. 4-6	<i>20 ITP-Seren wurden mit PEG (Polyethylenglykol) behandelt, um Immunkomplexe auszufällen, und anschließend im Komplementbindungs-Test untersucht. Es konnte keine signifikante Diskrepanz zwischen den Seren vor und nach der PEG-Fällung festgestellt werden.....</i>	<i>84</i>
Abb. 4-7	<i>Analyse der ITP-Seren mit Thrombozyten von gesunden Blutspendern, Thrombozyten von Glanzmann-Patienten und von Patienten mit Bernard-Soulier-Syndrome in der MKBR.....</i>	<i>85</i>
Abb. 4-8	<i>In MAIPA-Test (GPIb/IX, GPIIb/IIIa) positiv getestete Seren (n=21) wurden mit verschiedenen Testzellen in der MKBR untersucht .....</i>	<i>87</i>
Abb. 4-9	<i>Ergebnisse der Komplementbindungs-Untersuchungen von 21 ITP Seren mit Thrombozyten von gesunden Spendern, Thrombozyten von Glanzmann-Patienten und von BSS-Patienten.....</i>	<i>87</i>
Abb. 4-10	<i>In MAIPA positive (GPIb/IX, GPIIb/IIIa) getestete Seren, die vorher keine Reaktion in der MKBR mit Thrombozyten von Patienten mit Morbus Glanzmann gezeigt haben, wurden im Komplementbindungs-Test mit drei verschiedenen Kollektiven untersucht.....</i>	<i>88</i>
Abb. 4-11	<i>Ergebnisse der Komplementbindungs-Untersuchungen von 28 ITP Seren mit Thrombozyten von gesunden Spendern, Thrombozyten von Glanzmann-Patienten und von BSS-Patienten.....</i>	<i>89</i>
Abb. 4-12	<i>In direkten MAIPA mit GPIb/IX positiv, mit GPIIb/IIIa dagegen negativ getestete Seren, wurden in Komplementbindungs-Test mit Blutplättchen von drei verschiedenen Kollektiven untersucht .....</i>	<i>89</i>
Abb. 4-13	<i>Ergebnisse der Komplementbindungs-Untersuchungen von 16 ITP Seren, die anti GPIb-IX Antikörper enthalten, mit Thrombozyten von gesunden Spendern, Thrombozyten von Glanzmann-Patienten und von BSS-Patienten.....</i>	<i>90</i>
Abb. 4-14	<i>Vergleicht man die 3 Kollektive, so ist die Frequenz der positiven Ergebnisse in der MKBR relativ klein und schwankt zwischen 0% bei Seren von NAIT-Patienten und 5% bei Seren von gesunden Spendern und von HIT-Patienten.....</i>	<i>91</i>

- Abb. 4-15 *Immunchemische Analyse bestätigt die Reinheit und Aktivität der isolierten  $\alpha$ II $\beta$ 3-Protein-Fractionen. Silberfärbung nach Auftrennung der Plättchenproteine in einer SDS-PAGE zeigt die  $\alpha$ IIb- und  $\beta$ 3-Untereinheit. MW: Molekulargewichtsmarker; (A) Durchlauf der Proteinfraktion; (B) isoliertes HPA-1a-Protein; (C) isoliertes HPA-1b-Protein.....93*
- Abb. 4-16 *Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde die Aktivität des GPIIb/IIIa Antigens durch Inkubation mit mAK gegen  $\alpha$ IIb (SZ22) und gegen  $\beta$ 3 (SZ21) analysiert.....93*
- Abb. 4-17 *Zur Sicherheitskontrolle des verwendeten Systems wurden streptavidinbeschichtete Partikel einerseits und rinderserumalbumin beschichtete Partikel (BSA-Partikel) andererseits eingesetzt und verglichen. Zwei spezifische monoklonale Antikörper, Gi5 gegen GPIIb/IIIa und Gi9 gegen GPIa/IIa, wurden auf ihre Bindung an die verwendeten Partikel getestet. Die Detektion erfolgte mit FITC markiertem anti-mouse-IgG Antikörper.....94*
- Abb. 4-18 *Systemaufbau für die durchflusszytometrische Analyse schematisch dargestellt: Aus Plättchenkonzentraten isoliertes  $\alpha$ II $\beta$ 3-Protein wurde über N-Hydroxy-Succinimido-LC-Biotin an Streptavidinbeschichtete Partikel gekoppelt und mit den zu untersuchenden Seren inkubiert. C1q-Komplement wurde zugegeben und das ganze mit fluoresceinkonjugierten Anti-C1q-Komplement-Antikörper für die Durchflusszytometrie markiert. (1) aus ITP-Serum stammende Antikörper; (2) C1q-Komplement-Komponente; (3) fluoresceinkonjugierter anti-C1q-Komplement-Antikörper.....95*
- Abb. 4-19 *Durchflusszytometrische Analyse detektiert Komplement-C1q-Bindung durch Autoantikörper von ITP-Patienten in Anwesenheit von C1q-Komplement, in seiner Abwesenheit hingegen nicht. Zur Kontrolle des verwendeten Systems wurden erneut zwei spezifische monoklonale Antikörper, Gi5 gegen GPIIb/IIIa und Gi9 gegen GPIa/IIa, auf ihre Bindung an das biotinylierte Antigen getestet. Mit GPIIb/IIIa beschichtete Partikel wurden mit inaktiviertem ITP-Serum in Abwesenheit oder Anwesenheit von Komplement (C1q-Komplement) inkubiert und die Komplementbindung über einen FITC-konjugierten anti-human-C1q-Antikörper detektiert. Die Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity: MFI) wurde auf den MFI der Negativkontrolle (AB-Serum eines normalen Spenders) normalisiert (mean MFI 23,020; range, 5,412-77,391; cut-off MFI 1,811).....97*
- Abb. 4-20 *Die Bildung von Blutplättchen-Mikropartikel (BMP) ist bei in der MKBR positiv getesteten Seren konzentrationsabhängig, bei negativ untersuchte Seren dagegen nicht. A: PRP + 25 $\mu$ l in der MKBR negativ getestetes Serum; B: PRP + 50 $\mu$ l in der MKBR negativ getestetes Serum; C: PRP + 25 $\mu$ l in der MKBR positiv getestetes Serum; D: PRP + 50 $\mu$ l in der MKBR positiv getestetes Serum.....99*

## Tabellenverzeichnis

<i>Tab. 1-1</i>	<i>Bisher bekannte Integrine und leucinreiche Glykoproteine auf der Thrombozytenoberfläche, angegeben mit Nomenklatur des Integrins sowie des Membranglykoproteinkomplexes. Aufgeführt sind weiter die spezifischen Liganden.....</i>	<i>5</i>
<i>Tab. 1-2</i>	<i>Proteinfamilien Aus dem Englischen: TS: Thrombospondin; EGF: Epidermal Growth Factor-like; LDL: Low Density Lipoprotein Receptor-like; SCR Short Consensus Repeat; vWF: von Willebrand Factor-like; RCA Regulators of Complement Activation; MBL: Mannan-Binding-Lectin (Friese, et al., 1999).....</i>	<i>41</i>
<i>Tab. 1-3</i>	<i>Aktivierende Komponenten des klassischen Weges (Cooper, 1985).....</i>	<i>43</i>
<i>Tab. 1-4</i>	<i>Aktivierende Komponenten des Terminalen Angriffskomplexes (Esser, 1991 sep).....</i>	<i>46</i>
<i>Tab. 1-5</i>	<i>Inhibitorisch wirksame Regulatoren des klassischen Weges (Atkinson, et al., 1991 oct).....</i>	<i>48</i>
<i>Tab. 2-1</i>	<i>Verwendete Geräte und ihre Bezugsquellen .....</i>	<i>49</i>
<i>Tab. 2-2</i>	<i>Polyklonale und monoklonale Antikörper, die in dieser Dissertation verwendet wurden .....</i>	<i>51</i>
<i>Tab. 2-3</i>	<i>Reagenzien, Lösungen und Puffer.....</i>	<i>52</i>
<i>Tab. 2-4</i>	<i>Lösungen zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentrationen .....</i>	<i>59</i>
<i>Tab. 4-1</i>	<i>Spezifität und Sensitivität des MAIPA-Tests in ITP .....</i>	<i>70</i>
<i>Tab. 4-2</i>	<i>Antikörperspezifitäten der im MAIPA positiv geteste Seren .....</i>	<i>72</i>
<i>Tab. 4-3</i>	<i>126 Seren von ITP-Patienten getestet im Komplementbindungs-Test mit Thrombozyten von gesunden Spendern .....</i>	<i>76</i>
<i>Tab. 4-4</i>	<i>Die spezifische Zahl der gebundenen mAk Moleküle (sABC: specific Antibody Binding Capacity) von gesunden erwachsenen Spendern und Glanzmann-Patienten im Vergleich.....</i>	<i>79</i>
<i>Tab. 4-5</i>	<i>Ausgesuchte ITP-Seren (mit anti-GPIIb-IIIa-Antikörper; MAIPA) getestet mit normalen Thrombozyten und Thrombozyten von Patienten mit Morbus-Glanzmann.....</i>	<i>80</i>
<i>Tab. 4-6</i>	<i>In MAIPA und Komplementbindungs-Test untersuchte Seren (n=79) getestet mit Thrombozyten von Patienten mit Morbus-Glanzmann .....</i>	<i>81</i>
<i>Tab. 4-7</i>	<i>Es ist keine signifikante Diskrepanz zwischen Seren und gereinigten IgG-Fractionen aus ITP-Seren festzustellen. Deutlich dagegen die Diskriminanzanalyse zwischen normalen Thrombozyten und Thrombozyten von Patienten mit Morbus-Glanzmann.....</i>	<i>83</i>
<i>Tab. 4-8</i>	<i>In MAIPA und Komplementbindungs-Test positiv getestete Seren aufgereinigt mit Polyethylenglykol (PEG-Assay).....</i>	<i>83</i>
<i>Tab. 4-9</i>	<i>Die spezifische Zahl der gebundenen mAk-Moleküle (sABC: specific Antibody Binding Capacity) von gesunden erwachsenen Spendern und BSS-Patienten im Vergleich.....</i>	<i>86</i>

---

Tab. 4-10	Analyse der 21 Seren in der MKBR mit verschiedenen Testzellen.....	87
Tab. 4-11	Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der 28 untersuchten Seren in der MKBR mit Thrombozyten von drei verschiedenen Kollektiven. Diese Seren zeigten keine Reaktion in einem vorherigen Versuch mit Thrombozyten von Patienten mit Morbus-Glanzmann .....	88
Tab. 4-12	In der Tabelle sind die Ergebnisse der 16, in der MKBR mit Blutplättchen von drei verschiedenen Kollektive untersuchten Seren, zusammengefasst. Diese Seren zeigten im direkten MAIPA mit GPIb-IX eine positive, mit GPIIb-IIIa dagegen eine negative Antwort .....	89
Tab. 4-13	Ergebnisse der in MKBR untersuchten 3 Kollektive.....	91
Tab. 4-14	Wie erwartet und in den vorherigen Versuche bestätigt wurde, konnte die Hälfte der Seren von ITP-Patienten mit gebundenen anti-GPIIb/IIIa, C1q-Komplement auf die mit GPIIb/IIIa gekoppelten Partikel fixieren. Die Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity: MFI) wurde auf den MFI der Negativkontrolle (AB-Serum eines normalen Spenders) normalisiert (mean MFI 23,020; range, 5,412-77,391; cut-off MFI 1,811). Nur 2/56 (3,6%) Kontrollen aus drei verschiedenen Kollektive gaben falsche positive Signale (mean MFI 1,011; range, 448-16,141).....	96
Tab. 4-15	Durchflusszytometrische Analyse der Komplement-C1q-Bindung durch Autoantikörper in Seren von ITP Patienten. Die Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity:MFI) wurde auf den MFI der Negativkontrolle (AB-Serum eines normalen Spenders) normalisiert (mean MFI 23,020; range, 5,412-77,391; cut-off MFI 1,811) .....	96
Tab. 4-16	IgG-Fractionen aus Seren, von denen 10 in der MKBR positiv getestet und 10 negativ getestet sind, wurden auf ihre Fähigkeit, Mikropartikel zu bilden im FACS analysiert .....	99
Tab. Anhang 1	Parametereinstellung des Durchflusszytometers .....	141

# 1 Einleitung

## 1.1 Thrombozyten allgemein

Die kleinsten zellulären Elemente des Blutes sind die Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt. Sie spielen eine zentrale Rolle sowohl bei der Thrombusbildung und Thrombogenese, als auch in der Atherogenese und der Progression atherosklerotischer Läsionen. Gebildet werden diese Zellen aus den Megakaryozyten. Am Ende ihrer Lebenszeit werden sie im retikuloendothelialen System der Milz und Leber durch Gewebemakrophagen abgebaut (Akkermann, et al., 1987). Ein Drittel der Thrombozyten wird in der Milz gespeichert und steht im ununterbrochenen Austausch mit dem Anteil zirkulierender Thrombozyten. Die mittlere Lebensspanne eines menschlichen Blutplättchens liegt bei etwa 10 Tagen, seine Halbwertszeit beträgt etwa 70 Stunden. Die Plättchenkonzentration im zirkulierenden Blut liegt in der Regel zwischen  $150$  und  $350 \times 10^9/l$ . Unter der Annahme einer Überlebenszeit von 10 Tagen, einer Konzentration von  $250 \times 10^9/l$  und 5l Blutvolumen, beträgt die tägliche Produktion  $250 \times 10^9$  Plättchen. Die Plättchenproduktion wird durch Thrombopoietin kontrolliert (Kaushanky, et al., 2002). Normale Plättchen haben einen Durchmesser von  $3,6 \pm 0,7 \mu\text{m}$  und sind  $0,9 \pm 0,3 \mu\text{m}$  dick. Das mittlere Plättchenvolumen liegt bei  $7,1 \pm 4,9 \text{ fl}$  bei einem Gewicht von 10pg. Es wird angenommen, dass junge Plättchen größer sind als alte. Junge Plättchen enthalten mRNA und sind in begrenztem Umfang zur Proteinbiosynthese fähig.

## 1.2 Thrombozytenadhäsion

Der erste Schritt der primären Hämostase ist die Adhäsion der Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand (primäre Adhäsion), danach folgt die Anlagerung der schon aktivierten Thrombozyten an das Subendothel (sekundäre Adhäsion). Dies führt zur Aktivierung der adhärenen Plättchen, gefolgt von Prozessen wie der Ausbreitung, der Sekretion von Granulainhaltstoffen und der Aggregation.

Wegen der Strömungsbedingungen in den Blutgefäßen und den dadurch bedingten Scherstress ist zur Adhäsion von Blutplättchen eine schnelle und stabile Kontaktaufnahme zirkulierender Thrombozyten mit der Gefäßwand notwendig. Gesteuert wird die Adhäsion durch die Membranglykoproteine der Thrombozyten. Über Interaktion des thrombozytären Rezeptors mit dem kollagenimmobilisierten von Willebrandfaktor (vWF) und dem Glykoproteinkomplex

GPIb/V/IX wird der erste Kontakt zirkulierender Thrombozyten mit der Gefäßwandläsion hergestellt (Clemetson, 1995). Dabei ist die Bindung zwischen dem vWF und dem Glykoproteinkomplex sehr avide und ermöglicht so die Adhäsion unter hohen Scherkräften. Patienten, die eine Defizienz oder Defekte des vWF haben (von-Willebrand- Jürgens-Syndrom) und Patienten mit GPIb-Defekt (Bernard-Soulier-Syndrom) haben daher eine erhöhte Blutungsneigung.

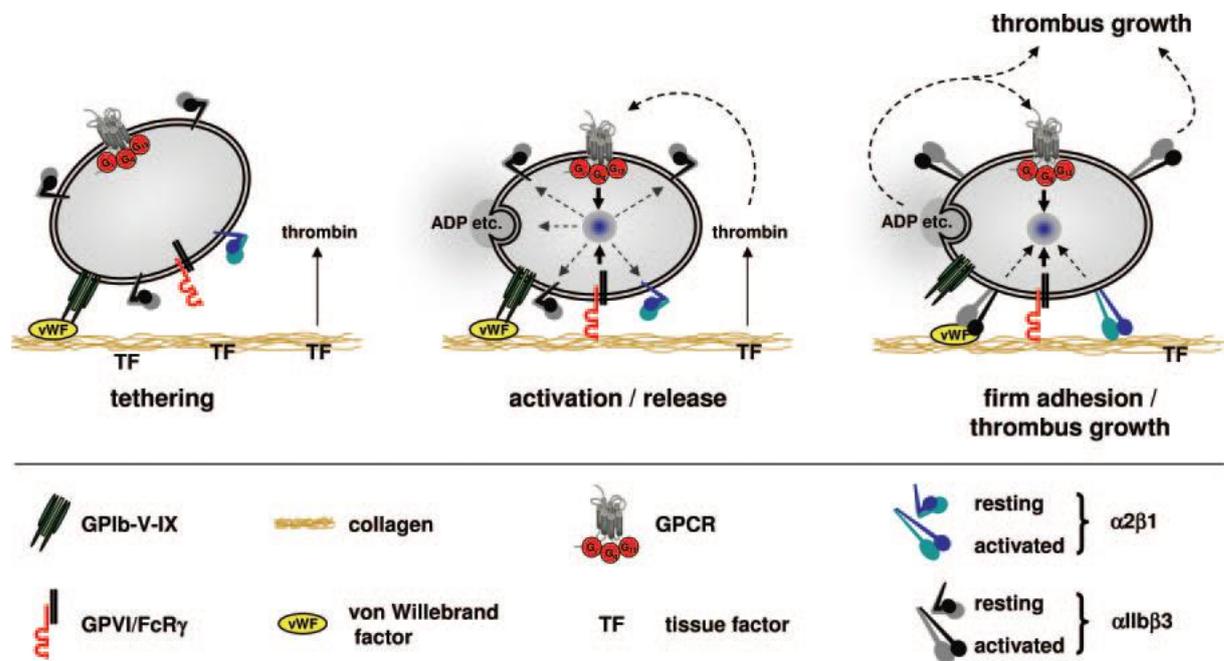


Abb. 1-1 Model for platelet adhesion to the subendothelial matrix at site of vascular injury. The initial contact (tethering) to the ECM is mediated predominantly by GPIb $\alpha$ -vWF interactions. The GPIb $\alpha$ -vWF interaction is essential at high shear rates (>500sec<sup>-1</sup>) but may not be required at lower-shear rates. In a second step, GPVI-collagen interactions initiate cellular activation followed by shifting of integrins to high-affinity state and the release of second-wave agonists, most importantly ADP, ATP, and TxA<sub>2</sub>. GPIb-mediated signaling may amplify GPVI-induced activation pathways. In parallel, exposed tissue factor (TF) locally triggers the formation of thrombin, which in addition to GPVI, mediates cellular activation. Depending on the nature of the injury, 1 of the 2 activation pathway may prevail and sufficient to arrest and activate platelets. Finally, firm adhesion of platelet to collagen through activated  $\alpha 2\beta 1$  (directly) and  $\alpha I I \beta 3$  (indirectly via vWF or other ligands) results in sustained GPVI signaling, enhanced release, and procoagulant activity. In this process,  $\alpha 2\beta 1$  and  $\alpha I I \beta 3$  have partially redundant roles. Released ADP, ATP, and TxA<sub>2</sub> amplify Integrin activation on adherent platelets and mediate thrombus growth by activating additional platelets. The scheme does not exclude the involvement of other receptor-ligand interactions (Ulrich J.H. Sachs and Bernhard Nieswandt, Circulation Research, 2007)

Über Kollagen-, Fibrinogen-, Laminin- und Fibronectinrezeptoren erfolgt eine Stabilisierung der Adhäsion. Diese membranständigen Adhäsionsrezeptoren werden der Rezeptorfamilie der Integrine zugeordnet. Die Anbindung des Kollagens an den Kollagenrezeptor führt zu einer Aktivierung der Thrombozyten und ihrem Formwandel. Bei diesem Wandel verändert sich die diskoide Form in eine kugelige Form mit Pseudopodien, welche die Abdichtung der Läsionen deutlich begünstigt.

### 1.3 Thrombozytenaggregation

Aggregation nennt man den Vorgang der Koadhäsion zweier Thrombozyten. Lösliche Agonisten wie ADP oder Thromboxan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) binden an Aktivierungsrezeptoren und induzieren, analog zur Adhäsion, über bestimmte Signaltransduktionswege eine Aktivierung und Formveränderung der Blutplättchen. Ein bedeutender Rezeptor für die Aggregation ist der Fibrinogen-Rezeptor GPIIb/IIIa. Die Aggregation kommt erst durch eine Konformationsänderung des GPIIb/IIIa zustande, die durch verschiedene Stimulanzen wie ADP, Thrombin, oder Adrenalin bewirkt wird. Diese Konformationsänderung ermöglicht die Bindung von löslichem Fibrinogen an den GPIIb/IIIa- Rezeptor und damit an die Membran der Thrombozyten (Gawaz, et al., 1999).

Im weiteren Verlauf bewirken Fibrinogenbrücken die Ausbildung von Plättchenaggregaten (Siess, 1989; Gawaz, et al., 1991; Plow, et al., 1992; Ginsberg, et al., 1995). Es werden zwei Phasen der Aggregation unterschieden: die primäre und die sekundäre Aggregation. Während der primären Phase werden Thrombozyten über Fibrinogenbrücken in einem reversiblen Vorgang locker miteinander verbunden. Die irreversible sekundäre Aggregation tritt verzögert nach Aggregationsbeginn auf. Sie beginnt sobald der Thrombozyt Inhaltstoffe aus Sekretgranula freisetzt (Siess, 1997). Die Adhäsion und die Aggregation lösen intrazelluläre Signalwirkungen aus, wodurch z.B. die Bildung und Sekretion von TxA<sub>2</sub>, Serotonin und ADP angeregt wird, was wiederum die Rekrutierung von weiteren Blutplättchen, eine Verengung der Blutgefäße und eine Verlangsamung des Blutflusses bewirkt (Willerson, et al., 1989). Dadurch werden die Interaktion der Blutplättchen untereinander und auch die Anheftung der Thrombozyten an die Gefäßwand gesteigert (Siess, 1989; Siess, 1997). Zentrale Bedeutung für die Aggregation kommt dabei dem GPIIb/IIIa-Komplex auf der Thrombozytenoberfläche zu. Sind Blutplättchen im ruhenden Zustand kann kein lösliches plasmatisches Fibrinogen an die Thrombozytenoberfläche binden. Erst nach Aktivierung des Blutplättchens kommt es im Bereich des GPIIb/IIIa-Komplexes zur Freilegung von Bindungsstellen für Fibrinogen.

Da die thrombozytären Membranglykoproteine essentielle und vielfältige Aufgaben bei der Plättchenfunktion haben, und die Folgen, die durch deren Defekt oder Fehlen hervorgerufen werden gravierend sind, werden hier die wichtigsten und für diese Arbeit relevanten Membranglykoproteine näher erläutert.

## 1.4 Thrombozytäre Membranglykoproteine

Die thrombozytären Funktionen während der Hämostase setzen ein enges Zusammenspiel zwischen Thrombozyten, Endothel, Strukturen der Gefäßwand und plasmatischen Gerinnungsfaktoren voraus. Thrombozytäre Membranrezeptoren, auch Adhäsionsrezeptoren genannt, ermöglichen den Kontakt. Man unterteilt diese Rezeptoren gemäß ihrer Molekülstruktur in vier Gruppen: Integrine, leucinreiche Glykoproteine, Selektine und Rezeptoren vom Immunglobulintyp. Besondere und essentielle Funktionen in der Hämostase werden von den Membranrezeptoren der Integrinfamilie und der leucinreichen Glykoproteinfamilie übernommen. Die wichtigen Vertreter dieser zwei Gruppen werden hier näher beschrieben.

### 1.4.1 Integrine

Eine Vielzahl von Körperzellen, wie Thrombozyten, Leukozyten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen exprimieren Integrine, die maßgeblich an Prozessen der Zelldifferenzierung, Migration, Proliferation und Zelladhäsion beteiligt sind (Shattil, 1995; Shattil, et al., 1998). Charakteristisch für Integrine ist die heterodimere Struktur, bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer nicht-kovalent gebundenen  $\beta$ -Untereinheit. Die Klassifizierung der Integrine erfolgt anhand ihrer  $\beta$ -Untereinheit. Acht  $\beta$ -Ketten und 14  $\alpha$ -Ketten, die sich zu einem funktionellen Rezeptor paaren, sind bekannt. Bisher sind fünf thrombozytäre Integrinrezeptoren identifiziert, von denen drei der  $\beta$ 1-Klasse angehören ( $\alpha$ 2 $\beta$ 1=Kollagenrezeptor,  $\alpha$ 5 $\beta$ 1=Fibronektinrezeptor,  $\alpha$ 6 $\beta$ 1=Lamininrezeptor) und zwei der  $\beta$ 3-Klasse zugeordnet werden ( $\alpha$ IIb $\beta$ 3=Fibrinogenrezeptor,  $\alpha$ v $\beta$ 3=Vitronektinrezeptor).

Integrine interagieren mit einer Vielzahl von Proteinen (z.B. Kollagen, Fibrinogen), die in löslicher Form im Plasma vorkommen oder Bestandteil extrazellulärer Strukturen sind. Die Regulation der Integrin-Ligand-Interaktionen erfolgt über eine gesteigerte Expression der Rezeptoren auf der Zelloberfläche, über Affinitätsmodulation mittels Konformationsänderung der extrazellulären Domäne und über divalenten Kationen ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ), deren Anwesenheit für die Bindung der Liganden erforderlich ist (Shattil, 1995; Neri, et al., 1996). Eine schnell gesteigerte Präsentation der Integrine an der Zelloberfläche erreicht das Blutplättchen durch Fusion von integrinspeichernden Granula mit der Zellmembran (Shattil, 1995). Bindung von Agonisten, wie Thrombin und ADP, an ihre thrombozytären Membranrezeptoren induziert über intrazelluläre Signalwege eine Konformationsänderung einiger Integrinrezeptoren, die so aktiviert werden. Man nennt diesen Mechanismus „Inside-Out-Signaling“. Die Bindung von Liganden an Integrine selbst kann ebenfalls zu einer affinitätssteigernden Konformationsänderung führen und die Zelle

aktivieren. Diesen Prozess bezeichnet man „Outside-In-Signaling“ (Phillips, et al., 1988; Shattil, et al., 1997; Shattil, et al., 1998).

Auf Thrombozyten konnten bisher fünf verschiedene Integrine nachgewiesen werden (Tab. 1-1, Seite 5). Integrine dienen als Rezeptoren für unterschiedliche Liganden und spielen eine zentrale Rolle in der Hämostase. Die Glykoproteine GPIb/V/IX und GPIV gehören zu den leucinreichen Glykoproteine der Blutplättchen.

Tab. 1-1 Bisher bekannte Integrine und leucinreiche Glykoproteine auf der Thrombozytenoberfläche, angegeben mit Nomenklatur des Integrins sowie des Membranglykoproteinkomplexes. Aufgeführt sind weiter die spezifischen Liganden

Klassifizierung		Elektrophoretische Einteilung	CD-Nomenklatur	Liganden
<b>Integrine</b>	$\alpha 2\beta 1$	GPIa/IIa	CD49b	Kollagen
	$\alpha 5\beta 1$	GPIc/IIa	CD49c	Fibronektin
	$\alpha IIb\beta 3$	GPIIb/IIIa	CD41-CD61	Fibrinogen, von-Willebrand-Faktor, Fibronektin, Vitronektin, Thrombospondin
	$\alpha V\beta 3$	GP $\alpha v$ /IIIa	CD51-CD61	Vitronektin, Fibrinogen, Fibronektin
<b>Leucinreiche Glykoproteine</b>	-	GPIb/V/IX	CD42a-b-c	Von-Willebrand-Faktor
	-	GPIV	CD36	Kollagen, Thrombospondin

### 1.4.2 Glykoproteinkomplex IIb/IIIa (GPIIb/IIIa, $\alpha 2\beta 3$ -Integrin)

Die Mechanismen der physiologischen Hämostase bzw. pathophysiologischen Thrombusbildung erfordern ein enges Zusammenspiel zwischen Thrombozyten, Endothelzellen, plasmatischen Gerinnungsfaktoren und Strukturen der extrazellulären Matrix der Gefäßwand. Adhäsionsvorgänge, die durch eine Vielzahl von spezifischen Rezeptoren reguliert werden, spielen dabei eine wesentliche Rolle (siehe Kapitel 1.2, Seite 1 und Kapitel 1.3, Seite 3). Thrombozyten weisen membranständige Glykoproteine (GP) auf, welche die Interaktion von Blutplättchen untereinander, mit der subendothelialen Matrix, mit plasmatischen Gerinnungsfaktoren, Endothelzellen oder mit Leukozyten vermitteln.

Die GPIIb- und IIIa-Vorläufer sind Produkte verschiedener Genen, die zusammen auf Chromosom 17 in der Region q21-22 lokalisiert sind (Sosnoski, et al., 1988). Das GPIIb-Gen ist 17,2kB lang und besteht aus 30 Exons mit Längen zwischen 45 und 249Bp (Heidenreich, et al., 1990). Die Größe des GPIIIa-Gens beträgt 63kB und umfasst 14 Exons (Zimrin, et al., 1990; Wilhide, et al., 1997). Das  $\alpha IIb\beta 3$ -Integrin (GPIIb/IIIa) befindet sich auf der Thrombozytenmembran, ist der Hauptrezeptor für Fibrinogen und vermittelt im Rahmen der Hämostase die Thrombozytenaggregation und die Adhäsion von Thrombozyten an extrazelluläre Matrixproteine.

GPIIb/IIIa war eines der ersten Integrine, die identifiziert (Nurden, et al., 1974) und aufgereinigt (Jennings, et al., 1982), später kloniert und sequenziert (Fritzgerald, et al., 1987; Loftus, et al., 1987; Poncz, et al., 1987) wurden und war das erste Integrin, welches in rekombinanter Form exprimiert wurde (O'Toole, et al., 1989). Der GPIIb/IIIa-Komplex ist der Hauptrezeptor für Fibrinogen, bindet aber auch Fibronectin, von-Willebrand-Faktor und Vitronectin. Durch seine Fähigkeit Fibrinogen zu binden, ist er Vermittler der Plättchenaggregation. Sekundär ist er auch an der Plättchenadhäsion beteiligt (Hantgan, et al., 1999; Lages, et al., 1994), wobei aber die anderen genannten Liganden die bedeutendere Rolle spielen.

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

Die Mehrheit der Zielantigene auf Thrombozyten ist auf dem Integrin  $\alpha_{Ib}\beta_3$  lokalisiert, welches als Fibrinogen-Rezeptor eine wesentliche Rolle in Zell-Matrix und Zell-Zell Interaktionen spielt (Hynes, 2002). Das  $\alpha_{Ib}\beta_3$ -Integrin (Mr 235kDa) ist mit 40.000-80.000 Molekülen das Hauptintegrin auf der Plättchenoberfläche, dessen Expressionsdichte sich nach aktivierungsabhängiger Freisetzung des intrazellulären  $\alpha_{Ib}\beta_3$  aus den alpha-Granula noch erhöht (Faull, et al., 1994; Vorchheimer, et al., 1999).

Die  $\alpha_{Ib}$ -Untereinheit (Mr 130kDa) unterliegt einer postrationalen proteolytischen Spaltung, aus welcher zwei Polypeptidketten hervorgehen, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die schwere  $\alpha_{IbH}$  Kette (Mr 105kDa) bildet eine extrazelluläre Domäne aus 871 Aminosäuren (AS). Die leichte  $\alpha_{IbL}$  Kette (Mr 23kDa) beinhaltet ein 111 aminosäurelanges, transmembranäres Segment und eine 26 AS-lange zytoplasmatische Domäne (Poncz, et al., 1987). Die  $\beta_3$ -Untereinheit (Mr 95kDa) ist ein disulfidbrückenreiches Einzelpeptid aus 762 AS mit einem transmembranären Segment und einer 45 AS-langen zytoplasmatischen Domäne (Fritzgerald, et al., 1987). Mittlerweile ist die Kristallstruktur von  $\alpha_{Ib}\beta_3$  aufgeklärt worden (Xiong, et al., 2001; Xiong, et al., 2004; Xiao, et al., 2004). Die  $\alpha_{Ib}$  Untereinheit besteht aus 4 Domänen: einer aminoterminalen Domäne mit einem 7-fachgefalteten (7-bladed) Propeller, einer Immunglobulin (Ig)-ähnlichen „Thigh“ Domäne und 2 Colinearen  $\beta$ -Sandwich Domänen (Calf-1 und Calf-2). Die  $\beta_3$ -Untereinheit beinhaltet 8 Domänen: eine aminoterminal PSI (Plexine, Semaphorine, Integrine) Domäne, eine Ig-ähnliche Hybriddomäne, in deren oberen Loops die ligandenbindende  $\alpha$ -A-

ähnliche Domäne ( $\beta A$ ) integriert ist. Die Hybriddomäne ist mit 4 dem epidermalen Wachstumsfaktor (EWF) ähnlichen EGF-Domänen und einer  $\beta$ -zytoplasmatischen Domäne ( $\beta$ -TD) verbunden. Ein wesentliches Strukturmerkmal der PSI-Domäne ist ein ausgeprägt großer AB *Loop* ihrer beiden Stränge, welche durch eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten 13 und 435 gebildet wird. Dadurch bedingt wird eine Interphase zwischen der PSI- und EGF-2-Domäne gebildet, welche eine entscheidende Rolle in der Integrinaktivierung übernimmt (Xiong, et al., 2004). Das  $\alpha$ IIB $\beta$ 3-Integrin fungiert primär als bidirektionales Konduit (Leitung) für inside-out und outside-in Signaltransduktionsprozesse innerhalb der Plasmamembran (Schatill, et al., 2004). Die inside-out Signalübertragung verändert die  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 Konformation und transformiert das Integrin in seinen ligandenbindenden Status (hochaffine Form). Die Ligandenbindung induziert wiederum strukturelle Umlagerungen, durch welche eine Signalübertragung ins Zellinnere (outside-in) ermöglicht wird. In einem ersten Modell („Switchblade“ Modell) (Takagi, et al., 2002) wurde postuliert, dass die physiologische Ligandenbindung eine Streckung der hochbeweglichen Genu-Region (Knie-Region) erfordert. Dadurch richtet sich das  $\alpha$ IIB $\beta$ 3-Integrin auf und wechselt von seiner gebeugten (inaktive Form) in seine gestreckte Konformation (aktive Form). Alternativ zu dem „Switch-blade“ Modell wird in einem zweiten Modell, dem „Deadbolt“ Modell (Xiong, et al., 2003), angenommen, dass ausgehend von den transmembranären Helices die inside-out Signalübertragung Konformationsänderungen in der benachbarten  $\beta$ -TD Domäne des  $\beta$ 3-Integrins auslöst. Die strukturelle Aufklärung der PSI-Domäne bestätigt vorgehende Beobachtungen, dass diese Domäne bedeutsam für die Integrinaktivierung ist (Xiong, et al., 2004). Ein Austausch der Aminosäure Leu33 durch Pro33 könnte daher möglicherweise die  $\alpha$ IIB $\beta$ 3-Rezeptoraktivität, d.h. die Ligandenbindung, verändern. Eine funktionelle Studie deutet darauf hin, dass die Punktmutation Pro33 zur erhöhten Affinität des  $\alpha$ IIB $\beta$ 3-Rezeptors an Fibrinogen führt (Vijayan, et al., 2000).

### 1.4.3 Integrin $\alpha$ 2 $\beta$ 1

Das Integrin  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 wurde als erstes von Kunicki et al. 1981 (Kunicki, et al., 1981) als ein heterodimerer Komplex auf der Oberfläche von Thrombozyten beschrieben. Mittlerweile ist bekannt, dass das Molekül nicht nur auf Blutplättchen, sondern auch auf zahlreichen anderen Zellen, wie zum Beispiel reifen Megakaryozyten, Epithelzellen, Fibroblasten oder aktivierten T-Lymphozyten, exprimiert werden kann (Santoso, et al., 1995). Das Integrin  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 ist in Abhängigkeit vom Zelltyp in der Lage, mit verschiedenen Liganden zu interagieren. So dient es zum Beispiel auf Thrombozyten als Hauptkollagenrezeptor (Staatz, et al., 1989; Saelmann, et al., 1994), während es im Gegensatz dazu auf Epithelzellen sowohl Kollagen, als auch Laminin binden

kann (Elices, et al., 1989; Chan, et al., 1993). Die Ligandspezifität ist also deutlich von der Art der exprimierenden Zelle abhängig.

#### 1.4.4 Leucinreiche Glykoproteine

Außer Integrinen exprimieren Thrombozyten noch eine weitere Familie von Membranglykoproteine, die sich durch ihren Reichtum an der Aminosäure Leucin auszeichnen. Zu ihnen gehören das Glykoprotein GPIb/V/IX, welches den von-Willebrand-Faktor, P-Selektin, Thrombin bindet und das Glykoprotein GPIV (Gawaz, 2001).

#### 1.4.5 Glykoproteinkomplex Ib/V/IX (GPIbIX + GP V)

Der GPIb/V/IX-Komplex wird aus vier einzelnen Genprodukten (GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$ , GPIX und GPV) gebildet. Die Gene für GPIb $\alpha$  und GPIb $\beta$  liegen auf Chromosom 17 und 22, diejenigen für GPIX und GPV auf Chromosom 3. Jede dieser vier Untereinheiten ist Teil der leucinreichen“ repeat motif superfamily“, die bei verschiedenen Prozessen wie Zellsignale, Zelladhäsion und Zellentwicklung beteiligt sind. Deshalb zählt man dieses GP zu den leucinreichen Proteinen. Mehrere Studien zeigten, dass die Koexpression und Assoziation des GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$  und GPIX für das erfolgreiche Durchschleusen jeder Untereinheit durch das endoplasmatische Retikulum, den Golgi-Apparat und zur Oberfläche benötigt werden. So wurde bewiesen, dass GPIb $\alpha$  bei gleichzeitiger Expression von GPIb $\beta$  und GPIX effektiver an der Zelloberfläche präsentiert werden konnte. Weiter stellte man fest, dass GPIb $\beta$  die Interaktionen zwischen GPIb $\alpha$  und GPIX vermittelt (Lopez, et al., 1998; Nurden, et al., 2001). GPI $\alpha$  (135kDa, 610 Aminosäure) besteht aus einer N-terminalen Domäne, die 7 leucinreiche Wiederholungen beinhaltet. Innerhalb dieses N-terminalen Bereiches liegen die Thrombinbindungsstelle und die Bindungsstelle mit hoher Affinität für den von-Willebrand-Faktor (vWF). Je ein GPIb-Molekül bindet nicht-kovalent ein GPIX-Molekül im Verhältnis 1:1. GPV ist die zentrale Einheit des Rezeptorkomplexes, um die je zwei GPIb- und GPIX-Proteine nicht-kovalent miteinander verbunden, gruppiert sind.

Bei der primären Hämostase vermittelt GPIb $\alpha$  eine kurze Befestigung der Thrombozyten (Adhäsion), die durch die Integrine  $\alpha 2\beta 1$  und/oder  $\alpha 2\beta 3$  stabilisiert wird. Bei fehlender Agglutination kommt es zu einer verminderten  $\alpha$ -Thrombinbindung an Thrombozyten und einer reduzierten Thrombozytenaggregation. Ein Gendefekt des GPIb $\alpha$  ist eine der häufigsten Ursachen des Bernard-Soulier-Syndroms (BSS). Oft kann ein Verlust der Transmembrandomäne mit erhöhtem Plasmaspiegel der Untereinheiten gefunden werden. Schon die kleinste Veränderung der C-terminalen Region des GPIb $\alpha$  erhöht die Beweglichkeit des Komplexes innerhalb der

Plasmamembran und erniedrigt seine Fähigkeit, den von-Willebrand-Faktor zu binden (Lopez, et al., 1998; Nurden, et al., 2001). Weiter wurde bewiesen, dass die Abwesenheit von GPIb $\alpha$  direkten Einfluss auf die Makrothrombozytopenie des BSS hat (Kato, et al., 2004).

GPIb $\beta$  (25kD, 181 Aminosäuren) umfasst eine leucinreiche Wiederholung und ist mit GPIb $\alpha$  durch Disulfidbrücken verbunden. Ferner besitzt es eine Proteinkinase A-Phosphorylierungsstelle, die nach Stimulation mit einem Agonisten die Neuordnung des Zytoskeletts reguliert. Durch mehrere Studien in CHO-Zellen wurde nachgewiesen, dass der Einbau von GPIb $\alpha$  und GPIX in die Thrombozytenmembran durch einen Defekt des GPIb $\beta$  nicht unterstützt werden kann (Lopez, et al., 1998; Nurden, et al., 2001).

GPIX (22kD, 160 Aminosäuren) besitzt wie GPIb $\beta$  eine leucinreiche Wiederholung. Durch Mutation verliert GPIX seine Fähigkeit, einen Komplex mit GPIb $\alpha$  und GPIb $\beta$  zu bilden (Lopez, et al., 1998; Nurden, et al., 2001).

GPV (82kD, 544 Aminosäuren) beinhaltet 15 leucinreiche Wiederholungen und einen kurzen zytoplasmatischen Schwanz aus 16 Aminosäuren. Es wird angenommen, dass es benachbarte GP Ib/IX-Komplexe durch Wechselwirkungen mit GPIb $\alpha$  verbindet. Weiter ist GPV eines der wenigen Thrombinsubstrate auf der Plasmamembran der Thrombozyten. Da es aber keine wichtige Rolle bei der Präsentation des GP Ib/V/IX-Komplexes an der Zelloberfläche spielt, vermutet man, dass Mutationen des GPV nicht Auslöser des BSS sein können (Lopez, et al., 1998; Kato, et al., 2004).

In jedem vWF-Molekül hat man zwei GPIb-Bindungsstellen gefunden, einmal zwischen AS 474 und 488, und zum anderen zwischen AS 694 und 708. Aufgrund einer intramolekularen Disulfidbrücke, die zu einer Schleife im Molekül führt, liegen beide Bindungsstellen nahe beieinander. Man konnte der Bindungsstelle auf dem vWF eine Bindungsstelle auf der  $\alpha$ -Untereinheit von GPIb zuordnen, und zwar zwischen AS 251 und 279. Es konnte inzwischen bestätigt werden, dass die Bindungsaffinität zwischen vWF und GPIb durch die räumliche Struktur beeinflusst wird.

### **1.4.6 Aufgaben des GP Ib/V/IX-Komplexes**

Der GP Ib/V/IX-Komplex hat zwei wichtige Aufgaben in der Thrombozytenfunktion. Er vermittelt das Anhaften an der Verletzungsstelle, indem er vWF bindet und ermöglicht dadurch, dass Thrombin auch in niedrigen Konzentrationen Thrombozyten aktivieren kann. Die Hauptfunktion des GPIb/V/IX-Komplexes bei der Hämostase ist, den Halt der Plättchen an der Stelle der Gefäßverletzung zu ermöglichen. Wie andere Rezeptoren der Adhäsion kann die Bindung

des GPIb/V/IX-Komplexes mit dem vWF-Signale an das Zytoplasma der Thrombozyten weiterleiten und somit die Ereigniskaskade anstoßen, die zur Bildung eines blutstillenden Plättchenpfropfes führt. Diese Signalkaskade, die bei der Bindung des vWF an den GPIb/V/IX-Komplex ausgelöst wird, hat die Erhöhung des zytosolischen  $Ca^{2+}$  und Aktivierung der Proteinkinase zur Folge (Lopez, et al., 1998). Die Bindungsstelle für den GPIb/V/IX-Komplex befindet sich innerhalb der A1-Domäne des vWF. Man nimmt an, dass der vWF, sobald er an die subendotheliale Matrix bindet, eine Konformationsänderung erfährt, die eine normalerweise verborgene Bindungsstelle innerhalb der A1-Domäne offenlegt. Der vWF bindet ebenfalls unter dem Einfluss von hohen Scherkräften an den GPIb/V/IX-Komplex. Dadurch wird eine Konformationsänderung entweder des Rezeptors, des vWF oder von beiden induziert. Es wurde eine Anzahl von Regulatoren ermittelt, die die Wechselwirkungen zwischen dem vWF und dem GPIb/V/IX-Komplex verbessern. Dazu gehört auch das Antibiotikum Ristocetin. Man vermutet, dass der GPIb/V/IX-Komplex die Translokation der Thrombozyten entlang einer mit vWF besetzten Oberfläche vermitteln kann. Auf diese Weise kann die Geschwindigkeit der Thrombozyten verlangsamt werden (Lopez, et al., 1998). Die Bindung zwischen dem Thrombozytenrezeptor GPIb/IX und dem vWF ist aufgrund der Multimerisation des vWF-Moleküls eine hochaffine. Da in vWF-Multimeren viele GPIb-Bindungsstellen zur Verfügung stehen, kommt es zu einer reißverschlussähnlichen Bindung, die vor allem den hohen Scherkräften des strömenden Blutes standhalten. Die Thrombinbindungsstelle liegt ebenfalls in der N-terminalen Region des GPIb $\alpha$ . Durch die Bindung von Thrombin an den GPIb/V/IX-Komplex wird die Thrombozytenantwort auf eine niedrige Thrombinkonzentration unterstützt. Eine fehlerhafte Antwort auf Thrombin wirkt sich unweigerlich bei der Blutungsstörung bei BSS-Patienten aus (Lopez, et al., 1998). Eine weiter interessante Eigenschaft des GPIb/V/IX-Komplexes ist, dass keine der zytoplasmatischen Sequenzen der 4 Polypeptide Motive umfasst, die mit Signalproteinen interagieren. Jedoch interagieren diese Regionen mit Proteinen der Thrombozytenmembran. Die zytoplasmatische Domäne des GPIb $\alpha$  hat eine Bindungsstelle für aktinbindendes Protein. Diese Verbindung mit aktinbindendem Protein bindet den Komplex an ein Netz aus kurzen submembranösen Aktinfilamenten (Lopez, et al., 1998). Angesichts der vielfältigen und essentiellen Funktionen, die den thrombozytären Glykoproteinen zugeschrieben werden, wird verständlich, dass Abnormalitäten in ihrer Expression oder Funktion Blutungserkrankungen mit typischen Krankheitsbildern hervorrufen können. Zwei gut untersuchte Anomalien werden in dieser Arbeit näher betrachtet: Das Bernard-Soulier-Syndrom und die Thrombasthenie Glanzmann (oder Glanzmann-Nägeli-Syndrom, Morbus Glanzmann-Nägeli).

### 1.4.7 Bernard-Soulier-Syndrom

Viele der heutigen Erkenntnisse über den GPIb/IX-Komplex wurden an Patienten gewonnen, denen dieser Rezeptor fehlt oder bei denen er nicht funktioniert. Man nennt dieses Krankheitsbild Bernard-Soulier-Syndrom. Im Blut dieser Patienten findet man große, abnorm geformte Thrombozyten und eine verringerte Thrombozytenüberlebensdauer. Die Folge davon ist eine Thrombozytopenie mit hoher Blutungsneigung. Der Grund für die Thrombozytenverformung könnte in der Verankerung des GPIb $\beta$  im Zytoskelett der Plättchen liegen. Diese Verankerung sorgt wahrscheinlich auch für eine Beteiligung des GPIb/IX an der Thrombozytenaktivierung, so z.B. über eine in der zytoplasmatischen Domäne vorhandene Serinstelle, die eine potentielle Phosphorylierungsstelle darstellt. Zum ersten Mal wurde das autosomal-rezessiv vererbte Bernard-Soulier-(Riesenthrombozyten)-Syndrom (BSS) im Jahre 1948 an einem jungen Mann mit einer bis dahin unbekanntem ernsthaften Blutungserkrankung von Jean Bernard und Jean-Pierre Soulier beschrieben (Bernard, et al., 1948). Bei diesem jungen Mann fielen neben einer Thrombozytopenie, einer verkürzten Thrombozytenlebenszeit, sehr große Thrombozyten und eine deutlich verlängerte Blutungszeit auf. Später fanden Howard et. al. und Caen und Levy-Toledano heraus, dass die Thrombozyten von BSS-Patienten eine pathologische Ristocetin-Aggregation bei normalem von-Willebrand-Faktor aufwiesen (endogener Thrombozytendefekt) (Lopez, et al., 1998). Das BSS wird heute der Gruppe der makrothrombozytären Thrombozytopathien zugeordnet. Die Blutplättchenzahl ist dabei meist normal oder leicht vermindert, der Thrombozytendurchmesser vergrößert. Dieser kann von 3 $\mu$ m bis 20 $\mu$ m reichen. Der Megakaryozytenbefund im Knochenmarkausstrich ist unauffällig. BSS-Plättchen aggregieren und sekretieren auf die meisten Stimuli hin, sind aber nicht in der Lage, den von-Willebrand-Faktor zu binden. Dies führt zu einer deutlich reduzierten Anheftung an das Subendothel, die für diese Krankheit charakteristisch ist. Der BSS-Phänotyp wird durch drei Gendefekte bestimmt, welche für die Proteine GPIb $\alpha$ , GPIb $\beta$  und GPIIX codieren. Somit liegen quantitative und qualitative Defekte innerhalb des Thrombozyten-Membran-Glykoprotein GPIb/V/IX-Komplexes, des Rezeptors des von-Willebrand-Faktors, vor. Dadurch kommt es zu Störungen der Thrombozytenfunktion. Patienten mit einem BSS haben eine erhöhte Blutungsneigung (z.B. Petechien, Hämatome) (Lopez, et al., 1998; Nurden, et al., 2001; Sitzmann, 2002). In Deutschland sind vor allem Defekte des GPIIX als ursächlich beschrieben (Sachs, et al., 2003).

### 1.4.8 Glanzmann Thrombasthenie

Die ersten Hinweise, dass GPIIb/IIIa an der Fibrinogenbindung beteiligt ist, kamen von Studien eines Krankheitsbildes, das als Thrombasthenie Glanzmann beschrieben ist (George, et al., 1990).

Die Thrombasthenie Glanzmann ist eine seltene, autosomal rezessiv vererbte Blutungskrankheit, bei der die Thrombozyten auch nach Stimulierung durch Agonisten nicht in der Lage sind, zu aggregieren. Die Diagnose wird gestellt, wenn bei dem betroffenen Patienten eine mukokutane Blutungstendenz, eine verlängerte Blutungszeit, eine normale Plättchenzahl und fehlende Thrombozytenaggregation bei Anwesenheit von ADP, Kollagen und Adrenalin sowie eine mangelnde Retraktion des Gerinnsels vorliegen. Im Jahre 1974 entdeckten Nurden und Caen, dass bei dieser Krankheit eine Veränderung des normalen Musters der Plättchenglykoproteine vorliegt.

Die Glanzmann Thrombasthenie ist eine autosomal rezessiv vererbte Plättchenfunktionsstörung, die durch eine fehlende oder verminderte Expression des GPIIb/IIIa in der Thrombozytenmembran hervorgerufen wird. Man unterscheidet mehrere Morbus Glanzmann Subtypen. Bei Typ I fehlt das  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Integrin fast vollständig (<5%), bei Typ II ist es reduziert auf 10-20% der normalen Menge, und bei Typ III wird es in nahezu normalen Mengen (50-100%), jedoch mit qualitativem Defekt exprimiert (Caen, et al., 1995). Im klinischen Bild stehen Schleimhautblutungen im Vordergrund, die sich vor allem in Form von Epistaxis darstellen. Spontane schwere Hämorrhagien sowie petechiale Blutungen sind dagegen selten. Lebensbedrohliche Blutungen können während der Menarche und nach Entbindung bzw. infolge von Traumen auftreten (Barthels, et al., 2003). Während die Plättchenzahl und Plättchengröße der Patienten physiologische Werte aufweisen, fehlt die Aggregation der Plättchen nach Kollagen- oder ADP-Stimulation. Die maximale Gerinnselfestigkeit zeigt sich im Thrombelastogramm vermindert (George, et al., 1994; Barthels, et al., 2003). Heute sind zahlreiche genetische Defekte beschrieben, die Ursache der Thrombasthenie Glanzmann sind (Morel-Kopp, et al., 1997; Grimaldi, et al., 1998). Die Mehrheit dieser Defekte führt zu Typ I-Thrombasthenie Glanzmann, welcher durch Nonsense-Mutationen (Verschiebung des Leserasters) verursacht wird, die das pre-mRNA-splicing beeinflussen. Auf diese Weise kommt es zur Bildung von unstabilen mRNA-Transkripten oder zur Produktion von unstabilen oder verkürzten Proteinprodukten. Eines der interessantesten Merkmale der Thrombasthenie Glanzmann ist der übereinstimmende Defekt sowohl im GPIIb als auch im GPIIIa. Die Erklärung dazu wird von den Erkenntnissen von O'Toole und Mitarbeitern (O'Toole, et al., 1989) geliefert. Sie zeigten, dass eine effiziente Oberflächenexpression des GPIIb/IIIa-Komplexes beide Untereinheiten benötigt.

## 1.5 Autoimmunerkrankungen allgemein

Bei Autoimmunerkrankungen handelt es sich um chronisch entzündliche Prozesse unklarer Ätiologie, die entweder organspezifischer oder systemischer Natur sein können, bevorzugt das

weibliche Geschlecht betreffen und mit der Bildung von diagnostisch relevanten Autoantikörpern einhergehen.

### 1.5.1 Induktion von Autoimmunreaktionen

Wie es zur Entstehung von Autoimmunreaktionen kommt, ist noch unklar. Man geht aber heute davon aus, dass bei genetisch prädisponierten Individuen die Selbsttoleranz durch exogene Faktoren, z.B. infektiöse Agentien oder Umweltstoffe, durchbrochen, d.h. anerge autoreaktive T-Zellen aktiviert werden. Diese Selbsttoleranz spielt bei der Verhinderung von autoimmunen Reaktionen eine wesentliche Rolle. Man unterscheidet die zentrale Toleranz, die im Thymus induziert wird, und die periphere Toleranz, d.h. Schutzmechanismen, die verhindern, dass autoreaktive T-Zellen in der Peripherie aktiviert werden. Es gibt aber verschiedene Situationen, in denen die Selbsttoleranz durchbrochen werden kann. Infektion und Entzündung führen zu einer verstärkten Expression von MHC-Klasse-I und II-Molekülen bei einigen Zellen. (Barzilai, et al., 2007; Münz, et al., 2009). Dadurch kann sowohl die Anzahl verschiedener Peptide als auch ihre Dichte auf der Zelloberfläche erhöht werden, wodurch eine Interaktion mit solchen Zell-Klonen zu Stande kommen kann, die gegenüber einer geringeren Antigenpräsentation nicht sensitiv sind. Autoimmunreaktionen können aber auch durch ‚molecular mimicry‘ induziert werden, d.h. kreuzreagierende Epitope zwischen fremdem Immunogen und Selbstmolekülen. Ferner können durch exogene Faktoren Selbstantigene so verändert werden, dass sie von T-Zellen als ‚fremd‘ erkannt werden (Giard, 2005; Kanlaya, et al., 2009). Andererseits werden durch infektiöse Prozesse aber auch körpereigene Proteine freigesetzt. Eine gestörte Balance zwischen apoptotischem Abbau von diesem Zellmaterial (Inhibition von Caspasen) und überschießender Freisetzung von autologen Fragmenten führt zu einem verstärkten Angebot von Granzym B-proteasesensitiven Autoantigenen. Aufnahme und Präsentation dieser fragmentierten Autoantigene durch APC (Antigen-presenting cells) über MHC II kann dann Effektorreaktionen gegen exogene und autologe Epitope induzieren und damit autoaggressive Reaktionen amplifizieren (Levine, et al., 2007). Immer wieder lässt sich auch ein zeitlicher Zusammenhang zwischen physischen oder psychischen Belastungen und der Erstmanifestation einer autoimmunen Erkrankung beobachten. Langdauernder Stress kann z.B. zu einer tiefgreifenden Störung der immunologischen Homöostase führen und die Abwehrkräfte schwächen. Die Reaktivität des Immunsystems wird durch Neuropeptide und Hormone wesentlich beeinflusst und die heute eindeutig nachgewiesene Interaktion zwischen Nervensystem, hormonalem System und Immunsystem erklärt, warum das Auftreten einer autoimmunen Erkrankung in so vielen Fällen in Zusammenhang mit Störungen der neuroendokrinen Funktionen steht (Cutolo, et al., 2009).

### **1.5.2 Bedeutung natürlich vorkommender Autoantikörper**

Autoimmunität ist primär ein physiologischer Zustand und Autoantikörper sind ein wichtiger Bestandteil des natürlichen Immunsystems. Sie spielen eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der Gesundheit. Ihre Funktion besteht in der 'first line defense' gegenüber Erregern, in der Beseitigung alternder Zellen bzw. alterierter Autoantigene und daraus resultierend in dem Schutz des Organismus vor der Induktion pathologischer Autoimmunreaktionen. Diese natürlichen Autoantikörper sind bevorzugt vom IgM-Typ, polyreaktiv und vor allem gegen Zytoskelett- und Basalmembranantigene gerichtet. Im Immunfluoreszenztest an Gewebeschnitten reagieren sie häufig mit Gefäßendothelien oder Sarkolemm. Bei einer unspezifischen Aktivierung des Immunsystems kann ihre Synthese stark stimuliert werden. So lassen sich z.B. bei Patienten mit viralen Infektionen vor allem Antikörper gegen Keratin, Tubulin, Vimentin, Aktin, Laminin, Kollagen usw. beobachten. Werden sie daher bei chronisch entzündlichen Prozessen unklarer Ätiologie nachgewiesen, darf man sie als Ausdruck der Reaktion des Immunsystems auf ein infektiöses Agens interpretieren. Auch bei immunproliferativen Prozessen finden sich nicht selten Autoantikörper, wie z.B. Rheumafaktoren oder Kälteagglutinine bei Lymphomen. In welcher Beziehung die pathologischen, d.h. mit Autoimmunerkrankungen assoziierten spezifischen Autoantikörper mit den natürlichen Antikörpern stehen, ist noch unklar. Vermutet wird z.B., dass durch Punktmutationen die Antigenspezifität verändert wird. Häufig haben beide Antikörpertypen sehr ähnliche Antigenspezifitäten, so dass ihre für die Diagnose so wichtige Differenzierung dann schwierig ist. Bei dieser Unterscheidung ist einerseits der Einsatz gereinigter Antigene hilfreich, andererseits spielt aber auch die zum Antikörpernachweis verwendete Methode eine wesentliche Rolle. Je sensitiver sie ist, umso häufiger werden niedertitrige natürlich vorkommende Antikörper erfasst, d.h. die Spezifität ist vermindert. Diesen Nachteil haben insbesondere die heute häufig verwendeten ELISA-Methoden (Petit pierre, et al., 2009). Andere Techniken, wie z.B. die radiale Immundiffusion oder die Komplementbindungsreaktion haben eine sehr hohe diagnostische Spezifität bei verminderter Sensitivität. Eine Kombination verschiedener Nachweismethoden ist daher zum sicheren Nachweis krankheitsspezifischer Autoantikörper notwendig (Wilson, et al., 2009).

### **1.5.3 Klinische Bedeutung des Nachweises von Autoantikörpern**

Ein positiver Antikörperbefund ist nicht gleichzusetzen mit einer Autoimmunerkrankung. Für die Interpretation und auch die Therapie ist immer die klinische Ausgangslage entscheidend. Wenn die Induktion von Antikörpern durch einen infektiösen oder proliferativen Prozess nicht ausgeschlossen werden kann, sollten Kontrolluntersuchungen nach ca. 3 Monaten durchgeführt werden. Die

unkontrollierte Produktion von Autoantikörpern bei primären oder sekundären Autoimmunerkrankungen ist dadurch erklärbar, dass die aktivierten B-Zellen nicht mehr supprimiert werden bzw. keine Gegenregulation mehr stattfindet. Es ist daher nicht verwunderlich, dass diese Autoantikörperproduktion bei vielen Krankheitsbildern unabhängig vom Krankheitsverlauf persistiert. Ferner sind nicht bei allen Autoimmunerkrankungen zirkulierende Autoantikörper nachweisbar. Dies trifft vor allem für Krankheiten zu, bei denen durch T-Zellen vermittelte autoimmune Reaktionen im Vordergrund stehen, wie z.B. bei der multiplen Sklerose. Bei einigen Autoimmunerkrankungen korrelieren die Autoantikörpertiter allerdings mit der Krankheitsaktivität und sie werden dann auch unter erfolgreicher immunsuppressiver Therapie negativ. In solchen Fällen dürfen sie auch als Verlaufsparemeter herangezogen werden. Bei Morbus Wegener, eine granulomatöse Vaskulitis der kleinen Blutgefäße mit unbekannter Ätiologie, die den Autoimmunerkrankungen zugeordnet wird, ist die Bestimmung von Antineutrophile Cytoplasmatische Autoantikörper (ANCA) diagnostisch richtungsweisend. Auch bei rheumatologischen Systemerkrankungen haben Antikörper neben einem diagnostischen oft auch einen prognostischen Stellenwert. Antikörpertiter korrelieren zum Teil mit der Krankheitsaktivität und sollten in die Verlaufsbeurteilung einbezogen werden.

## **1.6 Immunthrombozytopenie**

### **1.6.1 Ätiologie und Epidemiologie**

Die Autoimmunthrombozytopenie (Morbus Werlhof, ITP) ist eine Autoimmunerkrankung, die durch eine isolierte, persistierende Thrombozytopenie mit weniger als  $100 \times 10^9$  Thrombozyten/l bei normaler Megakaryopoese gekennzeichnet ist (neue diagnostische Leitlinien zur ITP) (Laws, et al., 2009). Der Nachweis der isolierten Thrombozytopenie und der gleichzeitige Ausschluss anderer Ursachen eines Thrombozytenmangels gelten als Schlüssel zur klinischen Diagnose der Erkrankung (George, et al., 1996). Im Kindesalter stellt sich die ITP als akute Erkrankung von selbstlimitierendem Verlauf dar, nur ca. 20% der Kinder entwickeln eine chronische Verlaufsform. Meist tritt die ITP zwei bis drei Wochen nach einem viralen Infekt auf. Bei Erwachsenen beginnt die ITP hingegen ohne Vorzeichen, ein Zusammenhang mit äußeren Auslösern ist in der Regel nicht zu erkennen und der Krankheitsverlauf ist eher chronisch. Die Inzidenz der ITP bei Erwachsenen liegt bei 5,8-6,6 pro 100.000 und Jahr, wobei Frauen rund dreimal häufiger betroffen sind als Männer. Bei Kindern ist die Inzidenz mit 4,0-5,3 etwas niedriger. Das klinische Bild der ITP ist ausgesprochen variabel und reicht von asymptomatischen Patienten, bei denen im Rahmen

einer Blutbilduntersuchung eine Thrombozytopenie auffällt, über Patienten mit Petechien und Blutblasen bis hin zum offen blutenden Patienten, wobei Blutungen, außer bei schweren Verlaufsformen, insgesamt eher selten zu verzeichnen sind.

Der idiopathischen Form der ITP stehen die sekundären Formen gegenüber, die vor allem im Zusammenhang mit systemischem Lupus erythematodes, Antiphospholipidsyndrom, Lymphomen oder Infektionen auftreten (Cines, et al., 2002). Die primäre ITP ist eine spontane Autoimmunerkrankung, während die sekundäre Form durch verschiedene Erkrankungen ausgelöst werden kann. Beide Formen werden im Folgenden näher erläutert. In der Literatur werden unterschiedliche Bezeichnungen für ITP verwendet: idiopathische thrombozytopenische Purpura (Graf, et al., 1983), autoimmune thrombozytopenische Purpura (Karpatkin, et al., 1992) und immune Thrombozytopenie (McMillan, 2005). Nach wie vor gilt die Diagnose einer ITP als klassische Ausschlussdiagnose, da Unklarheit über die diagnostische Aussagekraft verschiedener potentiell hilfreicher Biomarker der Erkrankung besteht. Bei der Diagnose der ITP soll zwischen zwei Gruppen von Biomarkern unterschieden werden: Biomarker der Autoimmunreaktion (Leptin, freie und gebundene Autoantikörper gegen Thrombozyten, Nachweis spezifischer B-Lymphozyten) und Biomarker der Thrombopoese (Knochenmarkhistologie, Thrombopoietin, Glykocalicin, retikulierte Thrombozyten). Es zeigt sich, dass mehrere dieser Parameter mit großer Wahrscheinlichkeit diagnostisch wertvoll sind. Biomarker, die für einen solchen positiven Krankheitsnachweis eingesetzt werden können, lassen sich aus der Pathophysiologie der Erkrankung ableiten (Abb. 1-2, Seite 17)

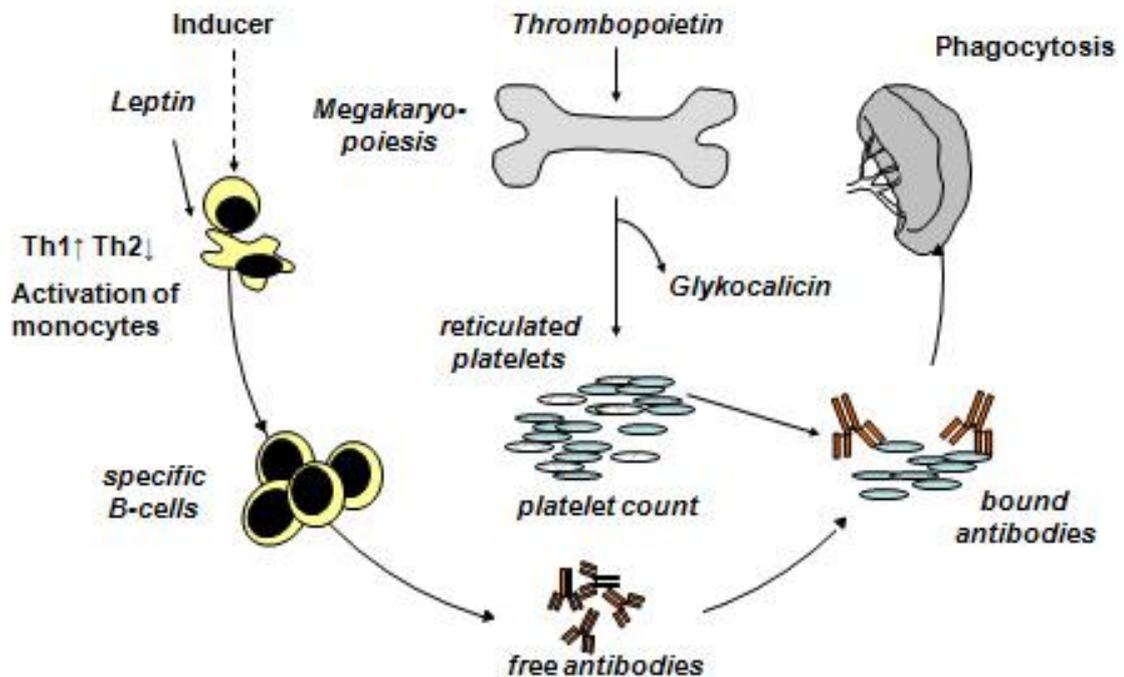


Abb. 1-2 Pathomechanismus der Autoimmunthrombozytopenie und daraus ableitbare Biomarker (nach Sachs UJ, Haemostaseologie 2008) (Sachs, 2008)

In dieser etwas vereinfachten Darstellung kommt es unter einer (bisher unbekannt) Beeinflussung der T-Zellantwort (mit Expansion oligoklonaler T-Zellen, einer Zunahme der Th1/Th2-Ratio, und dem Nachweis von T-Lymphozyten gegen thrombozytäre Glykoproteine) zur T-zellabhängigen Produktion thrombozytenreaktiver Antikörper. Diese Antikörper binden an die zirkulierenden Thrombozyten und bewirken ihren Abbau, hauptsächlich in der Milz, aber auch in der Leber, durch Phagozytose. In Folge des vermehrten Abbaus kommt es zum Abfall der Thrombozytenzahl im peripheren Blut. Die durch die Thrombozytopenie einsetzende Gegenregulation beeinflusst die Konzentration von Thrombopoietin im Blut, die Megakaryopoese im Knochenmark und die Ausschwemmung junger (retikulierter) Thrombozyten in das periphere Blut (Kaushansky, 1995; Kurata, et al., 2001).

---

## 1.6.2 Biomarker der Thrombopoese

### 1.6.2.1 Megakaryopoese und Thrombopoese

Eine konstante Thrombozytenzahl kann nur erreicht werden, wenn Thrombozytenbildung den Abbau und die Lyse ausgleichen. Durch den Plättchenverbrauch bei der ITP nehmen die Megakaryozyten an Masse und Volumen zu. Allerdings bleibt bei vielen ITP-Patienten die Produktion suboptimal (Kuter, 1996). Einige Oberflächenantigene werden sowohl auf Blutplättchen als auch auf Megakaryozyten exprimiert z.B. GPIIb/IIIa und GPIb/IX. Sie können von Autoantikörpern erkannt werden. Auf diese Weise kann die Megakaryopoese und folglich die Thrombozytenbildung beeinträchtigt werden (McMillan, et al., 1978; Van Leeuwen, et al., 1982; McMillan, 2000). Für die ineffektive Thrombopoese im Knochenmark von ITP-Patienten scheint eine erhöhte Apoptose oder andere Formen des programmierten Zelltodes verantwortlich zu sein. Ultrastrukturanalysen für Megakaryozyten bei ITP-Patienten zeigen, dass 80% der reifen Megakaryozyten Anzeichen einer Apoptose aufweisen. Diese Befunde legen nahe, dass die niedrige Produktionsrate an Blutplättchen bei ITP als Folge einer erhöhten Apoptose der plättchenbildenden Megakaryozyten ist (Houwerzijl, et al., 2004).

### 1.6.2.2 Knochenmarkuntersuchung

Die Untersuchung des Knochenmarks gilt häufig als mit ausschlaggebend für die Diagnose einer ITP. Die als „klassisch“ zu wertende Steigerung der Megakaryopoese wird jedoch häufig nicht angetroffen. Das Knochenmark vieler ITP-Patienten ist normozellulär, in Einzelfällen kann es sogar hypozellulär oder mit einer isoliert reduzierten Megakaryopoese imponieren. Je nach Studie liegt der Anteil der für ITP untypischen Befunde zwischen 5% und 13%. In Abwägung von Aufwand und Aussagekraft ist die Relevanz der Knochenmarkuntersuchung als positiver Krankheitsnachweis zumindest fraglich. Ihre Notwendigkeit wird nicht selten mit dem erforderlichen Ausschluss anderer, vor allem maligner Erkrankungen mit begleitender Thrombozytopenie, begründet. Für die ITP des Kindesalters liegen jedoch überzeugende Daten vor, die die Aussagekraft der Knochenmarkuntersuchung auch in dieser Hinsicht nachhaltig in Frage stellen. So hat die Untersuchung des Knochenmarks in einer retrospektiven Analyse die Diagnose bei 409 Kindern mit ITP in keinem Fall beeinflusst (Watts, 2004). In einer prospektiven Untersuchung führt die Knochenmarkuntersuchung sogar in 1,5% der Fälle zu einer Revision der klinischen Verdachtsdiagnose und damit zu einer Fehldiagnose (Halperin, et al., 1988).

Analysen von Kindern mit wichtigen Differentialdiagnosen, insbesondere mit akuter lymphatischer Leukämie und mit aplastischer Anämie, zeigen schließlich überzeugend, dass diese Erkrankungen ausnahmslos durch das periphere Blutbild von einer ITP unterscheiden werden können. Es ist also

nicht überraschend, dass Vergleichsberechnungen zu dem Ergebnis kommen, dass die Einbuße von 3,5 „quality adjusted life years“ (QALYs), die für ein Kind mit isolierter Thrombozytopenie anzusetzen sind, durch die Knochenmarkuntersuchung lediglich um irrelevante 4 Tagen verbessert werden (Klaassen, et al., 2001). Die Daten für Erwachsene mit ITP sind ähnlich ernüchternd: meist zeigt sich ein normales Knochenmark, vereinzelt werden zu dem Eisenmangel oder Hypozellularität beschrieben. Es scheint gerechtfertigt, dass die US-amerikanischen Expertenempfehlungen eine Beschränkung der Knochenmarkpunktion auf Patienten mit untypischen klinischen Befunden, Patienten über 60 Jahre und Patienten, die einer Splenektomie unterzogen werden sollen, vorsehen (George, et al., 1996). Als Biomarker für die ITP ist die Knochenmarkuntersuchung bei einem Großteil der Patienten nicht hilfreich, da der Nachweis einer gesteigerten Megakaryopoese im Sinne eines positiven Krankheitsnachweises nicht regelhaft gelingt. Die Knochenmarkuntersuchung behält jedoch einen relevanten Stellenwert zum Ausschluss von kritischen Differenzialdiagnosen, insbesondere bei älteren Patienten oder Patienten, die für eine ITP untypische Symptome oder Befunde zeigen.

### **1.6.2.3 Thrombopoietin**

Thrombopoietin (TPO) ist der Ligand des Protoonkogens *c-mpl* „cellular myeloproliferative leukemia protooncogene“, und wird in der Leber, der Niere sowie in den Stromazellen des Knochenmarks gebildet. Thrombopoietin ist ein ca. 78kDa großes Glykoprotein. Es besteht aus 332 bis 335 Aminosäuren. Ein Teil des Proteins (N-terminale Domäne) besitzt eine große Ähnlichkeit mit Erythropoietin, dem für die Herstellung von Erythrozyten (rote Blutkörperchen) notwendigen Hormon. Das Gen für Thrombopoietin befindet sich auf dem langen Arm des Chromosoms 3 (q26.3–27) (Foster, et al., 1995; Kato, et al., 1999; Kato, 2000). Es nimmt an verschiedenen Stellen Einfluss auf den Ablauf der Hämatopoese und wirkt dabei als Zytokin (Kaushansky, 1995). Neben dem Einfluss auf Megakaryozyten und der einhergehenden Bildung der Thrombozyten wirkt Thrombopoietin auf hämatopoetischen Stammzellen (De Sauvage, et al., 1994; Kaushansky, et al., 1994; Nakamura, et al., 2006). Die Bindung von Thrombopoietin an seinen Rezeptor, *cMpl*, auf hämatopoetischen Stammzellen und Megakaryozyten löst eine Reaktionskaskade aus, die zur Plättchenproduktion führt (Geddis, et al., 2002; Kaushansky, 2005). Die TPO-Konzentrationen bei Patienten mit ITP wurden an insgesamt mehr als 350 Patienten untersucht. In den meisten Studien fand sich dabei keine erhöhte TPO-Konzentration bei ITP-Patienten. In einigen Studien war die TPO-Konzentration bei ITP im Mittel signifikant höher als bei Gesunden, allerdings waren in diesen Untersuchungen bei einzelnen Patienten mit durch den Verlauf gesicherter ITP die Konzentrationen im Normbereich, zum Teil sogar auch erniedrigt. Es ist bewiesen worden, dass die

TPO-Konzentration bei ITP-Patienten im Normalbereich liegt oder einen leichten Anstieg anzeigt (Kosugi, et al., 1996; Aledort, et al., 2004; Kaushansky, 2005). Die Zusammenstellung dieser Daten zeigt, dass die Bestimmung von TPO diagnostisch nicht hilfreich ist, da der einzelne TPO-Wert eines Patienten ohne Aussagekraft im Hinblick auf eine ITP ist.

### **1.6.2.4 Glykocalicin**

Glykocalicin (GC) wird von der langen Kette des von-Willebrand-Rezeptors der Thrombozyten, Glykoprotein Ib $\alpha$ , abgespalten und ist im Plasma nachweisbar. Als mögliches Maß für den Thrombozytenumsatz wurde GC in den 1980er Jahren beschrieben (Steinber, et al., 1987). Studien an relativ kleinen Kollektiven von ITP-Patienten zeigen, dass die GC-Konzentration bei Patienten mit ITP nur geringfügig erhöht ist oder sich von der GC-Konzentration bei Gesunden gar nicht unterscheidet.

Im Gegensatz zur GC-Konzentration scheint das Verhältnis von GC-Konzentration zu aktueller Thrombozytenzahl (der so genannte GC-Index) eine bessere Diskriminierung zwischen Patienten mit und ohne ITP zu erlauben. Von 61 Patienten mit aktiver ITP lag der GC-Index nur bei zwei Patienten (3%) im selben Bereich wie der GC-Index von Patienten mit inaktiver ITP (Beer, et al., 1994). Zwar zeigten sich in Folgestudien größere Überlappungen, allerdings waren die Kollektive häufig unzureichend charakterisiert. Gegenwärtig ist nicht auszuschließen, dass der GC-Index als Biomarker der ITP diagnostische Relevanz besitzt. Größere Studien bleiben abzuwarten.

### **1.6.2.5 Retikulierte Thrombozyten**

Wenn die Freisetzung von Thrombozyten aus dem Knochenmark gesteigert ist, nimmt der Anteil unreifer Thrombozyten an der Gesamtpopulation der freien Thrombozyten zu. Diese tragen mehr RNA als reife Thrombozyten. Die angefärbte RNA zeigt eine netzartige Struktur, was zur Bezeichnung retikulierte Thrombozyten führte. Der Anteil retikulierter Thrombozyten bei Patienten mit Thrombozytopenie und gleichzeitig normaler oder gesteigerter Megakaryopoese liegt im Mittel deutlich über dem bei Gesunden. In einer ersten Studie waren bei Gesunden zwischen 2,8% und 15,5% der Thrombozyten retikuliert, während es bei ITP-Patienten 13,5–51,1% waren, bei nur geringer Überlappung zwischen beiden Gruppen (Kienast, et al., 1990). In nachfolgenden Arbeiten zeigten allerdings zwischen 17% und 35% der ITP-Patienten einen ebenso großen Anteil retikulierter Thrombozyten wie die Kontrollgruppen. Die aktuelle Studienlage bei Erwachsenen lässt nur den Schluss zu, dass der Anteil retikulierter Thrombozyten bei ITP zwar im Mittel erhöht ist, ein Einzelwert aber keine Unterscheidung zwischen Patienten mit aktiver ITP und solchen mit ITP in partieller Remission, mit aplastischer Anämie oder mit Gesunden erlaubt. Bei Kindern mit

ITP ist der Anteil retikulierter Thrombozyten ebenfalls deutlich erhöht. In den bislang untersuchten kleinen Studienkollektiven ließen sich die Kinder mit ITP aufgrund dessen sicher von Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie oder Gesunden unterscheiden. Allerdings stehen auch hier größere Studien aus.

### **1.6.3 Biomarker der Immunreaktion**

#### **1.6.3.1 Leptin**

Über die auslösenden Mechanismen der ITP ist das Wissen bruchstückhaft. Zumindest bei Kindern verläuft die ITP mit Zeichen einer Th1-Autoimmunantwort, erkennbar u. a. an erhöhten IL-2- und IFN $\gamma$ -Konzentrationen bei gleichzeitig erniedrigtem IL-4. Bekannt ist, dass der Botenstoff Leptin die Immunreaktion von Th1-Zellen unterhält und die Proliferation naiver T-Zellen kostimulieren kann (Lord, et al., 1998). Die Untersuchungen zur Leptinkonzentration im Blut von erwachsenen ITP-Patienten zeigen erhöhte Werte im Vergleich zu Gesunden, eine negative Korrelation der Leptinkonzentration mit der Thrombozytenzahl und eine positive Korrelation zwischen der Leptinkonzentration und thrombozytenassoziiertem IgG. Eine aktuelle Studie an 39 Kindern mit ITP konnte allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Gesunden belegen (Kose, et al., 2007). Die weitere Entwicklung bleibt abzuwarten. Aufgrund seiner biologischen Wirkung ist davon auszugehen, dass Leptin nicht spezifisch nur bei ITP-Patienten erhöht sein dürfte. Unwahrscheinlich ist, dass Leptin als Biomarker der ITP diagnostische Relevanz erlangt.

#### **1.6.3.2 Freie und gebundene Autoantikörper gegen Thrombozyten**

Das pathologische Prinzip der ITP ist der gegen Thrombozyten gerichtete Autoantikörper. Antikörper können frei im Serum (freier Autoantikörper) oder gebunden an Thrombozyten (gebundener Autoantikörper) nachgewiesen werden. Ursprüngliche diagnostische Verfahren konzentrierten sich auf den Nachweis der Gesamtimmunglobuline auf Thrombozyten (platelet associated IgG, PAIgG). Bei den Testverfahren wurden neben den Autoantikörpern auch gespeichertes IgG in den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten, auf Fc-Rezeptoren immobilisiertes IgG und unspezifisch an die Thrombozytenoberfläche immobilisiertes IgG nachgewiesen. Nicht überraschend variiert die Sensitivität des PAIgG-Nachweises laut Studien zwischen 59,5% und 74% und die Spezifität zwischen 19% und 74%. Auch die Menge des pro Thrombozyt nachgewiesenen IgG variiert (je nach Nachweisteknik) beachtlich zwischen 0,02 und 400fg/Thrombozyt. Dies unterstreicht die Unzuverlässigkeit dieses Ansatzes, der falsche positive Ergebnisse (Chong, et al., 2000) u. a. bei Patienten mit Leukämie, mit myelodysplastischem Syndrom oder mit multiplem Myelom und nicht zuletzt bei Patienten mit chronischen Lebererkrankungen lieferte. Eine erheblich

bessere Spezifität bringt der Nachweis von Antikörpern auf Thrombozyten, die gegen die Hauptzielantigene der ITP, die Glykoproteinkomplexe IIb/IIIa und Ib/IX, gerichtet sind. Die Spezifität dieser Verfahren, deren wichtige Vertreter der MAIPA und der Immunobead-Assay sind, liegt bei 78% bis 100%. Da Autoantikörper gegen Thrombozyten einen zentralen Krankheitsmechanismus der ITP darstellen, sollte ihr spezifischer Nachweis diagnostisch relevant sein. Doch ihre Bedeutung wird angezweifelt (George, et al., 1996), da die Sensitivität von 38,9% bis 56,4% als unbefriedigend gilt. Die Frage, warum die Sensitivität so niedrig ist, ist unzureichend geklärt. Aus immunologischer Sicht wird diskutiert, ob eine Ausweitung der Zielantigene (insbesondere auf die Antigene der Glykoproteine V, Ia/IIa, VI und CD62), die Erfassung weiterer Antikörperklassen (IgM, IgA) oder der Einsatz verschiedener immobilisierender Antikörper dazu beitragen kann, die Sensitivität zu verbessern. Das letztgenannte Argument wird unter der Vorstellung eingebracht, dass der monoklonale, an die Testplatte gebundene Antikörper zur Immobilisierung des Glykoproteins (GP) mit den nachzuweisenden Autoantikörpern um die Bindungsstelle am Antigen konkurriert. Mehrere Studien zeigen, dass Antikörper, die nicht gegen GPIIb/IIIa oder GPIb/IX gerichtet sind, nur selten als alleinige Entität, sondern meist begleitend zu klassischen Autoantikörpern vorliegen. Ebenso werden IgA- und IgM-Antikörper meist zusammen mit IgG-Antikörpern nachgewiesen (Chong, et al., 2000), so dass die Ausweitung der Antikörpernachweisverfahren auf zusätzliche Antigene und weitere Antikörperklassen nur geringe Verbesserungen der Sensitivität erwarten lässt. Das gilt ebenso für weitere immobilisierende Antikörper. Relevant sein könnte, ob unter Testbedingungen nur Antikörper von der Thrombozytenoberfläche nachgewiesen werden oder auch Antikörper aus dem Thrombozyteninneren (mit)erfasst werden. Auch hier ergaben Vergleiche nur geringe Sensitivitätsunterschiede (Chong, et al., 2000). Waschschritte könnten eine Rolle spielen, da sie die Dissoziation des Autoantikörpers während des Tests begünstigen, was die Sensitivität beeinträchtigen könnte (Bakchoul, et al., 2007). Die Testverfahren zum Nachweis gebundener Autoantikörper werden zusätzlich in ihrer Anwendbarkeit eingeschränkt: von Patienten mit sehr niedrigen Thrombozytenzahlen können oft nicht ausreichend Zellen für den Test isoliert werden. Der Nachweis freier Autoantikörper ist zurzeit keine Alternative, denn bei nur rund 10% der ITP-Patienten sind freie Autoantikörper gegen GPIIb/IIIa und/oder GPIb/IX mit GP-spezifischen Tests nachweisbar (Kiefel, et al., 1996). Autoantikörper gegen Thrombozyten sind Biomarker mit diagnostischer Relevanz, die verbreitet anerkannt wird (Chong, et al., 2000; McMillan, 2005). Aufgrund der hohen Spezifität kann ihr Nachweis die ITP-Diagnose sichern, jedoch aufgrund der niedrigen Sensitivität kann ihren fehlenden Nachweis die Diagnose aber nicht ausschließen. Neben der unmittelbaren Relevanz für die ITP-Diagnose ergeben sich erste Hinweise auf eine prognostische und therapeutische Relevanz der Antikörperbestimmung.

So haben ITP-Patienten mit positivem Autoantikörpernachweis eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit für eine klinische Verschlechterung als ITP-Patienten ohne Antikörpernachweis (Fabris, et al., 2004). Tierexperimente legen nahe, dass Antikörper gegen GPIb/IX mit einem schlechteren Ansprechen auf Immunglobuline assoziiert sein könnten als Antikörper gegen GPIIb/IIIa (Webster, et al., 2006). Die weitere Entwicklung bleibt abzuwarten.

### **1.6.3.3 Autoantikörper unterdrücken die Megakaryopoese**

Chang und Mitarbeiter konnten zeigen, dass im Plasma von ITP-Patienten mit Antikörpern gegen GPIb und GPIIb/IIIa die Megakaryopoese *in vitro* massiv unterdrückt wird. Sie vermuten, dass antithrombozytäre Antikörper die Reifung oder sogar das Überleben der Megakaryozyten verhindern (Chang, et al., 2003).

McMillan untersuchte die Wirkung von ITP-Patienten stammendem Plasma auf die Megakaryozytenbildung der CD34<sup>+</sup>-Zellen von gesunden Probanden. Die *in vitro* Megakaryozytenbildung hat sich erheblich verringert. Bei 12 von 18 ITP-Patienten hat sich die Megakaryozytenbildung verringert, wenn das anti GPIIb/IIIa, anti GPIb/IX oder beide enthaltende Plasma den CD34<sup>+</sup>-Zellen zugefügt wurde (McMillan, et al., 1987).

### **1.6.3.4 Spezifische B-Lymphozyten**

Zahlreiche Glykoproteine (GP) auf der Thrombozytenoberfläche konnten bisher als Antigene identifiziert werden, die mit Autoantikörpern reagieren. Das häufigste Ziel vieler Autoantikörper stellen der Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa und der von-Willebrand-Faktor-Rezeptor GPIb/IX dar (He, et al., 1994; Wadenvik, et al., 1998). Seltener sind Autoantikörper gegen GPIV, GPV oder den Kollagenrezeptor GPIa/IIa gerichtet (He, et al., 1994; Cines, et al., 2002). Typischerweise weist ein Großteil der Patienten gleichzeitig Antikörper gegen verschiedene Antigene auf (He, et al., 1994). Diese multiplen Antigenespezifitäten entstehen möglicherweise im Rahmen des so genannten Epitope-Spreading. Dabei werden antikörperbesetzte Thrombozyten durch antigenpräsentierende Zellen phagozytiert und anschließend abgebaut. Neben der Freilegung des primären Antigens können hierbei auch ursprünglich verborgene Epitope freigelegt und präsentiert werden. Somit wird nicht nur die initiale Immunreaktion verstärkt, sondern zusätzlich die Produktion von Autoantikörpern gegen weitere Antigene angeregt (Cines, et al., 2002). Bisher konnte weder für bestimmte Antikörperklassen oder Antikörpermengen noch für bestimmte Antigenespezifitäten eine eindeutige Korrelation mit dem Ausmaß der Thrombozytenzerstörung nachgewiesen werden (Cines, et al., 1985; George, et al., 1990; Georg, et al., 2001).

Normale Thrombozyten weisen auch ohne das Vorliegen einer immunologischen Erkrankung eine große Anzahl IgG-Moleküle auf. Diese befinden sich zu mehr als 99% in den intrazellulären alpha-Granula. Obwohl bei ITP-Patienten eine Erhöhung der thrombozytären IgG-Menge beobachtet werden kann, steht sie in keinem Zusammenhang mit dem Vorhandensein antithrombozytärer Autoantikörper. Vielmehr beruht die Zunahme der IgG-Moleküle auf einer gemeinhin kompensatorisch gesteigerten Thrombopoese, die zum vermehrten Vorliegen junger, großer Thrombozyten führt, die über eine entsprechend größere Anzahl alpha-Granula verfügen. Daher findet sich eine IgG Vermehrung ebenso bei Thrombozytopenien nicht-immunologischer Genese, die mit einer peripheren Thrombozytenzerstörung einhergehen, nicht jedoch bei Störungen der Thrombopoese (George, et al., 1990; Georg, et al., 2001). Weniger als 1% der thrombozytären IgG-Moleküle befindet sich auf der Zelloberfläche. Eine Erhöhung dieser Fraktion wiederum reflektiert im Allgemeinen tatsächlich das Vorliegen antithrombozytärer Antikörper (George, 1990). Obgleich IgG den überwiegenden Anteil der Autoantikörper darstellt, können in vielen Fällen auch IgM und IgA detektiert werden (Cines, et al., 1985; He, et al., 1994; Wadenvik, et al., 1998; Coopamah, et al., 2003). Gelegentlich finden sich mehrere Antikörperklassen gleichzeitig (He, et al., 1994; Wadenvik, et al., 1998). Durch die Bindung von AK an die Glykoproteine der Thrombozytenmembran werden diese somit markiert (Opsonization), an Fcγ-Rezeptor auf Makrophagen des RES gebunden und aus der Zirkulation eliminiert. Die komplementvermittelte Lyse nach der Antikörperbindung spielt hier auch eine wichtige Rolle (Kravitz, et al., 2005). Nach der Aufnahme und Abbau der Thrombozyten, exprimieren Makrophagen Plättchen-Epitope an ihre Oberfläche und setzen Zytokine frei, die ihrerseits die Stimulation der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen auslösen (Cines, et al., 2002; Roark, et al., 2002). Besonders bei ITP erkennen autoreaktive CD4<sup>+</sup>-T-Zellen verschiedene Epitope auf GPIIb/IIIa, was zur Verstärkung der autoimmunen Reaktion führt und den Thrombozytenabbau beschleunigt. Wie die Antikörperreaktion ausgelöst wird ist noch nicht geklärt. Fest steht aber, dass autoreaktive T-Helferzellen, die mit Antikörper produzierten B-Zellen reagieren, daran beteiligt sind (Kuwana, et al., 2005).

Thrombozytäre Antikörper wurden in 50%-70% der ITP-Patienten nachgewiesen (Van Leeuwen, et al., 1982; Kiefel, et al., 1996). Es sei hier betont, dass die gegenwärtig verfügbaren Nachweismethoden in ihrer Sensitivität oder Spezifität oder in beiden Parametern mit Einschränkungen behaftet sind (McMillan, et al., 1987; Kiefel, et al., 1996; Fabris, et al., 2004). Es ist auch nicht auszuschließen, dass andere Mechanismen mit involviert sind. Ein quantitativer Test zum Nachweis unspezifischer, an Thrombozyten gebundener IgG ist nur bei 46% der ITP-Patienten positiv und könnte für den Nachweis von Antikörper bei anderen Erkrankungen angesetzt werden (Kelton, et al., 1982). Spezifische B-Lymphozyten können bei der ITP im Elispot-Assay

nachgewiesen werden. In einer Studie an 88 ITP-Patienten zeigten 84% eine erhöhte Zahl an B-Zellen, die Antikörper gegen GPIIb/IIIa produzierten. Doch in der Kontrollgruppe waren bei nur 42% reaktive B-Zellen nachweisbar (Kuwana, et al., 2006). Das Verfahren scheint weder die Sensitivität noch die Spezifität im Vergleich zum Nachweis von Autoantikörpern zu verbessern. Die Methode ist jedoch zu neu, um abschließend beurteilt zu werden.

#### **1.6.3.5 Störung der zellulären Immunität: Rolle der autoreaktiven T-Zellen**

Viele Indizien sprechen dafür, dass  $CD4^+$ -Th-Zellen die autoreaktive B-Zellantwort mitbestimmen. Als Antwort auf, von  $CD4^+$ -Th-Zellen stammende Signale, bilden B-Zellen Antikörper, die gegen normale Blutplättchenantigene gerichtet sind (Kuwana, et al., 2005).  $CD4^+$ -Th-Zellen, die gegen GPIIb/IIIa gerichtet sind, wurden bei ITP-Patienten nachgewiesen. Wie es zu einer Störung der regulatorischen Funktionen kommt, ist bis dato nicht geklärt. Auch wenn die native Form von GPIIb/IIIa keine T-Zellantwort auslöst, konnten im Blut der ITP-Patienten sowohl anti-GPIIb/IIIa-Antikörper als auch zirkulierende B-Gedächtniszellen nachgewiesen werden, die Antikörper bilden (Kuwana, et al., 2005). Autoreaktive T-Zellen wurden auch bei Gesunden identifiziert, scheinen aber nur bei Patienten mit autoimmunen Erkrankungen aktiv zu sein. Dieses Phänomen wird damit erklärt, dass das Epitopspektrum, in welchem Autoantigene normalerweise vom Immunsystem unterdrückt werden, in höhere Konzentration präsentiert wird. Auf diesem Weg können bei ITP-Patienten Epitope innerhalb GPIIb- und GPIIIa-Moleküle eine Antwort hervorrufen. Zytokine, die bei ITP-Patienten von  $CD4^+$ -Zellen gebildet werden, stimmen mit denen, die die Th-Zellen aktivieren, überein. Bei ITP-Patienten wird vorwiegend Th1-Antwort festgestellt. Diese Antwort ist bei vielen organspezifischen autoimmunen Erkrankungen bekannt (Semple, et al., 1996). Eine Zunahme der Th1-Th2-Ratio, sowie der Genexpression von  $INF-\gamma$  und  $IL-2R\beta$  ist bei ITP-Patienten nachgewiesen (Olsson, et al., 2003).

#### **1.6.3.6 T-Zellvermittelte Zytotoxizität**

$CD3^+$ Lymphozyten weisen bei ITP-Patienten einen höheren Anstieg der Genexpression bestimmter zytotoxischer Gene, u.a. der Tumornekrosis Faktor, Perforin, Granzyme A und Granzyme B, auf (Olsson, et al., 2003; Zhang, et al., 2006).

Werden Blutplättchen von ITP-Patienten *in vitro* mit  $CD3^+CD8^+$ -T-Effektorzellen inkubiert, werden sie lysiert. Dagegen führt die Inkubation mit  $CD3-CD16^+CD56^+$  natürliche Killerzellen nicht zur Lyse der Plättchen (Gernsheimer, 2002).

Megakaryozyten werden bei ITP von autologen  $CD8^+$ -T-Zellen zerstört (Li, et al., 2007). Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass zytotoxische T-Zellen, wenn auch nicht bei allen ITP-

Patienten, eine Rolle spielen. Ein therapeutischer Ansatz, der darauf abzielt, die autoreaktive Antwort nach unten zu regulieren, könnte als effektive Strategie der ITP-Behandlung in Betracht kommen.

#### **1.6.3.7 Aktivität der natürlichen Killerzellen**

In Patienten mit aktiver ITP wurde eine erhöhte Anzahl natürlicher Killerzellen vor allem CD56<sup>+</sup>CD3-NK-Zellen und CD56<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen nachgewiesen (Garcia-Suarez, et al., 1993). Auch wenn noch spekulativ, bringen diese Untersuchungen den Nachweis mit, dass an der Pathogenese der ITP NK-Zellen mit involviert sein könnten.

#### **1.6.3.8 Kombination von ITP-Biomarkern**

Nur selten wurde untersucht, ob die Aussagekraft – und damit die diagnostische Relevanz – der erwähnten Biomarker durch Kombination verbessert werden kann. Eine Arbeit an 1700 thrombozytopenen Patienten weist der Bestimmung der retikulierten Thrombozyten eine Sensitivität für die Diagnose einer Hyperdestruktion von 85% und eine Spezifität von 86% zu. Für die Kombination aus retikulierten Thrombozyten und TPO-Konzentration liegen diese Kennwerte bei 69% bzw. 100% (Kurata, et al., 2001). Eine größere Multizenterstudie legt nahe, dass die Kombination aus Biomarkern, darunter anti-GPIIb/IIIa-produzierende B-Lymphozyten, gebundene gegen GPIIb/IIIa gerichtete Autoantikörper, retikulierte Thrombozyten und TPO-Konzentration im Plasma bei sehr hoher Spezifität (98%) auch eine gute Sensitivität (79%) erreicht (Kuwana, et al., 2006).

#### **1.6.3.9 Schlussfolgerung**

Die Diagnose einer Autoimmunthrombozytopenie als reine Ausschlussdiagnostik ist umstritten. Aus den Pathomechanismen lassen sich einige Biomarker ableiten, denen diagnostische Relevanz im Sinne eines positiven Krankheitsnachweises zukommen kann. Jüngste Entwicklungen zeigen, dass insbesondere eine verbesserte Autoantikörperdiagnostik zentrale Bedeutung haben könnte, zumal prognostische und therapeutische Konsequenzen mit dem Nachweis von Autoantikörpern verknüpft zu sein scheinen. Auf der anderen Seite sind Biomarker, die mit der Thrombopoese bei der ITP in Verbindung stehen, interessante, z. T. technisch einfach und preisgünstig zu bestimmende Parameter, deren Potenzial für die ITP-Diagnostik noch nicht ausgeschöpft ist.

### **1.6.4 Klinik und Diagnose**

Die US-amerikanischen und britischen Leitlinien zur ITP fokussieren die Diagnostik auf das klinische Bild (George, et al., 1996). Damit wird die Diagnose der ITP zu einer reinen

Ausschlussdiagnose, die darauf basiert, dass weder die klinische Untersuchung noch die ergänzend durchgeführte, orientierende Labordiagnostik Hinweise auf eine andere Erkrankung, die mit einer Thrombozytopenie einhergeht, ergeben. Das Ausmaß der Symptome hängt im Wesentlichen von der Thrombozytenzahl ab. Während Patienten mit mehr als 50.000 Thrombozyten/ $\mu\text{l}$  oft asymptomatisch sind, finden sich bei niedrigeren Thrombozytenzahlen gehäuft Blutungszeichen. Typisch sind Petechien und Purpura der abhängenden Körperpartien, konjunktivale und gingivale Blutungen, Epistaxis und Menorrhagie. Ab einer Thrombozytenzahl von weniger als 10.000/ $\mu\text{l}$  steigt darüber hinaus das Risiko innerer Blutungen. Intrazerebrale Blutungen sind zwar selten, stellen aber die häufigste Todesursache der ITP dar (Georg, et al., 2001; Cines, et al., 2002). Dabei scheinen ältere Patienten bei äquivalenten Thrombozytenzahlen ein höheres Risiko für hämorrhagische Komplikationen zu haben. Eine Splenomegalie ist vor allem für erwachsene Patienten eher untypisch. Bei Kindern wird bis zu 12% der Fälle eine vergrößerte Milz beschrieben, wobei jedoch auch gesunde Kinder häufiger eine vergrößerte Milz aufweisen (George, et al., 1996; Georg, et al., 2001). Die Diagnosestellung der ITP basiert in erster Linie auf der Abwesenheit möglicher anderer Ursachen einer Thrombopenie. Unter anderem müssen die Differentialdiagnosen, hereditäre Thrombopenie, heparininduzierte Thrombopenie, Hypersplenismus, myelodysplastisches Syndrom, neonatale alloimmune Thrombopenie, posttransfusionelle Purpura und thrombotisch-thrombozytopenische Purpura, ausgeschlossen werden (George, et al., 1996; Georg, et al., 2001; Cines, et al., 2002). Aufgrund des Fehlens eines ITP-spezifischen Befundes werden Notwendigkeit und Aussagekraft der üblichen Labordiagnostik und klinischapparative Untersuchungen nach wie vor unterschiedlich bewertet (George, et al., 1996). Das Blutbild ist abgesehen von einer Thrombopenie zumeist unauffällig. Gegebenenfalls kann blutungsbedingt zusätzlich eine Anämie auftreten (Cines, et al., 2002). Differentialdiagnostisch muss in diesem Fall ein Evans-Syndrom ausgeschlossen werden, in dessen Rahmen antithrombozytäre, antierythrozytäre und gelegentlich auch antigranulozytäre Antikörper auftreten (Packman, 2001). Bei der Knochenmarkpunktion, die derzeit nur bei Patienten jenseits des 60. Lebensjahres sowie vor einer Splenektomie indiziert ist, ergibt sich gewöhnlich ein unauffälliges Bild oder eine erhöhte Megakaryozytenzahl als Zeichen verstärkter Thrombopoese (George, et al., 1996; Cines, et al., 2002). Nur selten findet sich eine verminderte Zahl an Megakaryozyten. Im Vergleich zur Diagnostik der Autoimmunhämolytische Anämie (AIHA) wird der Nachweis von Autoantikörper mit dem Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigens (MAIPA-Test) unterschiedlich bewertet. Mit dem MAIPA-Test können glykoproteinspezifische Antikörper mit hoher Spezifität nachgewiesen werden. Jedoch ist die Sensitivität des Tests mit 49-66% so niedrig, dass die Diagnose einer ITP bei negativem Ergebnis nicht ausgeschlossen werden kann (Cines, et al., 2002).

### **1.6.5 Therapie und Verlauf**

Ziel der Therapie ist es, eine Thrombozytenzahl zu erreichen, die eine adäquate Hämostase sichert. Hierfür müssen nicht notwendigerweise normale Thrombozytenzahlen angestrebt werden. Asymptomatische Patienten mit milder bis moderater Thrombopenie können deshalb zunächst ohne Therapie unter Beobachtung bleiben (George, 1990; Georg, et al., 2001).

### **1.6.6 Therapie**

Seit den 1960er Jahren ging man davon aus, dass mit dem Absinken der Thrombozytenzahl unter 20.000/ $\mu$ l das Blutungsrisiko stark ansteigt und dass bei Unterschreiten dieses Wertes besondere Maßnahmen getroffen werden müssen. Dieser Schwellenwert war in Untersuchungen an Leukämiepatienten erhoben worden und wurde auch auf andere Formen von Thrombozytopenien übertragen. Erst in den 1990er Jahren konnte dieses Paradigma aufgelöst werden. Es gibt keinen festen Schwellenwert, ab dessen Unterschreitung behandelt werden muss. Vielmehr sollte bei der Therapieentscheidung mit einbezogen werden, ob der Patient leicht oder stark blutet, ob er Risikofaktoren hat (Hochdruck, Fieber, Sport, Alter, etc.) und wie er bisher mit niedrigen Thrombozytenwerten gelebt hat (Winkelmann, et al., 1987).

#### **1.6.6.1 Glukokortikoide und Dexamethasone**

Glukokortikoide sind das Mittel der Wahl bei der Therapie der ITP. Sie hemmen die Synthese von Zytokinen (Interleukin 1 und 2), die an der Aktivierung von Lymphozyten beteiligt sind. Dabei wirken sie bevorzugt auf T-Lymphozyten, wodurch ihre immunsuppressive Wirkung vor allem auf zellulärer Ebene abläuft (Kitchens, et al., 1986). Die verminderte AK-Produktion durch B-Lymphozyten erfolgt indirekt durch eine Verringerung der AG-präsentierenden Zellen und einer verminderten T-Helferzell-Antwort. Weiterhin reduzieren Glukokortikoide die Rezeptoranzahl für Ig auf der Makrophagenoberfläche und verringern die Fc-vermittelte Phagozytose durch Stabilisierung lysosomaler Membranen. Sie verhindern die Chemotaxis und die Entstehung von Prostaglandinen und Leukotrienen. Nach Karpatkin entspricht die Anwendung von Glukokortikoiden einer „medikamentösen Splenektomie“, da sie die Sequestrierung von geschädigten und antikörperbeladenen Plättchen in der Milz durch das mononukleäre Phagozytosesystem verhindern (Karpatkin, 1980).

Bei Patienten mit einer chronischen ITP beginnt man mit einer Dosierung von 1 mg/kg/Tag (Georg, et al., 2001). Ungefähr 70% der Patienten erreichen innerhalb von 7-14 Tagen Plättchenzahlen von oder über 50.000/ $\mu$ l. Liegen die Thrombozytenzahlen nach 4 Wochen immer noch unter 50.000/ $\mu$ l oder haben sie nach 6 Wochen den Normbereich noch nicht erreicht, sollten andere

Therapiemöglichkeiten in Erwägung gezogen werden. Bei Ansprechen auf die Therapie wird auch hier die Dosierung über Wochen reduziert (Georg, et al., 2001). Nebenwirkungen, die bei der Gabe von Glukokortikoiden auftreten können, sind u.a. Polyurie, Polydipsie, Polyphagie, Gewichtszunahme, Alopezie, Hyperpigmentation, Pankreatitis, Hypertension, Magengeschwüre, Steroidhepatopathie. Wenn die Thrombozytopenie auf Prednison nicht anspricht, kann ein Versuch mit hochdosiertem Dexamethasone 40 mg/Tag p.o. für 4 Tage alle 4 Wochen (bis zu 6 Zyklen) unternommen werden. Die anfänglich publizierten guten Ansprechraten mussten jedoch nach unten korrigiert werden. Neuere Untersuchungen finden, dass nur 40% der auf Prednison refraktären Patienten mit hochdosiertem Dexamethasone partielle Remissionen erreichen (Borst, et al., 2004).

Dexamethasone (9-Fluor-16 $\alpha$ -methylprednisolon), ist ein künstliches Glukokortikoid, welches entzündungshemmend auf das Immunsystem wirkt. Es gehört zu den langwirkenden Glukokortikoiden und besitzt keine relevante mineralokortikoide Wirkung. In einer Studie berichten Anderson et al. über die Verabreichung höherer Dosen von Dexamethasone an 10 Erwachsene mit chronischer ITP. Die Patienten unterzogen sich verschiedenen Therapien, u.a. der Splenektomie. Eine langandauernde Antwortrate von 100% wurde erzielt (Andersen, 1994). Diese viel versprechenden Ergebnisse konnten bei Kindern mit chronischer ITP nicht reproduziert werden. In den meisten Studien zeigte nur eine Minorität der Patienten eine lang anhaltende Antwort, die mit vielen Nebenwirkungen verbunden ist (Bode, et al., 1996).

### **1.6.6.2 Ciclosporin**

Ciclosporin ist ein wasserunlösliches Peptid, das die Bildung von Lymphokinen (v.a. Interleukin-2) hemmt, die bei der Aktivierung von T-Lymphozyten gebildet werden. Dadurch wird die Proliferation von aktivierten T-Helferzellen und zytotoxischen T-Lymphozyten verhindert. Vor allem die zelluläre Immunreaktion wird unterdrückt, die Antikörperbildung wird dagegen nicht beeinflusst (Deters, et al., 2001). Die Angaben über die Dosierung zur Behandlung einer chronischen ITP variieren: 6mg/kg/Tag oral, verteilt auf zwei Dosen oder 10mg/kg 2x täglich oral (Kappers-Klunne, et al., 2001). Nach Kappers-Klunne und Van't Veer kann Ciclosporin bei einer Subgruppe von Menschen mit chronischer ITP hilfreich sein, die sich Rezidive nach Therapie mit Glukokortikoiden und Splenektomie zeigten. Die Behandlung ist beim Menschen jedoch mit einer hohen Toxizität verbunden und die Erfolgsrate scheint im Vergleich zu anderen Behandlungsmethoden nicht höher zu sein.

### 1.6.6.3 Azathioprin

Azathioprin ist ein zytotoxisches Immunsuppressivum, das in der Leber in 6-Mercaptopurin umgewandelt wird. Der Wirkstoff hemmt die Biosynthese von Purinnukleotiden und stört die Funktion der DNA und RNA, nachdem es als Baustein eingebaut wurde. Es hemmt vor allem die zelluläre Immunreaktion, da es eine stärkere Wirkung auf T- als auf B-Lymphozyten besitzt (Deters, et al., 2001). In der Humanmedizin werden folgende initialen Dosierungen mit oraler Verabreichungsform beschrieben: 1,5-3mg/kg/Tag (Deters, et al., 2001), 1-4mg/kg/Tag (Berchtold, et al., 1989). Das Ansprechen auf die Therapie wird beim Menschen als langsam beschrieben und kann 3-6 Monate dauern (Berchtold, et al., 1989). Nach Bussel und Cines erreichen 20-40% der Patienten mit diesem Immunsuppressivum eine komplette Remission (Cines, et al., 2000). Da die Biotransformation des Azathioprins in der Leber erfolgt, sollte es nicht bei Leberinsuffizienz eingesetzt werden, weil dadurch der immunsuppressive Effekt reduziert wird. Beschriebene Nebenwirkungen sind Knochenmarkdepression, gastrointestinale Störungen, Pankreatitis, Hepatotoxikosen und Infektionen.

### 1.6.6.4 Vincristin

Die zytotoxische Aktivität der Vinca-Alkaloide basiert auf ihrer Eigenschaft, sich an das Zytoskelettprotein Tubulin zu binden und die Polymerisation zu Mikrotubuli und damit die Ausbildung des Spindelapparates zu blockieren. Mit dieser Eigenschaft hemmen sie die Zellteilung in der Metaphase (Schnittler, et al., 2001). Die verminderte Phagozytose der Plättchen durch Makrophagen ist auf die Blockade des Zusammenbaus der Mikrotubuli zurückzuführen. Vincristin kann die Thrombozytenzahl zudem erhöhen, indem es die Thrombopoese stimuliert. Die Fähigkeit der Vinca-Alkaloide, eine Thrombozytose zu verursachen, ist dosisabhängig. Eine niedrige Dosierung (0,02mg/kg KG) ist am effektivsten. Höhere Dosierungen können Knochenmarkdegeneration und Thrombozytopenie verursachen. In der Humanmedizin wurden früher zur Therapie vincristinbeladene Plättchen bei Patienten mit ITP eingesetzt. Vincristinbeladene Thrombozyten dienen als Zielscheibe für Makrophagen. Nachdem sie phagozytiert werden, kommt es zur Dysfunktion oder zum Tod der Makrophagen und damit zu einer verminderten Zerstörung der Thrombozyten (Berchtold, et al., 1989). In der Humanmedizin wird eine wöchentliche Bolusbehandlung in einer Dosierung von 0,02mg/kg i.v. über 4-6 Wochen vorgenommen (Berchtold, et al., 1989). Nebenwirkungen, die mit der Gabe von Vincristin assoziiert sind, kommen selten vor. Beschrieben sind Erbrechen, Durchfall, Nekrosen, Alopezie und Leukopenie. Seltener kommt es zu peripheren Neuropathien (Berchtold, et al., 1989). Im Allgemeinen sind die Erfolgsraten nach der Gabe von Vincristin sehr niedrig und liegen in den meisten Fällen unter 10% (Zeile, 1978).

### 1.6.6.5 Cyclophosphamid

Das Zytostatikum Cyclophosphamid hemmt die Replikation und Transkription aller sich teilenden Zellen durch kovalente Quervernetzung von DNA-Strängen. B- und T-Lymphozyten reagieren sehr empfindlich auf dieses Zytostatikum, so dass sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunreaktion gehemmt wird (Stanton, et al., 1986). Nach Berchtold und McMillan ist Cyclophosphamid der Wirkstoff, der am ehesten bei Menschen zu einer anhaltenden und kompletten Remission der ITP führt, die zuvor erfolglos mit Glukokortikoiden und Splenektomie behandelt wurde. Die Dosierung wird mit 1-2mg/kg/Tag angegeben (Cines, et al., 2000). Ein Ansprechen auf die Therapie sollte innerhalb von 2-10 Wochen erfolgen, da es ansonsten unwahrscheinlich ist, dass der Patient noch auf die Therapie reagiert (Berchtold, et al., 1989). Nebenwirkungen sind Knochenmarkdepression, gastrointestinale Störungen, Alopezie, hämorrhagische Zystitis, Hepatotoxizität, Unfruchtbarkeit und Teratogenität.

### 1.6.6.6 Danazol

Danazol ist ein synthetisches Androgen mit einer geringen Maskulinisierungskapazität. Als Wirkungsmechanismus wird die Verringerung der Anzahl an Ig-Rezeptoren auf phagozytierenden Zellen und der Menge an Immunglobuline, die an die zu zerstörende Zelle gebunden sind, diskutiert (Wheeler, et al., 1992). Danazol scheint ebenfalls eine Komplementaktivierung und Komplementbindung an der Zellmembran von Erythrozyten und Thrombozyten zu verhindern (Miller, 1997). Fujisawa et al. fanden heraus, dass die Menge an plättchenassoziierten Antikörpern durch das Danazol nicht reduziert wird (Fujisawa, et al., 1993). Die Menge an PAIg bleibt gleich oder ist sogar erhöht. Dies gilt selbst bei einer länger andauernden Therapie. In der Humanmedizin wird Danazol oral in der Dosierung 200mg 3-4 mal am Tag für mindestens 2 Monate verabreicht. Ein Ansprechen auf die Therapie sollte innerhalb von 6-8 Wochen stattfinden (Berchtold, et al., 1989).

### 1.6.6.7 Rituximab

Rituximab ist ein monoklonales, gentechnisch hergestelltes IgG1-Kappa-Immunglobulin, welches aus einer variablen Maus- und einer konstanten humanen-Region besteht. Es gehört damit in die Gruppe der chimären Antikörper, die den Vorteil gegenüber rein murinen Antikörpern besitzen, weniger immunogen zu sein. Außerdem haben chimäre Antikörper den Vorteil, dass aufgrund der humanen Fc-Region eine effektive Aktivierung des menschlichen Immunsystems möglich ist. Bei rein murinen Antikörpern ist z.B. eine Komplementbindung dagegen nicht möglich (Winkler, et al., 1999). Rituximab ist ein glykosyliertes Protein, welches aus 1328 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 144kD aufweist. Es ist gegen das CD20-Antigen auf der Oberfläche von B-

Lymphozyten gerichtet und führt zu einer starken B-Zell-Verarmung im peripheren Blut sowie im lymphatischen Gewebe (Zaja, et al., 2003). Rituximab bindet an CD20-Antigene auf der Oberfläche von B-Lymphozyten. Es führt durch komplementvermittelte Lyse zur Zerstörung der B-Zellen und zur antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität. Dem AK wird auch ein Einfluss auf die Apoptose zugeschrieben (Alas, et al., 2001). Stasi et al konnten zeigen, dass der B-Zellabbau durch Rituximab die Abnormalitäten der T-Zellen bei ITP-Patienten rückgängig machen kann (Stasi, et al., 2008).

In einer Studie wurden 35 Patienten mit rezidivierender ITP ausgewertet, die mit Rituximab behandelt wurden. Vier Patienten wurden zweimal behandelt, so dass insgesamt 39 Behandlungen ausgewertet wurden. In 44% der Fälle (17/39) wurde eine Remission erreicht (Braendstrup P, 2005). Auch Lim et al. erreichten mit diesem Immunsuppressivum bei 64% der Patienten (15/20) eine Remission (Lim, et al., 2004). In einer anderen Studie erhielten 36 Kinder wöchentlich eine intravenöse Dosis von  $365\text{mg/m}^2$  Rituximab für die Dauer von vier Wochen. Hier stieg die Thrombozytenzahl auf mehr als  $50.000/\mu\text{l}$  bei 33-42% der Kinder (Parodi, et al., 2009). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit einer einzigen Dosis erzielt. Die Dauer der Behandlung beträgt im Mittel eine Woche um eine Thrombozytenzahl von mehr als  $50.000/\mu\text{l}$  zu erreichen (Taube, et al., 2005). Beschriebene Nebenwirkungen, die bei 17% der Patienten auftraten, sind Schüttelfrost, Fieber und Juckreiz.

### **1.6.6.8 Humanes Immunglobulin G (hIgG)**

Human-IgG ist normales polyspezifisches IgG, das aus Plasma gesunder Blutspender gewonnen wird. Der genaue Wirkungsmechanismus bei immunbedingten Erkrankungen ist unbekannt. Es wird eine Sättigung der Fc-Rezeptoren der Makrophagen oder eine Neutralisation der antithrombozytären AK vermutet (Georg, et al., 2001). Lazarus et al. sehen den Wirkungsmechanismus der hIgG in die Hemmung der retikuloendothelial Clearance-Funktion durch einen Mechanismus, der die Makrophagen blockiert (Lazarus, et al., 2003). Außerdem verhindert hIgG die Komplementbindung und die Immunkomplexbindung an Blutplättchen und inhibiert die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus Monozyten (Lazarus, et al., 2003).

Andere Hypothesen über den Wirkungsmechanismus beinhalten die Verstärkung der Aktivität von T-Suppressor-Zellen und eine Verminderung der Aktivität der natürlichen Killerzellen. Die ITP ist eine der häufigsten Indikationen beim Menschen für den Einsatz von hIgG. Angewendet wird es jedoch erst, wenn die klinische Situation eine vorübergehende Erhöhung der Thrombozyten erfordert oder wenn eine Behandlung mit Glukokortikoiden kontraindiziert ist (Georg, et al., 2001).

Die Behandlung ist für die anfängliche Therapie bei Patienten mit Plättchenzahlen von weniger als 50.000/ $\mu$ l, die schwere lebensbedrohliche Blutungen aufweisen, geeignet (Georg, et al., 2001). Beschriebene Nebenwirkungen sind Fieber, Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, akutes Nierenversagen und Hämolyse, verursacht durch Alloantikörper (Georg, et al., 2001). Die Therapie mit Immunglobulinen bringt kurzfristige, aber nur selten dauerhafte Remissionen. In der Regel fällt nach 3-5 Wochen die Thrombozytenzahl wieder ab. Die Immunglobulintherapie ist jedoch für die Behandlung akuter Blutungsepisoden unverzichtbar. Man gibt 1-2g/kg Körpergewicht und verteilt die Dosis auf 2-4 Tage.

### **1.6.6.9 Anti-D-Immunglobuline**

Eine Alternative ist die Therapie mit Anti-D-Immunglobulinen. Anti-D ist ein Plasmaderivat mit einem hohen Titer an Anti-D-Antikörpern. Diese Therapie kommt nur für Patienten in Frage, die Rhesus (D)-positiv sind. Die Erythrozyten werden durch den Antikörper opsoniert und blockieren die Phagozytosekapazität des retikuloendothelialen Systems. Anti-D ist nicht wirksam bei Patienten nach Splenektomie. Man gibt bei Kindern initial 25 $\mu$ g/kg an zwei Tagen oder 50 $\mu$ g/kg an einem Tag, beim Erwachsenen initial 50-75 $\mu$ g/kg. Allergische Reaktionen mit Schüttelfrost und Fieber sind selten. Häufig ist dagegen der Abfall des Hämoglobinwertes durch die therapeutisch induzierte Alloimmunhämolyse. Die Anti-D-Dosis sollte deshalb reduziert werden, wenn der Ausgangshämoglobinwert bereits unter 10g/dl liegt oder wenn er im Verlauf der Therapie um mehr als 2g/dl fällt. Wenn ein Patient zusätzlich zur ITP eine leichte, evtl. nur in den Laborwerten erkennbare Hämolyse hat (Evans-Syndrom), darf kein Anti-D gegeben werden, weil dadurch die Hämolyse massiv verstärkt werden kann. Bei der Bestimmung des Rhesusfaktors vor Gabe von Anti-D sollte deshalb ein direkter Coombs-Test durchgeführt werden und negativ sein. Wenn die Thrombozytenzahl nach der ersten Dosis von Anti-D nicht gleich ansteigt, können die Injektionen täglich wiederholt werden: 25-40 $\mu$ g/kg bei Ausgangshämoglobin von 8-10g/dl, 50-60 $\mu$ g/dl bei Ausgangshämoglobin höher als 10g/dl. Bei fehlender Ansprache nach 4 Dosen ist die Fortsetzung dieser Therapie nicht mehr sinnvoll. Wie für alle i.v. Immunglobulinpräparate gilt auch für Anti-D, dass nur wenige Patienten eine dauerhafte Remission erreichen. Für Kinder zeigen die ersten Daten, dass eine Erhaltungstherapie mit Dosierungen zwischen 25 und 60 $\mu$ g/kg alle 3-4 Wochen praktikabel und wirksam ist (Andrew, et al., 1992; El Alfy, et al., 2006).

### **1.6.6.10 Splenektomie**

Eine Splenektomie führt zu einer verlängerten Überlebenszeit der Thrombozyten, jedoch nicht zu einer Änderung des AK-Spiegels. Ist bei der Plättchenzerstörung die Leber das dominierende

Organ, so wird eine Splenektomie die Thrombozytenzahl nicht verbessern (McMillan, 1997). Die Indikation zur Splenektomie wird zurückhaltend gestellt. Es gibt keine international vereinbarte Abstimmung darüber, wann die Splenektomie bei chronischer ITP angesetzt werden soll. Die US-amerikanischen Leitlinien raten nur zur Splenektomie bei erwachsenen Patienten mit chronischer ITP, die nach 6 Wochen Erstbehandlung unter 10.000/ $\mu$ l Thrombozyten bleiben oder nach 3 Monaten nicht 30.000/ $\mu$ l erreichen. Bei Kindern empfehlen die amerikanischen Leitlinien etwas länger, nämlich 12 Monate, zu warten, bevor über die Splenektomie entschieden wird. Die britischen Leitlinien sehen eine Splenektomie für Kinder mit einer lang anhaltenden ITP von 12-24 Monaten mit lebensbedrohlichen Blutungsneigungen vor (George, et al., 1996). Operiert wird nach diesen Empfehlungen auch, wenn die Patienten unter den genannten Grenzwerten liegen und keine Blutungsneigung haben. Die Splenektomie trägt jedoch ein erhebliches Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko. Schwere, septische Infektionen (OPSI-Syndrom= Overwhelming Post-Splenectomy Infection) gefährden die Patienten (1 tödl. Infektion pro 1500 Patienten/Jahr). Nach der Splenektomie wird ein Anstieg der Plättchenzahl innerhalb 1-2 Monate erwartet. Bleibt die Antwort aus, sollen die Patienten darauf hin untersucht werden, ob sie eine akzessorische Milz haben (bis zu 12%). Auch wenn keine Daten zur Wirksamkeit der Impfung gegen bekapselte Bakterien (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* B und *Neisseria meningitidis*) vorliegen so wird doch eine präventive Schutzimpfung zwei Wochen vor dem Eingriff empfohlen. Es ist schwierig vorherzusagen, welcher Patient auf die Splenektomie ansprechen wird und welcher nicht. Weder der nuklearmedizinische Nachweis einer vermehrten Sequestration von markierten Thrombozyten in der Milz noch die präoperative Ansprache auf Steroide hat diesbezüglich einen Vorhersagewert (Canenagh, et al., 1999).

### **1.6.6.11 Thrombozytenkonzentrate**

Thrombozytenkonzentrate können bei schwerer, akuter Blutung und nach vorbereitender Gabe von i.v. Immunglobulinen verabreicht werden, z.B. im Rahmen der Splenektomie.

### **1.6.6.12 Transfusionstherapie**

Obwohl die transfundierten Thrombozyten nur eine geringe Lebensdauer haben, so schützen sie den Patienten vor lebensbedrohlichen Blutungen und überbrücken die Zeitspanne bis zum Ansprechen auf die immunsuppressive Therapie (Berchtold, et al., 1989).

## **1.6.7 Neue Therapieansätze**

Die geringe Plättchenproduktion trotz normaler TPO-Konzentrationen bei ITP-Patienten veranlasste Wissenschaftler und Forscher dazu, nach Möglichkeiten zu suchen, die die Thrombozytenbildung

fördern (Jenkins, et al., 2007). Mehrere Medikamente wurden als neue Therapieformen entwickelt und getestet. Außerdem befinden sich zurzeit neue Thrombopoietin-Rezeptor-Agonisten in der klinischen Entwicklung und frühen Phasen ihrer Anwendung. Im Gegensatz zu den erwähnten Präparaten ist ihr Wirkungsprinzip nicht die Kontrolle des Immunsystems bzw. des Abbaus von Thrombopoietin sondern die Blutplättchenbildung.

### **1.6.7.1 Romiplostim**

Romiplostim (Nplate®) steigert die Thrombozytenzahl über die Aktivierung des Thrombopoietin-Rezeptors im Knochenmark. In zwei parallelen Studien haben Mediziner 63 splenektomierte und 62 nicht-splenektomierte Patienten mit ITP und Thrombozytenzahl unter 30.000/µl für Romiplostim oder Placebo randomisiert. Patienten haben entweder wöchentliche subkutane Romiplostiminjektionen oder Placebo erhalten. Die Hälfte der Patienten in der Romiplostim-Gruppe hatten Steigerungen der Thrombozytenzahlen innerhalb von 2 bis 3 Wochen. Desweiteren hatten Patienten in der Romiplostim-Gruppe signifikant häufiger eine anhaltende Zunahme der Thrombozytenzahlen gegenüber denen die in der Placebo-Gruppe (38% vs. 0% für splenektomierte-Patienten, und 61% vs. 5% für nicht-splenektomierte Patienten). Nur wenige Patienten in der Romiplostim-Gruppe hatten eine anhaltende Thrombozytenreaktion, nachdem das Medikament abgesetzt wurde. Nebenwirkungsrate war in der Romiplostim- und Placebo-Gruppe ähnlich. Antikörper gegen Romiplostim wurden nicht festgestellt (Kuter, 2008). Eltrombopag hat dasselbe Wirkungsprinzip wie Romiplostim, kann allerdings oral verabreicht werden.

## **1.6.8 Verlauf und Prognose**

### **1.6.8.1 Längerfristiger Verlauf**

In der Humanmedizin beträgt die Mortalitätsrate bei Patienten mit chronischer ITP 4-5% (McMillan, 1997). Mehr als ein Drittel der Patienten erreichen durch Glukokortikoide und Splenektomie keine Remission (Georg, et al., 2001). Als refraktäre Patienten bezeichnet man Patienten, die nicht auf die Standarddosierung der Glukokortikoide und Splenektomie reagieren und eine weitere Therapie benötigen. Die Patienten sprechen auch schlecht auf zusätzliche Behandlungen an und weisen eine signifikante Morbidität aufgrund der Erkrankung und ihrer Behandlung auf. Die Mortalitätsrate liegt bei ca. 16% (McMillan, 1997).

---

## **1.7 Wichtige Methoden zum Nachweis von thrombozytären Autoantikörpern.**

Als unablässige, heute in der Diagnostik der Autoimmunthrombozytopenie nicht mehr wegzudenkende Komponente, hat sich der serologische Nachweis von Autoantikörpern bewährt. Angefangen mit funktionellen Testsystemen, über Antigen-Antikörper-Bindungs-Tests zu den Glykoproteinspezifischen Tests haben die Nachweismethoden eine rasante Entwicklung erfahren.

### **1.7.1 Indikationen des Autoantikörper-Screenings**

Ein Test auf Autoantikörper ist bei ätiologisch nicht klassifizierbaren organspezifischen oder systemisch verlaufenden Prozessen durchzuführen, wobei für ein gezieltes Screening die Kenntnis der klinischen Fragestellung eine wesentliche Voraussetzung ist. Serologische Bestimmungen sollten zu den diagnostischen Frühmaßnahmen gehören, da sie nicht nur in vielen Fällen eine präzise und technisch einfache Definition unklarer Krankheitsbilder erlauben, sondern auch für die frühzeitige Einleitung einer Therapie hilfreich sind.

### **1.7.2 Funktionelle Tests**

Die ersten Verfahren zum Nachweis von thrombozytären Antikörpern wurden zwischen 1950 und 1970 entwickelt. Nachdem es sich gezeigt hat, dass Plasma von Autoimmunthrombozytopenie (ITP)-Patienten nach Transfusion auch bei gesunden Empfängern eine Thrombozytopenie auslösen kann, ging man davon aus, dass ein plasmatischer Faktor für den Abfall der Thrombozyten verantwortlich ist (Schulman, et al., 1965). Die frühen Tests beruhen auf dieser Beobachtung. Messparameter wurden Aggregation/Agglutination, Degranulation und Lyse von Testthrombozyten angewendet (Shibata, et al., 1981). Diese Tests haben jedoch eine niedrige Sensitivität und Spezifität (Warner, et al., 1997). Zur Diagnostik immunologisch bedingter Thrombozytopenien ist keiner dieser Tests mehr im Einsatz.

#### **1.7.2.1 Antikörper-Bindungsassays**

Die zweite Generation von Tests zum Nachweis thrombozytärer Antikörper sind die Immunglobulinbindungsassays mit Hilfe von Fluoreszenz- oder Enzym-markierten, sekundären Antikörpern.

#### **1.7.2.2 ELISA**

In diesem Verfahren werden enzymmarkierte (alkalische Phosphatase), sekundäre Antikörper verwendet (Collins, et al., 1987). Nach Entfernung von nicht-gebundenem AHG (Antihuman-

Globulin) können thrombozytäre Antikörper über eine chromogene Enzym-Substrat-Reaktion nachgewiesen werden. Neben seiner Anwendung als Suchtest zum Nachweis thrombozytärer Antikörper wird der ELISA auch als Crossmatch-Test zur Vorhersage des Erfolgs von Thrombozytentransfusionen bei immunisierten Patienten herangezogen (O'Connell, et al., 1990).

### 1.7.2.3 Immunfluoreszenztest

Hier lassen sich zwei Arten von Testverfahren unterscheiden: der Plättchen-Suspensions-Immunfluoreszenztest (PSIFT) (Von dem Borne, et al., 1978) und der Plättchen-Adhäsions-Immunfluoreszenztest (PIFT) (Schneider, et al., 1981). Während im PSIFT die Plättchen als Zellsuspension vorliegen, werden im PAIFT die Thrombozyten an einer Glasplatte fixiert. Eine Reaktion von thrombozytären Antikörpern mit Thrombozyten kann über fluoreszenzmarkiertes Antihuman-Globulin (AHG) in einem inversen Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden.

Assays wie der Thrombozyten-Immunfluoreszenztest messen das gesamte an Thrombozyten gebundene IgG. Diese Tests sind hinsichtlich des Nachweises antithrombozytärer Antikörper sehr sensitiv. Da sie aber nicht in der Lage sind, Antikörperrgemische zu differenzieren, ist ihre Spezifität eher gering. Dagegen messen die sog. glykoproteinspezifischen Tests nur Antikörper, die an ein thrombozytäres Glykoprotein gebunden sind (z.B. GPIIb-IIIa, GPIb-IX, GPIa-IIa). Die Ergebnisse dieser Tests sind hoch spezifisch.

### 1.7.3 Immunoblot-Assays

Sie beruhen auf der Western-Blot-Technik. Hierbei werden gewaschene Thrombozyten lysiert, mit Natriumdodecylsulfat (SDS) behandelt und in einer Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Membran wird mit dem zu untersuchenden Serum inkubiert. Wenn das Serum einen thrombozytären Antikörper enthält, wird dieser durch Zugabe von einem markierten AHG detektiert. Diese Kombination von Markierung und elektrophoretischer Auftrennung ermöglicht die Analyse von spezifischen Banden und die Zuordnung zu spezifischen Glykoproteinen, welche den spezifischen Nachweis von thrombozytären Antikörpern und die Lokalisation ihrer Antigene erlaubt. Allerdings können auch normale Seren durch unspezifische Präzipitation mit Proteinen des Solubilisates zu scheinbar spezifischen Banden führen. Dieser Test ist leider nicht nur technisch sehr komplex und zeitaufwendig, sondern es können auch nur Antikörper gegen Antigene nachgewiesen werden, deren korrespondierendes Antigen während der Behandlung mit SDS nicht denaturiert wird (Towbin, 1979).

### **1.7.4 MAIPA**

Die Einführung des „Monoclonal Antibody Specific Immobilisation of Platelet Antigens Assay“ (MAIPA) vereinfachte den Einsatz von glykoproteinspezifischen Testsystemen in der Routinediagnostik (Kiefel, 1992; Kiefel, et al., 1987). Bei diesem Testsystem werden Thrombozyten bekannter Spender, die zuvor mit Patientenserum inkubiert und gewaschen wurden, mit einem monoklonalen Mausantikörper (mAk) inkubiert, der spezifisch an Regionen des zu untersuchenden GP bindet. Nach Lyse der Thrombozyten werden die Glykoproteine über diesen mAk an eine mit polyklonalen Ziege-Anti-Maus-Antikörper-beschichtete Mikrotiterplatte immobilisiert. Als Detektions-Antikörper wird ein enzymmarkierter AHG eingesetzt, welcher in einer chromogenen Enzym-Substrat-Reaktion den Nachweis der gebundenen Humanantikörper ermöglicht. Die Spezifität des MAIPA-Tests beim Nachweis thrombozytärer Antikörper wird mit bis zu 95% angegeben (Kiefel, et al., 2001). Für den direkten MAIPA gilt das gleiche Prinzip wie für den indirekten MAIPA, nur dass hierfür die patienteneigenen Plättchen anstelle von Testthrombozyten eingesetzt und mit dem entsprechenden Patientenserum inkubiert werden. Der MAIPA hat sich über viele Jahre als Standardtest für die spezifische Detektion von thrombozytären Antikörper mit höherer Spezifität und Sensitivität im Vergleich zu anderen GP-spezifischen Testsystemen durchgesetzt (Allen, et al., 1994; Beardsley, et al., 1998 Sep).

### **1.7.5 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie wird zum Nachweis von Antikörpern gegen Plättchenantigene eingesetzt. Diese Technik erlaubt eine Vereinfachung des Antikörpernachweises im Fluoreszenztestsystem und gleichzeitig die Differenzierung zwischen HLA-Klasse-I und plättchenspezifischen Antikörpern (Koksch, et al., 1995). Basierend auf dem Prinzip des MAIPA-Tests wurde ebenfalls ein antigenspezifischer Test für die Detektion von thrombozytären Antikörpern in der Durchflusszytometrie entwickelt (Simultaneous Analysis of Specific Platelet Antibodies (SASPA)). Allerdings ist das Verfahren gegenwärtig nicht allgemein anerkannt.

### **1.7.6 Komplementbindungsreaktion**

Die Komplementbindungsreaktion (KBR) zählt zu den ältesten serologischen Tests. Die Diagnostik von Infektionskrankheiten kann auf eine mehr als 90-jährige Erfahrung mit dieser Methode zurückblicken. Auch im Zeitalter hochsensitiver Nachweisverfahren, wie bei dem Enzymimmunoassay (EIA) oder bei der Polymerasekettenreaktion (PCR), hat die KBR in der Serodiagnostik von bakteriellen, viralen, parasitären und teilweise auch pilzbedingten

Infektionskrankheiten kaum an Aktualität verloren (Lennette, et al., 1979). Die KBR ist eine hochspezifische, in der Immunologie aber selten verwendete Methode zum Nachweis von Autoantikörpern unter Verwendung gereinigter Antigene. Auch hier gilt, dass die Sensitivität zwar eingeschränkt, der Nachweis komplementbindender Antikörper aber eine sehr hohe Beweiskraft für die Erkrankung hat, da natürliche Autoantikörper kein Komplement binden (Kanz, 2002). Da die komplementbindenden Antikörper gleichzeitig immer ein Hinweis sind auf relevante immunologische Aktivität, erlangt ihren Nachweis eine große prognostische Bedeutung. Die Komplementbindungsreaktion ist einfach, schnell, standardisierbar und in jedem Labor durchführbar. Prinzip: Antikörper binden nach Antigenkontakt (am Fab-Teil) mit ihrem Fc-Teil Komplement. Testverfahren: das Patientenserum wird mit Testantigen z.B. Blutplättchen zusammengebracht und dann Komplement dazugegeben. Besitzt der Patient Antikörper gegen das Testantigen, so bilden sich Ag-Ak-Komplexe und der Antikörper bindet Komplement. Das Komplement wird dadurch abgefangen. Im zweiten Schritt werden dann Hammelerythrozyten dazugegeben, die mit Kaninchenantikörpern (anti-Hammel) bedeckt sind. Da danach kein freies Komplement mehr vorhanden ist, kommt es nicht zur Hämolyse. Ist das Patientenserum negativ, so bleiben das Ag und Komplement frei. Komplement bindet an das Kaninchen-Ig auf den Hammelerythrozyten und führt zur Hämolyse. Durch verschiedene Verdünnungen des Patientenserums kann eine Titerbestimmung erfolgen.

## 1.8 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem ist ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität des Menschen und übernimmt eine Schlüsselrolle in der frühen Immunabwehr. Durch das Komplementsystem werden eingedrungene Pathogene oder veränderte, körpereigene Zellen unschädlich gemacht, indem sowohl eine zytotoxische Aktivität über den terminalen Angriffskomplex (im Englischen: Membrane Attack Complex, MAC) ausgeübt wird, als auch phagozytäre Immunzellen rekrutiert und aktiviert werden. Im menschlichen Organismus übernehmen Komponenten des Komplementsystems eine wichtige Rolle in der Erkennung, Prozessierung, Größenregulierung und Beseitigung von Immunkomplexen (im Englischen: Clearance) sowie bei der Markierung (Opsonisierung) und bei Beseitigung zellulärer Debris oder seneszenten Erythrozyten. Einige Produkte (Anaphylatoxine), die durch proteolytische Spaltprozesse in der Komplementkaskade entstehen, wirken chemotaktisch auf Zellen des Immunsystems und übernehmen eine vermittelnde Rolle zwischen dem Komplementsystem und der zellulären Immunantwort. Aktivierung und Verlauf der Komplementkaskade werden durch das enge Zusammenspiel von mehr als 40

serumlöslichen und membrangebundenen Proteinen bestimmt. Im Allgemeinen wird ein inaktives Vorläufermolekül durch proteolytische Spaltung aktiviert, um wiederum selbst z.B. als Serinprotease zu fungieren und somit zahlreiche Zielmoleküle zu aktivieren. Den Effektorproteinen steht eine Vielzahl von inhibitorischen Proteinen gegenüber, die an unterschiedlichen Ebenen der Kaskade eingreifen können. Auf viele membrangebundene Komplementproteine wird entsprechend ihrer Reaktivität mit monoklonalen Antikörpern die Cluster of Differentiation (CD)-Nomenklatur angewendet. Diese Nomenklatur wird in der vorliegenden Arbeit zusätzlich zu den gebräuchlichsten Trivialnamen berücksichtigt. Im Allgemeinen wird die aktivierte Form der Komplementproteine mit einem Suffix gekennzeichnet, z.B. C1q\*. Die meisten Komplementproteine setzen sich aus multiplen Domänen zusammen und sind in der Lage, Komplexe aus homo- und heteromeren Aggregaten zu bilden. Einige Proteine des Komplementsystems werden aufgrund ihrer genetischen, strukturellen und funktionellen Eigenschaften in insgesamt 5 Proteinfamilien zusammengefasst (Tab. 1-2, Seite 41). So bilden die regulatorisch wirksamen Proteine „C4 Binding Protein“ (C4bp), „Decay-Accelerating-Factor“ (DAF; CD55), „Membrane Cofactor Protein“ (MCP; CD46), Mitglieder der Faktor H Proteinfamilie, und die Komplement-Rezeptoren CR1 (CD35) und CR2, die Multigenfamilie der „Regulators of Complement Activation“ (RCA). Die RCA Proteine werden von Genen codiert, die auf dem langen Arm des Chromosom 1 (1q 32) liegen. Sie gleichen sich strukturell und bestehen größtenteils, und im Falle der Faktor-H-Proteine ausschließlich, aus den cysteinreichen „Short Consensus Repeat“ (SCR) Domänen, die aus ca. 60 Aminosäuren aufgebaut sind (Zipfel, et al., 1999). Namensgebend für diese Familie ist ihre gemeinsame Funktion, die Regulation der Komplementaktivierung.

Tab. 1-2 Proteinfamilien Aus dem Englischen: TS: Thrombospondin; EGF: Epidermal Growth Factor-like; LDL: Low Density Lipoprotein Receptor-like; SCR Short Consensus Repeat; vWF: von Willebrand Factor-like; RCA Regulators of Complement Activation; MBL: Mannan-Binding-Lectin (Friese, et al., 1999)

Familie	Proteine	Strukturelemente								
		Interner Thioester	Kollagen	TS	EGF	LDL	SCR	Perforin	vWF	Protease
Serin-Proteasen	C1r/C1s				+/+		+/+			+/+
	C2/Faktor B						+/+		+/+	+/+
	Faktor I					+				+
RCA Proteine	CR1/CR2						+/+			
	DAF/MCP						+/+			
	FH						+			
	C4bp						+			
Porenformende Proteine	C6			+	+	+		+		
	C7			+	+	+		+		
	C8			+	+	+		+		
	C9			+	+	+		+		
Membranbindende Proteine	C3/C4	+								
	C5									
Kollagenartige Proteine	C1q		+							
	MBL		+							

Die Leber ist der Hauptbildungsort der meisten löslichen Komplementproteine. Auf den Membranoberflächen körpereigener (autologer) Zellen, wie z.B. Endothelzellen der Gefäßwand, aber auch Zellen des Immunsystems, sind die Regulatoren DAF (CD55), MCP (CD46) und Protektin (CD59) verteilt (Cole, et al., 1985; Kinoshita, et al., 1985; Davies, et al., 1989; Meri, et al., 1991). Die Integrine CR1 (CD35, auch C3b Rezeptor), CR3 (CD 11b/CD18) und CR4 (CD11c/CD18), und der C1q Rezeptor, der den Kollektinen zugehört, finden sich auf allen phagozytären Zellen, den Neutrophilen und Monozyten/Makrophagen (Ross, et al., 1987; Collard, et al., 1999). Diese Rezeptorproteine vermitteln die phagozytäre Funktion des Komplements. Ihre Liganden sind u.a. die Komplementproteine C1q, Mannose- Bindendes-Lektin (MBL) oder das C4b Molekül und die Aktivierungsprodukte des C3, C3b und iC3b. Die Aktivierung der Rezeptoren und die Transduktion des spezifischen Effektorsignales sind abhängig vom jeweiligen Liganden und somit haben diese Interaktionen entsprechend vielfältige Auswirkungen auf die Zielzellen. Neben der Rolle als Vermittler in der komplementabhängigen Phagozytose wirkt z.B. CR1, das von Erythrozyten exprimiert wird, als Rezeptor für Immunkomplexe und bewirkt somit die C3b-abhängige Neutralisation der Immunglobulinaggregate (Schifferli, et al., 1986). Komplementrezeptor CR2 wird sowohl auf T- und B-Lymphozyten als auch auf folliculären dendritischen Zellen exprimiert und vermittelt zusammen mit C3 und CD19 immunregulatorische Funktionen (Weis, et al., 1984; Tedder, et al., 1986).

### **1.8.1 Thrombozyten und Komplement**

Die Zerstörung der Plättchen bei der ITP erfolgt durch Bindung des AKs an das Antigen (AG), mit oder ohne Komplementaktivierung, gefolgt von Phagozytose (Spruce, et al., 1983). Beim Menschen mit chronischer ITP erfolgt sie per Fc-Rezeptor vermittelter Interaktion durch Makrophagen in der Milz und Leber (Saleh, et al., 1989). Plättchen, die weniger stark mit AK beladen sind, werden primär über Makrophagen der Milz phagozytiert. Stark mit AK beladene Thrombozyten werden über Makrophagen der Milz und Leber phagozytiert (Spruce, et al., 1983). Die Phagozytose wird entweder durch das Fc-Fragment der gebundenen IgG-Moleküle an den Thrombozyten oder durch eine Komplementaktivierung ausgelöst, indem C3b an die Plättchenoberfläche bindet (Spruce, et al., 1983). Obwohl der Zusammenhang der Komplementbindung an die Thrombozytenoberfläche und die Komplementfixierung an die Autoantikörper der Plättchen noch nicht ganz geklärt ist, könnte die Komplementaktivierung zu einer intravaskulären Plättchenlyse oder Erleichterung der Phagozytose führen. Die durch den Fc-Rezeptor vermittelte Lyse ist ohne Zweifel ein wichtiger Mechanismus bei der ITP (Spruce, et al., 1983). Bei Menschen mit chronischer ITP wird die Lebensspanne der Thrombozyten auf Minuten verkürzt (He, et al., 1994).

Durch Bildung so genannter Plättchenmikropartikel wird die prokoagulatorische Aktivität im Bereich eines Aggregats gesteigert. Sie entstehen, indem aktivierte Thrombozyten kleine Membranvesikel abschnüren, die durch die Fähigkeit Faktor V und VIIIa binden zu können, eine hohe prokoagulatorische Aktivität besitzen (Sims, et al., 1989; Holme, et al., 1997).

### **1.8.2 Komplement: Initiation und Aktivierung**

#### **1.8.2.1 Klassischer Weg**

Für die antikörperabhängige Induktion interessiert vor allem der klassische Weg, dessen Prinzip im Folgenden aufgeführt wird.

Tab. 1-3 Aktivierende Komponenten des klassischen Weges (Cooper, 1985)

Komponente	Mol. Gewicht [kDa]	Anzahl der Polypeptidketten	Aktivität
<b>C1q</b>	460	6 x 3	Bindet direkt an Pathogenoberfläche oder indirekt an pathogengebundenen Antikörper, ermöglicht so Aktivierung von C1r
<b>C1r</b>	83	1	Serinprotease spaltet C1s zu einer aktiven Protease
<b>C1s</b>	83	1	Serinprotease spaltet C4 und C2
<b>C2</b>	107	1	Ligand für C4b
<b>C2a</b>	73	1	Bestandteil der C3- Konvertase spaltet C3
<b>C2b</b>	34	1	Aktives Enzym der C3/C5-Konvertase des klassischen Weges; spaltet C3 und C5
<b>C4</b>	205	3 ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )	Wird von aktiviertem C1s in C4a und C4b gespalten
<b>C4a</b>	8,7	1	Anaphylatoxin: Peptid-Entzündungsmediator (schwache Aktivität)
<b>C4b</b>	196	3 ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )	Bindet an Aktivatoroberfläche, Ligand für C2, Bestandteil der C3-Konvertase

Die Moleküle C1q, C1r, C1s, C4, C2 und C3 fungieren als Komponenten des klassischen Weges (Tab. 1-3, Seite 43). Die Komplementaktivierung über diesen Weg wird durch die Bindung von C1q an Antikörper-Antigen-Komplexe (antikörperabhängiger Weg) oder an Aktivatoren bzw. Akzeptormoleküle (antikörperunabhängiger Weg) und einer damit verbundenen Konformationsänderung im Molekül initiiert (Clas, et al., 1981). C1q ist ein makromolekularer Komplex aus insgesamt 6 Kopien dreier unterschiedlicher Proteinketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Um die dreidimensionale Struktur des C1q-Moleküls zu beschreiben hat sich der Vergleich des Komplexes mit einem „Blumenstrauß“ bewährt. Die N-terminalen Regionen der Proteinketten sind durch das Gly-X-Y-Motiv kollagenartig strukturiert und bilden den „Stiel“, während die C-terminalen 140 Aminosäuren den „globulären Kopf“ ausmachen (Calcott, et al., 1972). Der gesamte C1- Komplex besteht aus C1q, das mit einem Tetramer aus je 2 Molekülen der Proenzyme C1s und C1r assoziiert ist (Loos, et al., 1980). Als Liganden für C1q und somit Aktivatoren des Komplements fungieren u.a. neben anionischen Makromolekülen, wie z.B. DNA, bakterielles Lipopolysaccharin, Cardiolipin oder Mucopolysaccharide, auch kollagenbindende Proteine wie C-reaktives Protein (CRP) oder das Fibronectin der extrazellulären Matrix. Während der lokalen Entzündungsreaktion bilden sich schwer lösliche Antikörperaggregate aus, die durch Komplement wieder solubilisiert werden. Die Bindung von C1q an die Fc-Anteile von IgM (C $\mu$ 3, C $\mu$ 5) und IgG (C $\gamma$ 2) vermittelt diese wichtige biologische Funktion des Komplements.

Beim Menschen gehören IgG1 und IgG3 zu den Hauptaktivatoren des Komplementsystems (Dillman, et al., 1995). Während IgG1 und IgG3 stärkere Aktivatoren des klassischen Weges darstellen, gilt IgG2 als Hauptaktivator des alternativen Weges. IgG4 wird keine Aktivierung des Komplements zugeschrieben (Brekke, et al., 1995). Wird nun der klassische Weg des Komplements

gestartet, findet eine Konformationsänderung und Aktivierung des C1q-Moleküls statt. Die darauf resultierende Aktivierung der Fragmente C1r und C1s führt zur proteolytischen Spaltung des C4-Proteins. Man nimmt an, dass das aktivierte C1q die Konformation des C1r-Proteins beeinflusst, welches die erste proteolytische Spaltung der Kaskade vermittelt (Dodds, et al., 1978). In diesem Prozess wird zunächst eines der C1r-Moleküle des C1-Komplexes in einen reversiblen Übergangszustand gebracht (C1r\*), in dem die enzymatische Region des C1r\* nun exponiert ist. C1r\* spaltet das zweite C1r-Molekül und bildet mit diesem verbunden das doppelsträngige C1r<sub>2</sub>. Das C1s-Dimer des Komplexes wird über diese Serinesterase gespalten und somit aktiviert. Das resultierende C1s\* ist nun in der Lage als zweite Serinesterase die nächste Komponente in der Kaskade, das C4-Molekül, proteolytisch zu spalten (Matsumoto, et al., 1989). Als Produkte entstehen hierbei zwei Fragmente: das größere C4b-Molekül, das die Bindungsstelle für das C2-Protein markiert, und das kleinere C4a, das als Anaphylatoxin in die Entzündungsreaktion eingreift. Der Komplex aus C4bC2 ist selbst nicht enzymatisch aktiv, C2 wird jedoch durch C1s\* gespalten, und es bildet sich die klassische C3-Konvertase C4bC2a aus. Ein reaktiver Thioester in C4b ist in diesem Molekül exponiert und bindet hierüber kovalent an die Aktivatoroberfläche (Dodds, et al., 1996). Die Kaskade geht weiter, indem nun ein C3-Molekül durch diese Konvertase enzymatisch gespalten wird, wodurch das größere Fragment C3b an das membrangebundene C4b des C4bC2a-Komplexes gebunden bleibt und die C5-Konvertase des klassischen Weges C4bC3bC2a gebildet wird (Cooper, 1975). Den Effektorproteinen des Komplements steht eine Vielzahl von inhibitorisch wirksamen Proteinen gegenüber. Der klassische Weg wird durch die Proteine C1-Inhibitor und C4b-Binding-Protein reguliert. Zusätzlich wirken auf Ebene des C3b die Regulatoren des alternativen Weges.

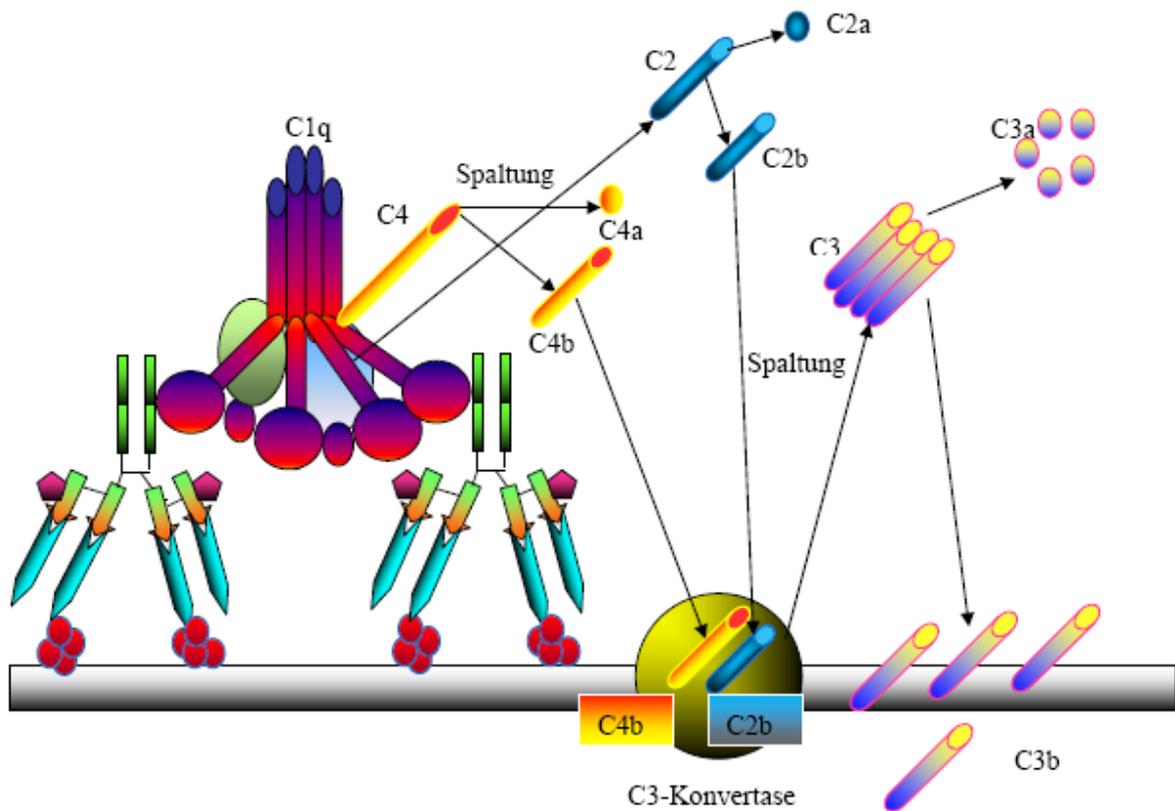


Abb. 1-3 Der klassische Weg wird ausgelöst durch die Bindung des Faktors C1 an IgG oder IgM auf der Oberfläche von Mikroorganismen. C1q hat die Form eines Tulpenstraubes, dessen „Blüten“ an die Fc-Region von Antikörpern binden. Dies aktiviert C1r, eine Serinprotease, die die Kaskade des klassischen Weges einleitet. Zunächst wird C4 proteolytisch zu C4b aktiviert, das wiederum C2 in C2a und C2b spaltet. C4b und C2a bilden zusammen die C3-Konvertase, die schließlich die Spaltung von C3 in C3a und C3b katalysiert. (K.B.M. Reidt)

### 1.8.2.2 Komplement: Termination

Tab. 1-4 Aktivierende Komponenten des Terminalen Angriffskomplexes (Esser, 1991 sep)

Komponente	Mol. Gewicht [kDa]	Anzahl der Polypeptidketten	Plasmakonzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Genlocus	Aktivität
C5	192	2 ( $\alpha$ , $\beta$ )	75	9q34,4	Bindet an C3 der C5- Konvertasen
C5a	11,2	1	----	----	Anaphylatoxin
C5b	182	2 ( $\alpha$ , $\beta$ )	----	----	Bindung C6, C7
C6	120	1	45-70	5p13	Bindung C5, C7
C7	105	1	55-60	5p13	Bindet C6, C8: C5-7 Komplex bildet Pore in Aktivatormembran
C8	101	3 ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )	80	1p32 9q34,3	Bindet C7, C9: verstärkt Wirkung des C5-7 Komplexes
C9	71	1	60	5p13	Bindet C8: Polymerisation: notwendiger Bestandteil des MAC zur Zellyse

Die Termination der Kaskade wird eingeleitet, wenn die klassische oder alternative C5- Konvertase das intakte C5 in die zwei Fragmente C5a (11,2kDa) und C5b (182kDa) gespalten hat. Komponenten des terminalen Weges sind die fünf Plasmaproteine C5, C6, C7, C8 und C9 (Tab. 1-4, Seite 46). Beide C5-Konvertasen des klassischen und des alternativen Weges entstehen wahrscheinlich durch die Bindung eines zweiten C3b-Moleküls an die jeweilige C3-Konvertase, C4b2a3b oder C3Bb3b (Isenman, et al., 1980; Takata, et al., 1987). An diesem zusätzlichen C3b lagert sich C5 an und wird in seine beiden Fragmente gespalten. Die letzten Schritte der Kaskade werden über distinkte Protein-Protein-Interaktionen zwischen C5, C6, C7, C8 und C9 geleitet, die nicht enzymatisch vermittelt werden. Der als self-assembly bezeichnete Prozess mündet in der Bildung des terminalen Membranangriffskomplexes aus den Komponenten C5b-9 (Podack, et al., 1979). Nur in einer begrenzten Phase nach seiner Aktivierung kann sich C5b mit C6 zu einem stabilen Komplex verbinden (C5b-6). Wenn dieser Komplex mit dem C7-Molekül assoziiert, entsteht C5b-C7, das amphiphile Eigenschaften besitzt. Der Komplex aus C5b-C7 lagert sich in die hydrophilen Anteile der Phospholipiddoppelmembran ein, kann diese allerdings nicht an den Zellmembranen benachbarter autologer oder pathogener Zellen verlassen. Ebenso kann der Komplex noch nicht bewirken, dass das Zytoplasma aus der Zelle austritt („Leakiness“). Für die Membraneinlagerung des C5b-7-Komplexes stehen nur einige Millisekunden zur Verfügung, bevor er irreversibel zerfällt. Ist der Komplex aus C5b-7 erfolgreich stabilisiert, wird durch die folgende Assoziation mit einem C8-Molekül die Hydrophobizität des Gesamtkomplexes erhöht, und dieser kann weit in die Zellmembran eindringen. Die resultierenden Poren haben einen Durchmesser von 10 bis 15 Angström. Dies ist bereits ausreichend für eine begrenzte Lyse gewisser Zelltypen.

Membranständiges C5b-9 ist ein porenbildendes Zytotoxin, das durch eine Verschiebung der Elektrolythomöostase verschiedene Wirkungen auf die Zielzelle haben kann. Während nicht kernhaltige Zellen durch den MAK lysiert werden (Lachmann, et al., 1970), bleibt bei kernhaltigen Zellen eine Lyse aus. Ionenpumpen, die dem Wasser- und Calciumeinfluss entgegenwirken, und Mechanismen zur schnellen Entfernung von C5b-9-Molekülen von der Zelloberfläche verhindern hier die Lyse (Morgan, 1992; Seifert, et al., 1992). Die Reaktion kernhaltiger Zellen ist charakterisiert durch Zytokin-, Chemokin- und Mitogenfreisetzung, also durch inflammatorische Prozesse (Morgan, 1992; Benzaquen, et al., 1994; Niculescu, et al., 1999). Es findet eine Erhöhung der Genexpression dieser Stoffe statt, die durch den terminalen Komplementkomplex induziert wird (Morgan, 1992; Niculescu, et al., 1999).

Die Bildung des C5b-C8 Komplexes geschieht auch in der löslichen Serumphase. Das Molekül ist jedoch nur an der Membran gebunden funktionell aktiv und stellt dort gewissermaßen den Rezeptor für die Komponente C9 dar. Zunächst bindet ein C9-Molekül an den C5b-8-Komplex und daraufhin folgt die nichtenzymatische Polymerisation von weiteren C9-Molekülen (Podack, et al., 1982). Der Mechanismus dieses Prozesses ist nicht eindeutig geklärt. Der resultierende MAC besteht aus bis zu 16 C9-Molekülen (poly-C9). Der gesamte Komplex C5b-8C9 erreicht einen Durchmesser von ca. 100 Angström und geht wahrscheinlich durch beide Schichten der zellulären Doppelmembran. Man nimmt an, dass die ungebremste Diffusion von Ionen und Wasser durch diese Poren die osmotische Lyse der Zielzelle einleitet.

### 1.8.2.3 Regulation

Tab. 1-5 Inhibitorisch wirksame Regulatoren des klassischen Wegs (Atkinson, et al., 1991 oct)

	Mol. Gewicht [kDa]	Anzahl der Polypeptidketten	Genlocus	Bezeichnung und Funktion
<b>C1 inh</b>	71-105	1	11p11,2-q13	C1r, C1s
<b>C4bp</b>	460-570	8 (7 $\alpha$ , 1 $\beta$ )	1q32	C3-Konvertase C4b2a
<b>Faktor I</b>	88	2	4q25	C3b, iC3b und C4b benötigt Kofaktoren
<b>DAF (CD 55)*, GPI verankert</b>	70	1	1q32	Dissoziation der C3-Konvertasen
<b>MCP (CD 46)*, transmembran</b>	45-70	1	1q32	Kofaktor für FI
<b>MCP (CD 35)*, transmembran</b>	190-220	1	1p32	Dissoziation der C3-Konvertasen: Kofaktor für FI
<b>Faktor H</b>	155	1	1q32	Wie FHL-1: bindet C3b, C3c, C3d: konkurriert mit FB und C3b
<b>Clusterin (SG-P2)</b>	80	2	8p21	C5-8
<b>S-Protein (Vitronectin)</b>	77 n	2xn	17q11	C5-8
<b>HRF* C8-bind. Protein</b>	65	nb	nb	C8: MAC
<b>Protektin* (CD 59), GPI verankert</b>	18-23	1	11p13	C9: MAC

nb = nicht bekannt

### 1.8.3 C1-Inhibitor, C4-Binding-Protein und Faktor I vermittelte Inaktivierung des C4b

Der klassische und Lektin-Weg der Komplementaktivierung wird in der flüssigen Phase durch die Wirkungsweise des C1-Inhibitors (C1inh) und des C4-bindenden Proteins (C4bp) entscheidend beeinflusst. An erster Stelle des klassischen Weges inaktiviert C1inh den aktiven C1 Komplex, indem er sich irreversibel an C1s und C1r anlagert und den Komplex destabilisiert (He, et al., 1997). C4bp ist ein je nach Grad der Glykosylierung 460-570kDa schweres Glykoprotein, das sich sowohl frei im Serum als auch an Chylomikronen assoziiert findet. C4bp beschleunigt den Zerfall der klassischen C3- und C5-Konvertasen (sog. decay-accelerating activity). Er verhindert die Bildung neuer Konvertasen und hat Kofaktoraktivität in der proteolytischen Spaltung des C4b durch Faktor I (Barnum, et al., 1990). Auch auf Ebene des C4b wirken die Membranproteine CR1 und MCP als Kofaktoren in der Faktor-I-vermittelten-Inaktivierung der klassischen C3-Konvertase (Seya, et al., 1989), während DAF ihren Zerfall beschleunigt (Nicholson-Weller, et al., 1982).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Tab. 2-1 Verwendete Geräte und ihre Bezugsquellen

Gerät	Bezugsquelle
Blotkammer	Keutz, Reiskirchen
Brutschrank	Hera cell, Heraeus Instruments, Hanau
Durchflusszytometer	FACSCalibur™ Flow Cytometer, BD Bioscience, Heidelberg
Elektronische Pipetten	Matrix Impact® (12.5 µl, 1250 µl), Hudson, NH, USA
Flockeneisbereiter	Scotsman AF100, Vernon Hills, IL, USA
Fritte	Millipore, Billerica, MA, USA
Geldokumentationssystem	Intas Science Imaging Instruments, Göttingen
Gelkammer, horizontal	Keutz, Reiskirchen
Hamilton-Microliterspritze	(100 µl), Hamilton, Hamburg
Heizblöcke	IKA Labortechnik, Staufen
Küvettenphotometer	Spekol UV/VIS, Zeiss, Göttingen
Luminometer	Berthold, Wildbach
Magnetrührer	IKA® Works Inc., Wilmington, USA
Magnetzellseparator	Dynal Biotech, Hamburg
Mikroskope	Mikroskop-Diavert, Licht-Mikroskop SMLux, Durchlichtmikroskop Leitz Biomed, Leica Microsystems, Wetzlar
Mikrotiterplatten-Photometer	Photometer Sunrise, Tecan, Crailsheim;
Minischüttler (Mischer)	REA x 2000, Heidolph; IKA Labortechnik, Staufen
Netzgerät	Consort E443 Power Supply, Keutz, Reiskirchen
Overhead-Rotator	Labinco, Steinfurt
pH-Meter	pH211 Microprocessor pH Meter, Hanna Instruments, Krehl am Rhein
Pipetten	Pipette Research (100 – 1000 µl, 200 – 100 µl, 10 - 100µl, 0.5 – 10 µl), Eppendorf; Multipette, Eppendorf, Hamburg
Pipettoren	StarPet®, Starlab, Ahrensburg; HandyStep®, Brand, Wertheim
Protein G-Säule	HiTrap™ Protein G HP (1 ml), Amersham, Buckinghamshire, UK
Pumpen zur Affinitätschromatographie	P1 Pump, Amersham, Buckinghamshire, UK
Rhesusschauke	DiaMed AG, Cressier sur Morat, Schweiz
Säulen zur Affinitätschromatographie	C Columns; Hi Performance Columns, Amersham, Buckinghamshire, UK
Schüttelinkubator	GFL-3032, Hilab Labortechnik, Düsseldorf

Gerät	Bezugsquelle
Sicherheitswerkbank	Hera safe, Heraeus Instruments, Hanau,
Stickstoffbehälter	Messer, Krefeld
Thermoblock	Biometra, Göttingen
Ultraschall-Bad	Elma Turnssomic Digital S., Elma, Singen
UV-VIS	Spektralphotometer Nanodrop® ND-2000
Vakuumpumpe	Neuberger, Freiburg
Waagen	AE 100, PJ 6000, Mettler Toledo, Gießen
Wasserbad	Julabo EM, Keutz, Reiskirchen; Schüttelwasserbad 1083, GFL, Burgwedel
Zählkammer	Neubauer Improved, 0.0025 mm <sup>2</sup> /0.1mm, Brand, Schwerin
Zellzählgerät	Sysmex KX-21, Sysmex Deutschland, Norderstedt
Zentrifugen	Zentrifuge Rotina 46, Tischzentrifuge Micro20, Hettich, Tuttlingen; Tischzentrifuge , Biofuge A, Biofuge Stratos, Zentrifuge Heraeus Varifuge, Heraeus Instruments, Hanau

### 2.1.2 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Amersham (Buckinghamshire, UK), BIAcore AB Uppsala (Schweden), Bio-Rad (München), Calbiochem (Bad Soden), Fulka (Neu Ulm), Gibco BRL (Eggenstein), ICN (Meckenheim), Loxo (Dossenheim), Merck (Darmstadt), Millipore (Eschborn), Sciences (Meriden, USA), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (München).

### 2.1.3 Antikörper

Tab. 2-2 Polyklonale und monoklonale Antikörper, die in dieser Dissertation verwendet wurden

Antigen	Spezifität	Monoklonal/Polyklonal (Spezies)	Klon-Name	Bezugsquelle
CD41	human	m. Maus	Gi5	Transfusionsmedizin, Gießen
CD41	human	m. Maus	P2	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD61	human	m. Maus	Gi16	Transfusionsmedizin, Gießen
CD61	human	m. Maus	SZ22	Immunotech, Marseille, Frankreich
CD41	human	m. Maus	SZ21	Immunotech, Marseille, Frankreich
$\beta_2$ microglobulin	human	m. Maus	B1G6	Immunotech, Marseille, Frankreich
IgG	Kaninchen	m. Maus	-	Dako, Hamburg
IgG	human	m. Maus	-	Dako, Hamburg
IgG FITC	human	Kaninchen	-	Dako, Hamburg
IgG FITC	Kaninchen	m. Maus	-	Dako, Hamburg
C1q	human	Kaninchen	-	Dako, Hamburg
Streptavidin FITC	-	-	-	Dianova, Hamburg

### 2.1.4 Marker

Rainbow™ coloured protein weight marker Amersham, Buckinghamshire, UK

### 2.1.5 Enzyme und Proteine

Humanes Komplement C1q Sigma-Aldrich, München

Humanes Polyvalentes IgG Octapharma, Langenfeld

Prostaglandin E1 (PGE1) Sigma Aldrich, München

Proteaseinhibitor-Cocktail Sigma Aldrich, München

## 2.1.6 Gebrauchsfertige Reagenzien, Lösungen und Puffer

Tab. 2-3 Reagenzien, Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer	Bezugsquellen
Bacto-Trypton	Merck, Darmstadt
Calciumchloridlösung (CaCl <sub>2</sub> , 25mM)	Dade Behring, Marburg
CNBr-activated Sepharose 4B	Pharmacia Biotech, Wikströms, Schweden
Dyna M-280 Streptavidin-Beads	Dynal Biotech, Hamburg
FACSClean™	BD Bioscience, Heidelberg
FACSRinse™	BD Bioscience, Heidelberg
FACSFlow™	BD Bioscience, Heidelberg
Fötales Kälberserum (FKS) Gold, hitzeinaktiviert	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Immobilisationspuffer (10mM Natriumazetat, pH 4.0)	BIAcore AB, Uppsala, Schweden
Phosphate buffer saline (PBS) (1x)	Gibco BRL, Karlsruhe
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Pierce, München
Rinderserumalbumin 22%	Immucor, Rödermark Rotiphere
Rotiphere Gel 30	Roth, Karlsruhe
SDS-PAGE 30	Roth, Karlsruhe
Tris-Borat EDTA Puffer	Gibco BRL, Karlsruhe
BCA Protein Assay Kit	Pierce, München
ECL + plus Reagenz	Amersham, Buckinghamshire, UK
Melon™ Gel IgG Spin Purification Kit	Pierce, München
QIAquick Spin Purification Procedure	Qiagen, Hilden
Roti®-Quick-Kit	Roth, Karlsruhe

## 2.1.7 Auswahl der Patienten und Seren

Über einen Zeitraum von 12 Monaten wurden 788 Blutproben von Patienten mit Verdacht auf ITP unserem Labor zur Verfügung gestellt. Ein Fragebogen, mit dem relevante Kriterien für die Widerlegung oder Bestätigung von ITP gemäß den britischen Richtlinien abgefragt wurden, einschließlich Fragen zur Allgemeinanamnese und zur Blutungsanamnese, Fragen zum körperlichen Allgemeinzustand sowie zum Blutbild (Br J Haematol 2003; 120:574-96) wurde den behandelten Ärzten und Krankenhäusern zugesandt. Davon wurden 495 Fragebögen zurückgegeben. Patienten mit anderen Diagnosen, die eine Thrombozytopenie erklären konnten, einschließlich aplastischer Anämie, Leukämie, Lymphome, myelodysplastisches Syndrom, Geschwülste, Leberzirrhose, Herzfehler, Knochenmark/Blutstammzelltransplantation, Sepsis und medikamentinduzierter Thrombozytopenie (n=107) wurden nicht in die Studie eingeschlossen. Auch Patienten, die keine relevante Diagnose bezogen auf ITP zeigten, wurden von der Kohorte bei

einer vergrößerten Milz (n=43) oder bei unerklärter Leukopenie (n=80) ausgeschlossen. Die Kontrollgruppe bestand aus 50 gesunden Blutspendern mit normaler Thrombozytenzahl. Die Studie wurde vom lokalen Ethischen Gremium genehmigt.

Humanblut und -seren von ITP-Patienten, von Patienten mit Heparininduzierter Thrombozytopenie, von Glanzmann-Patienten, von Patienten mit Bernard-Soulier-Syndrom sowie von normalen Blutspendern wurden vom Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin Gießen zur Verfügung gestellt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Immunologische und biochemische Methoden

#### 2.2.1.1 Monoclonal antibody immobilization of platelet antigens (MAIPA) Assay

Ein glykoproteinspezifisches Testverfahren, der MAIPA-Test, wurde verwendet, um die Aktivität plättchenreaktiver Antikörper zu untersuchen (Kiefel, et al., 1987; Kiefel, 1992). Die für den MAIPA-Test verwendeten Thrombozyten entstammten einem Zellpool HPA-typisierter Spender des Thrombozytenlabors der Transfusionsmedizin Gießen oder wurden frisch isoliert. 100ml EDTA-antikoagulierte Blut wurden verwendet, um die Blutplättchen zu isolieren. Zur Thrombozytengewinnung wurde plättchenreiches Plasma (PRP) durch Zentrifugation (800U<sub>pm</sub> 25min) gewonnen, die Thrombozyten pelletiert, dreimal mit NaCl/0.5g% EDTA-Lösung (pH 6.5) gewaschen und die Zellzahl in einem Zellcounter (Sysmex) bestimmt. Die Thrombozyten wurden in NaCl/0.1% NaN<sub>3</sub> (pH 6.5) bei 4°C unter Zusatz von 10% Proteaseinhibitorcocktail (äquivalent zu 1mg USP Pankreatin) gelagert. Für die Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff wurden Plättchen mit RPMI/Tris (3:1) mit 10% DMSO/3.2mM L-Glutamin und 10% AB-Serum auf eine Konzentration von 500.000/μl eingestellt. Zur Reaktivierung wurden die Plättchen bei 37°C aufgetaut, mit 4μl PGE1 versetzt, mit NaCl (pH 6.5) gewaschen und gezählt.

Zur Vorbereitung des MAIPA-Tests wurde ein polyklonaler Ziege anti-Maus-Fcγ-spezifischer Antikörper (1:5000 in Bindungspuffer: 1.59g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 2.93g NaHCO<sub>3</sub>, 0.2g NaN<sub>3</sub> ad 1000ml Aqua dest., pH 9.6) über Nacht bei 4°C oder 2h bei 37°C an die Festphase einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Durch Blockieren mit TBS-Waschpuffer (3.63g Tris, 15ml Triton X-100, 1.5ml Tween, 1.5ml CaCl<sub>2</sub> ad 3000 mlNaCl, pH 7.4) für 30min bei 4°C wird die Hintergrundreaktion durch unspezifische Bindung mit Analyten und dem Detektionskomplex verhindert. 20\*10<sup>6</sup> frische bzw. kryokonservierte Plättchen in 0.2%-iger BSA-PBS-Lösung wurden mit 50μl Humanserum und

10µl eines gereinigten mAK (20µg/ml) oder Kulturüberstand sequenziell, mit eingeführten Waschschritten, für jeweils 30min bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit physiologischer NaCl Lösung (0.9%) wurden die Glykoproteine aus der Plättchenmembran mit 100µl des Lysepuffers (0.121g Tris, 0.5ml Triton X-100 ad 100ml NaCl) solubilisiert. Nicht-lysierte Zellmembranbestandteile wurden durch Zentrifugation (10.000Upm 30min) von den Lysatüberständen getrennt. 100µl dieser verdünnten Antigen-Antikörper-Komplexe (1:5 in TBS-Waschpuffer) wurden jeweils in die Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert und für 90min bei 4°C inkubiert. Nach Entfernung nicht-gebundener Glykoproteinkomplexe wurden 100µl eines PO-konjugierten Ziege-anti-Human-IgG-Fcγ Antikörpers (1:4.500 in TBS-Waschpuffer) pipettiert, für 2h bei 4°C inkubiert, gewaschen und gebundene Humanantikörper in einer chromogenen Enzymsubstratreaktion (15min) nachgewiesen. Die Peroxidase katalysiert durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Umsetzung vom farblosen OPD in das orangebraun gefärbte 2,3-Diaminophenazin (DAP), wodurch eine Änderung der OD hervorgerufen wird. Nach Abstoppen der Reaktion mit 50µl Stopplösung (2.5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) wurde die Änderung der OD photometrisch (Tecan) bei 492 und 630nm gemessen. Ausschlaggebend für die Bewertung der Ergebnisse des MAIPA-Tests ist die Differenz der Extinktion gegenüber nicht-gecoateten Vertiefungen der Mikrotiterplatte. Wenn die Extinktion weniger als 0,2 betrug, wurde dies als negative Reaktion beurteilt. Eine Extinktion zwischen 0,2 und 0,4 stellte eine einfach positive Reaktion dar. Eine Extinktion größer als 0,4 aber niedriger als 0,8 entsprach einer zweifach positiven Reaktion. Bis zu einer Extinktion von 1,2 wurde die Reaktion als dreifach positiv bewertet. Wenn die Extinktion mehr als 1,2 betrug, entsprach diese einer vierfach positiven Reaktion. Im MAIPA wurden die Seren mit 4 mAk untersucht: Gi5(Anti-GPIIb/IIIa), Gi9(Anti-GPIa/IIa), FMC25(Anti-GPIb/IX) und β2-Mikroglobulin (B1G6; Anti-HLA-Klasse I Antigen).

#### 2.2.1.2 Plättchen-Adhäsions-Immunfluoreszenz-Test (PAIFT)

Die Durchführung des Plättchen-Adhäsions-Immunfluoreszenz-Tests (Von dem Borne, et al., 1978) wurde im Standardverfahren nach modifiziertem Protokoll von Schneider und Schnaidt (Schneider, et al., 1981) vorgenommen. Hier wird die Fähigkeit der Thrombozyten, an Glasobjektträgern zu adhären, ausgenutzt. 10µl HPA-typisierter kryokonservierter Thrombozyten ( $2 \cdot 10^6$  Zellen) wurden nach Reaktivierung auf den Ring einer Hamaxplatte pipettiert und für 30min bei RT sedimentiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden 10µl des Patientenserums bzw. plättchenfreien Plasmas mit den Thrombozyten für 30min bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit NaCl (pH 6.5) wurden 10µl eines FITC konjugierten anti-Human Antikörpers (1:50 in PBS, pH 6.5) zugegeben. Zur Humanantikörperbindung an die adhärenen Plättchen wurde für

15min im Dunkeln inkubiert, die Thrombozyten gewaschen (NaCl, pH 6.5) und in 10µl Glycerin PBS (pH 6.5, 1:3) aufgenommen. Die Auswertung der Reaktionen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

#### **2.2.1.3 Herstellung des Thrombozytenlysates**

Die Thrombozyten, die hierfür verwendet wurden stammen aus abgelaufenen Apherese-Konzentraten von HPA-1a und HPA-1b homozygoten Spendern der Blutgruppe O (Transfusionsmedizin, Gießen). Mindestens vier Doppelpräparate pro HPA-I-V Genotyp (1aa, 1bb) wurden aufgearbeitet, um eine ausreichende Proteinmenge zu isolieren.

Von jedem Blutspender wurden 250 bis 280 ml Plättchenkonzentrat hergestellt, in 50ml-Röhrchen umgefüllt und für 20 Minuten bei 4000xg abzentrifugiert. Das Pellet wurde dreimal mit 50ml Waschpuffer (10mM Tris, 3mM EDTA, 150mM NaCl, pH 7.4) bei 3500xg und Raumtemperatur für 20 Minuten gewaschen um Plasmareste zu entfernen. Die Plättchen von 3 Röhrchen wurden jeweils gepoolt, auf 50ml mit Waschpuffer aufgefüllt und gezählt. Die Thrombozyten wurden mit Lysepuffer (92% 20mM Tris-HCl pH 7.4 1% Triton X-100, 3% EDTA-Lösung (5% in NaCl), 4% Proteaseinhibitorcocktail) auf eine Konzentration von  $1 \cdot 10^{10}$ /ml eingestellt und für 1h auf Eis unter zwischenzeitlichem Vortexen (alle 10min) lysiert. Anschließend wurde der Zelldebris bei 17.000g für 45 min bei 4°C pellettiert. Der Überstand wurde gesammelt, erneut bei 17.000g bei 4°C pellettiert und in 50ml PP bei -70°C bis zur Proteinisolierung aufbewahrt.

#### **2.2.1.4 Kopplung von Gi5 an CNBr-aktivierte Sepharose**

Eine sehr universelle Variante zur Kopplung von Liganden, die eine primäre Aminogruppe besitzen, ist die Bromcyan-Methode (CNBr-Methode). Sie basiert auf der Reaktion der Hydroxylgruppen der Polysaccharidketten der Trägermatrix mit Bromcyan. Die dabei gebildeten Carbamate bzw. Imidocarbonate sind sehr reaktionsfähig und reagieren leicht mit Aminogruppen zu Isoharnstoffderivaten.

Für die Herstellung einer 10ml Affinitätssäule wurden drei Gramm Cyanbromid-aktivierte Sepharose 4B in einen 50ml Probenpuffer eingewogen, für 15min unter Rotieren in Aqua dest. zum Quellen belassen, über eine Fritte mit 600ml 1mM HCl für 15min langsam gewaschen und getrocknet. Zur Kopplung von 10mg mA-K Gi5 an die Sepharose wurde eine Übernachtinkubation in 7,5ml 2x Kopplungspuffer (0.2M NaHCO<sub>3</sub>, 1M NaCl, pH 8.3) bei 4°C durchgeführt. Ungebundene Antikörper wurden durch Waschen mit 100ml 1x Kopplungspuffer (0.1M NaHCO<sub>3</sub>, 0.5M NaCl, pH 8.3) entfernt und das Gel für 2h bei Raumtemperatur in einer Blockierungslösung (0.1M Tris, pH 8.0) inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose mit 200ml 1x Kopplungspuffer

und dann dreimal mit je 200ml Acetatpuffer (0.1M Na-Acetat, 0.5M NaCl, pH 4.0) und Tris-Puffer (0.1M Tris, 0.5M NaCl, pH 8.0) abwechselnd gewaschen. Zur Lagerung wurde die Sepharose in 30ml 1x Kopplungspuffer unter Zusatz von 0.01% NaN<sub>3</sub> in 50ml PP bei 4°C aufbewahrt.

#### **2.2.1.5 Isolierung von $\alpha$ IIB $\beta$ 3- Plättchenprotein aus Plättchenkonzentraten**

Die Affinitätschromatographie basiert auf der Eigenschaft von biologischen Makromolekülen, spezifisch und reversibel an andere Substanzen (Liganden) zu binden. Solche Interaktionen, die für die Affinitätschromatographie genutzt werden, bestehen z.B. zwischen Antikörper und Antigen oder Enzym und Substrat.

Für die Isolierung von  $\alpha$ IIB $\beta$ 3-Glykoprotein wurde die Affinitätschromatographie verwendet. Dazu wird die reversible Interaktion des Glykoproteins mit dem  $\alpha$ IIB $\beta$ 3-komplexspezifischen mAK Gi5 genutzt. Die Affinitätschromatographie setzt voraus, dass der Ligand (mAK Gi5) kovalent und irreversibel an eine wasserunlösliche polymere Matrix bindet. Als Gelmatrix diente Cyanbromid-aktivierte Sepharose 4B.

Für die Affinitätschromatographie wurden 7.5ml der mit Gi5 gekoppelten Sepharose in eine Säule (Amersham) gefüllt. Die Affinitätsmatrix wurde zunächst durch Waschen mit 1x Kopplungspuffer von NaN<sub>3</sub> Resten befreit. Vor dem Antigenauftrag wurde diese mit 50ml Waschpuffer A (0.05M Tris-HCl, 0.005M NaCl, 0.1% Triton X-100, pH 8.0), 30ml Waschpuffer B (0.1M Tris-HCl, 0.5M NaCl, 0.1% Triton X-100, pH 8.0) und 20ml Waschpuffer A (Flussgeschwindigkeit 60-80ml/h) equilibriert. Währenddessen wurde das Thrombozytenlysate aufgetaut, bei 3500U<sub>pm</sub> zentrifugiert und durch Millipore-Filter mit einer Porengröße von 0.45 $\mu$ m filtriert. Zur Bindung von gerinnungsaktiven Plasmaproteinen (z.B. Fibrinogen) wurde der Gi5-Säule eine Sepharose-Säule mit polyklonalem Maus-IgG (10mg) vorgeschaltet. Das vorbereitete Thrombozytenlysate wurde bei einer Flussgeschwindigkeit von 10ml/h über Nacht aufgetragen und der Durchlauf gesammelt. Nach beendeter Adsorption wurden die Säulen mit 100ml Waschpuffer A, 50ml Waschpuffer B und 50ml Waschpuffer A bei einer Flussgeschwindigkeit von 60-80ml/h gewaschen, um bei erhöhter Ionenstärke unspezifisch gebundene Komponenten zu entfernen.

#### **2.2.1.6 Elution des Glykoproteins $\alpha$ IIB $\beta$ 3 nach Adsorption**

Wesentlich für den Trennprozess ist die nachfolgende Elution. Die Dissoziation der gebundenen GPIIb/IIIa-Antigene von ihrem Liganden erfolgte durch eine starke Veränderung des pH-Wertes.

Die Elution der gebundenen  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 Proteine erfolgte unter sauren Bedingungen mit ca. 25ml Elutionspuffer (0,1M Tri Natriumcitrat Dihydrat, 0.1% Triton X-100, pH 2.0). Die zum Erreichen eines pH-Wertes von 7.2-7.4 erforderliche Menge an Neutralisationspuffer (1M Tris-HCl, pH 9.5),

wurde entsprechend vorgelegt. Die ersten 5ml des Proteineluates wurden getrennt von der Hauptfraktion gesammelt. Im Anschluss wurde die Säule mit ca. 50ml Waschpuffer A regeneriert und vor dem Verwahren (4°C) mit Kopplungspuffer und 0,1% NaN<sub>3</sub> aufgereinigt. Durch die Proteinreinigung entsteht eine Lösung, welche in ihrer Ionenstärke und Pufferzusammensetzung zur Lagerung ungeeignet ist. Um die Proteinlösung zu entsalzen, wurden die Eluate dialysiert. Dazu wurden Dialyseschläuche (6.-8.000 MWCO) in Aqua dest. für 30min eingeweicht und das Eluat auslaufgesichert in die Dialysemembran eingeschlossen. Dialysiert wurde gegen 3l PBS über Nacht bei 4°C unter langsamem Rühren. Anschließend wurden die Eluate mit einem Ultrafiltrationsmembransäulchen (YM-30) durch Zentrifugation bei 5000g (4°C) auf ein Endvolumen von ca. 1-4ml eingeengt. Nach Konzentrationsbestimmung wurden die Eluate portioniert und bei -70°C gelagert. Die Reinheit und Aktivität der Proteine wurde in der Silberfärbung und im Immunoblot mit mAK gegen die  $\alpha$ Ib- und die  $\beta$ 3-Untereinheit und humanen anti- $\alpha$ Ib $\beta$ 3-Seren überprüft.

### **2.2.1.7 Reinigung von monoklonalen Antikörpern über eine Protein G-Säule**

Monoklonale Antikörper (mAk) aus Hybridomaüberstand oder muriner Aszitesflüssigkeit wurden mit Hilfe der Affinitätschromatographie über eine 1ml Protein-G-Säule (Hi Trap™ Protein G HP, Amersham) aufgereinigt. Protein G ist ein Zellwandprotein aus Streptokokken der Gruppe C und G. Es besitzt eine starke Bindungsaffinität zur Fc-Region von Immunglobulin G, worauf ihre hohe Spezifität für IgG beruht. Diese Spezifität des Proteins G wird dazu verwendet, die meisten Nicht-IgG Kontaminanten aus der Probe zu entfernen.

Zelluläre Bestandteile in der Probe wurden abzentrifugiert (13.000Upm 10min 4°C), der Überstand im Verhältnis 1:2 mit Bindungspuffer (0,2M Natriumphosphat, pH 7.0) verdünnt und über Filter einer Porengröße von 0.45 $\mu$ m (Millipore) filtriert. Zu Beginn wurde die Protein G-Säule mit 5-8ml Aqua dest. gewaschen (1 Tropfen/sec, ca. 2ml/min) und mit 10-15ml Bindungspuffer equilibriert. Die vorbehandelte Probe wurde langsam auf die Säule aufgetragen und das Absorbat gesammelt. Nachfolgendes Waschen mit 20ml Bindungspuffer diente zur Entfernung unspezifisch gebundener Komponenten. Eluiert wurden die mAK mit 6ml Elutionspuffer (0,1M Glycin-HCl, pH 2.7) und in einem 50ml PP mit vorgelegtem Neutralisationspuffer (1M Tris-HCl, pH 9.0) aufgefangen (1. Fraktion). Anschließend wurde die Säule mit Bindungspuffer gewaschen, das gesammelte Absorbat für einen zweiten Lauf auf die Säule gegeben und alles wiederholt (2. Fraktion). Zur Regeneration wurde die Protein- G-Säule mit 5M Guanidin-Hydrochlorid-Lösung befüllt und für 30-60min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Säule mit 5ml Bindungspuffer (0.2M Natriumphosphat pH 7.0) gewaschen und mit warmem Triton X-100 (0.1% in Aqua dest.) für 1min bei 37°C inkubiert.

Die Säule wurde mit Aqua dest. und Bindungspuffer gewaschen, mit 20% Ethanol befüllt, geschlossen und bei 4°C gelagert. Die Eluate wurden über Nacht gegen 1l PBS in Dialyseschläuchen (6.-8.000 MWCO) bei 4°C dialysiert und mit Ultrafiltrationsmembransäulchen (YM-50 Säulen) bei 5000g auf ein Volumen von 1ml eingengt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration im BCA-Assay (Pierce) wurden die Antikörper portioniert und bei -70°C gelagert.

### 2.2.1.8 IgG-Aufreinigung aus Humanseren/-plasmen

Im Gegensatz zum klassischen Verfahren der Protein-A/G-Affinitätschromatographie wurden stark vertretene, aber für die spezifische Immunreaktion irrelevante, Proteine aus dem Serum entfernt. Dafür wurde das Melon<sup>TM</sup> Gel-IgG-Spin-Purification-Kit (Pierce) entsprechend Herstellerprotokoll verwendet.

Humane Plasmen wurden zuvor mit 12.5mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung im Verhältnis 1:1 für 30min bei 37°C inkubiert. Zur IgG-Präparation wurden 50µl der Seren in 450µl Aufreinigungspuffer (Pierce) verdünnt. Die Aufreinigungssäulchen (Pierce) wurden mit 500µl Melon-Gel (Pierce) beladen und dreimal bei 4000Upm für 30s gewaschen. Zu 300µl Aufreinigungspuffer (Pierce) wurden 500µl der verdünnten Seren zugegeben. Nach 5-minütiger langsamer Rotation wurde das IgG durch Zentrifugation (4000Upm für 1min) in der Negativfraktion gewonnen. Die IgG-Fraktion wurde über Nacht in Dialysekartuschen gegen 500ml PBS (Laufpuffer) dialysiert und mit einem Filter (0.22µm) filtriert. Die Proteingesamtkonzentration wurde im BCA-Assay (s. unten) bestimmt.

### 2.2.1.9 Quantitative Bestimmung von Proteinkonzentration

Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass das Natriumsalz der Bicinchoninsäure mit Cu-Ionen, die durch die Aminosäuren Serin, Cystein oder Threonin der Proteine von Cu<sup>2+</sup> zu Cu<sup>+</sup> reduziert werden, in alkalischer Lösung einen farbigen Komplex bildet. Dieser Komplex kann anhand der Extinktion bei einer Wellenlänge von 562nm photometrisch detektiert werden. Mittels einer Standardkurve wurde der Proteingehalt der zu untersuchenden Probe errechnet. Die Durchführung erfolgte nach den Anweisungen des Herstellers.

Nach der Methode von Smith et al (Smith, et al., 1985) und Shihabi (Shihabi, et al., 1988) wurde die Bestimmung des gesamten Proteingehalts einer Probe vorgenommen.

Es wurde ein BCA-Kit (Pierce, Niederlande) verwendet. Thrombozytenlysate wurden im Verhältnis von 1:10 und 1:50 verdünnt und ausgetestet. Dazu wurden 25µl der jeweiligen Probenverdünnungen mit 200µl gebrauchsfertigem BCA-Reagenz in einer Mikrotiterplatte für 30min bei 37°C inkubiert und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 562nm abgelesen.

Tab. 2-4 Lösungen zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Lösungen	Komponenten	Konzentration
BSA-Standardlösung	Rinderserumalbumin Natriumchlorid Natriumazid	2% 155mM 8mM
BCA-Testreagenz A	Natriumcarbonat Bicinchoninsäure Natriumtartrat	Kit-Zusammensetzung
BCA-Testreagenz B	Kupfersulfat	128mM
BCA-Reagenzlösung	BCA-Testreagenz A BCA-Testreagenz B	98% (v/v) 2% (v/v)

### 2.2.1.10 Sodiumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Proteins im elektrischen Feld hängt neben seiner Größe auch von seiner Ladung ab. Bei der SDS-PAGE werden die Proteine mit Natriumdodecylsulfat denaturiert und erhalten dadurch eine definierte negative Ladung. Um zusätzlich eine schärfere Bandentrennung zu erreichen, wird über dem Trenngel ein Sammelgel gegossen, in dem die Proteine fokussiert werden.

Für die Elektrophorese besteht das Gel aus einem Trenngel und einem Sammelgel. Je nach Größe der zu trennenden Moleküle verwendet man Gele unterschiedlicher Porosität. Das Trenngel bestand aus 7,5% Acrylamid mit einem Zusatz von 0,2% Bisacrylamid. Um eine gerade Geloberfläche zu gewährleisten, wurde das gegossene Trenngel mit Propanol überschichtet bis es vollständig polymerisiert war. Nach Entfernen des Propanols wurde ein 5% acrylamidhaltiges Sammelgel aufgegeben und ein Probenkamm eingesetzt. Durch den Radikalstarter Ammoniumpersulfat (APS) und den Katalysator Tetramethyldiamin (TEMED) wurde die Polymerisationsreaktion im Trenn- und Sammelgel vorgenommen. Um Proteinproben im nichtreduzierten Zustand aufzutrennen wurden pro 100µl Proteinprobe in Auftragspuffer 25µl bidestilliertes Wasser gegeben. Diese Lösung wurde für 5min gekocht, kurz abzentrifugiert und aufgetragen. Dagegen wurde zu je 100µl Proteinprobe 25µl einer 200mM DTT-Lösung gegeben und für 10min bei Raumtemperatur und leichtem Schwenken inkubiert, um die Proteinproben unter reduzierten Bedingungen aufzutrennen. Für Molekulargewichtsbestimmungen von Proteinen bzw. Proteinuntereinheiten sind Proteinstandards als Eichsubstanzgemische kommerziell erhältlich. Hierfür wurde in einer Gelspur ein Molekulargewichtsstandard aufgetragen, um zwischen den unterschiedlich weit gewanderten Proteinen eine Korrelation herzustellen. Nach der Aufgabe der Proteinproben in die Sammelgeltaschen wurde an das Gel eine Stromstärke von 15mA angelegt. Die Stromstärke wurde auf 30mA erhöht sobald die Silbernitratbande in das Trenngel gewandert war. Wenn die Markierungsbande den Boden des Trenngels erreichte, wurde die Elektrophorese beendet und entweder das

Gel für mindestens 1h in Methanol-Essigsäure-Lösung für die Silberfärbung fixiert oder zum Western-Blotting direkt weiterverwendet.

#### **2.2.1.11 Nachweis und Quantifizierung von getrennten Proteinen mit Silberfärbung**

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Zunächst werden die Proteine durch eine Fixierlösung aus 10% Eisessig und 30% Ethanol im Gel denaturiert und fallen aus. Ein weiteres Wandern der Proteine ist damit unmöglich. Vor der Färbung wurde das Gel dreimal 5min in Aqua dest. gewaschen, um den zur Komplexbildung der  $\text{Ag}^+$  Ionen durch Proteine erforderlichen neutralen pH zu generieren. Nach mehrmaligem Waschen mit Wasser wird das Gel in einer Silbernitratlösung inkubiert (0,1% Silbernitrat, 0,2% Formaldehyd mit Aqua dest.). Dadurch lagern sich Silberionen an die Proteine an. Überschüssiges Silber wird mit Wasser abgewaschen. Abschließend folgt der Entwicklungsschritt. Durch Zugabe von alkalischem Formaldehyd (2,5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,1% Formaldehyd) werden die Silberionen zu elementarem Silber reduziert. Dieses färbt die Stellen, an denen Proteine vorhanden sind, schwarz. Die Reaktion wurde für 10min in 1,5%  $\text{Na}_2\text{-EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$  gestoppt um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu verhindern.

#### **2.2.1.12 Westernblot**

Beim Westernblot werden Proteine auf spezielle Membranen transferiert um sie mit immunhistochemischen Methoden detektieren zu können (Towbin, 1979). Dazu werden die Proteine mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend werden sie auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit spezifischen Antikörpern detektiert.

Das Gel und die Nitrozellulose-Membran wurden im Puffer B (30% Ethanol, 0,125% Glutaraldehyd, 0,2%  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 0,5M Na-Acetat) für ca. 5min äquilibriert. Anschließend wurden die Proteine aus dem Gel auf die Nitrozellulose-Membran übertragen (90min, 45mA, 10Watt). Die Membran wurde in eine Glasschale überführt und 1h mit 10ml Blockierungslösung (1,5% BSA in ECL-Waschlösung) bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran mit 50 $\mu\text{g}$  mAk SZ22 (Anti-GPIIb) und 5 $\mu\text{g}$  mAk SZ21 (Anti-GPIIIa) in 10ml Blockierungslösung für eine Stunde bei RT versetzt. Der überschüssige Antikörper wurde durch fünfmaliges Waschen mit ECL-Waschlösung (20mM Tris, 150mM NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7.4) entfernt. Danach wurde die Membran für 45min bei RT mit 2ml peroxidase markiertem Kaninchen-Anti-Maus-IgG (1:100.000) inkubiert. Nachdem die Membran gründlich (dreimal 15sec, einmal 15min, dreimal 5min) gewaschen wurde, wurden die biotinylierten Glykoproteine mit der Substratlösung (ECL Plusreagenz) für 5min inkubiert und die Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm (Kodak X-OMAT AR) detektiert.

### 2.2.1.13 Strippen von Membranen

Zur Wiederverwendung von Nitrozellulosemembranen wurden Primär- und Sekundärantikörper mit 0,4M Glycin-HCl (3x30min RT) oder 0,4M NaOH (1x30min RT) behandelt, die Membran mit TBS gewaschen und über Nacht mit 1,5% Rinderalbumin-Blockierungslösung bei 4°C inkubiert.

### 2.2.1.14 Detektion von Komplementbindung: Mikrokomplementbindungstest

In der Mikrokomplementbindungsreaktion (MKBR) dienen Erythrozyten als Indikatoren für Antigen-Antikörper-Reaktionen. Bei dieser Reaktion müssen die Erythrozyten (meist vom Schaf) einer speziellen Vorbehandlung unterzogen werden ('Sensibilisierung'). Das Serum eines mit Schafserythrozyten immunisierten Kaninchens wird *in vitro* mit gewaschenen Schafserythrozyten inkubiert, nachdem zuvor das in Serum natürlicherweise vorhandene Komplement durch Hitzebehandlung (i.d.R. 30min bei 56°C) inaktiviert worden ist. Die mit Kaninchen-Antikörpern inkubierten Schafserythrozyten werden rasch zerstört, sobald sie mit aktivem Komplement (z.B. aus Meerschweinchen-Serum) in Kontakt kommen. Diese antikörperabhängige komplementvermittelte Zytolyse ist ohne optische Hilfsmittel makroskopisch erkennbar (als Hämolyse) und eignet sich bei entsprechender Versuchsanordnung daher hervorragend als indirektes Indikatorsystem für antigengebundene Antikörpermoleküle.

Die MKBR wurde in folgender Weise durchgeführt: Humane Antiseren oder Plasmen wurden zuvor für 30min bei 56°C hitzeinaktiviert und mit NaCl im Verhältnis 1:2 verdünnt. 5ml Hammelblutkörperchen (HBK) (Dade Behring) wurden dreimal in physiologischer NaCl-Lösung gewaschen (3000Upm 15min). 0,6ml dieser HBK wurden mit 9,4ml NaCl gemischt (HBK-Suspension). Die Hämolyse wurde photometrisch bestimmt um eine konstante Konzentration einzustellen. Dazu wurden 2,9ml Aqua dest. mit 0,1ml der HBK-Suspension gemischt und die Extinktion bei 546nm (Filter Hg) gegen Aqua dest. als Leerwert gemessen. 10ml der eingestellten HBK wurden mit 10ml eines Kaninchen anti-HBK-Antikörpers (Ambozeptorlösung 1:2000 in NaCl, Dade Behring) gemischt, für 30min bei 37°C im Brutschrank unter Schütteln und anschließend für 30min bei 4°C inkubiert. Die HBK wurden immer am Versuchstag sensibilisiert (sHBK) und bei 4°C aufbewahrt. Unmittelbar vor Testbeginn wurden die sHBK noch mit gleichen Volumenanteilen an NaCl gemischt. Das Komplement (aus Meerschweinchen, Dade Behring) wurde entsprechend der Komplementtitrationsauswertung in Titern von 1:30-1:40 eingesetzt. Zum Ansetzen der Komplementbindungsreaktion wurden 2µl der inaktivierten Seren und 2µl Komplement (oder NaCl als Negativkontrolle) mit einer Hamilton-Mikroliterspritze (100µl) auf eine Mikrottestplatte pipettiert. Nach 1h bei 37°C wurden 2µl der 1:2 verdünnten sHBK-Suspension

zugegeben, 30min bei 37°C inkubiert und der Hämolysegrad zunächst makroskopisch auf einem Leuchtkasten beurteilt.

Während der einstündigen Inkubation erfolgt die Bindung vorhandener, zur Komplementaktivierung befähigter Antikörpermoleküle an das zugesetzte Antigen, daraufhin findet die Bindung der Meerschweinchen-Komplementfaktoren an die entstandenen Immunkomplexe und schließlich die Erschöpfung der Komplementaktivität statt. Tropft man nun in die Nöpfchen der Mikrotiterplatte sensibilisierte Schafserythrozyten, werden sie nicht lysiert und bilden ein kreis- oder ringförmiges Sediment ("Knopf"). In den Reaktionsansätzen, in denen die entsprechenden spezifischen und gleichzeitig komplementbindenden Antikörper nicht ausreichend oder überhaupt nicht vorhanden sind, wird das zugesetzte Meerschweinchen-Komplement die Lyse der sensibilisierten Erythrozyten bewirken, sodass die Knopfbildung ausbleibt. Die Reaktion wird folgendermaßen ausgewertet: Ein Hämolysegrad 4: > 80% gilt als negativer Antikörpernachweis. Der Grad 3: 50%–75% wird als ganz schwacher Antikörpernachweis bezeichnet. Wenn der Grad 2: 25%-50% vorliegt, spricht man von einem schwachen Antikörpernachweis. Dagegen gilt Grad 1 als deutlicher Antikörpernachweis. Betrug der Hämolysegrad 0, entsprach dieser einem starken Antikörpernachweis.

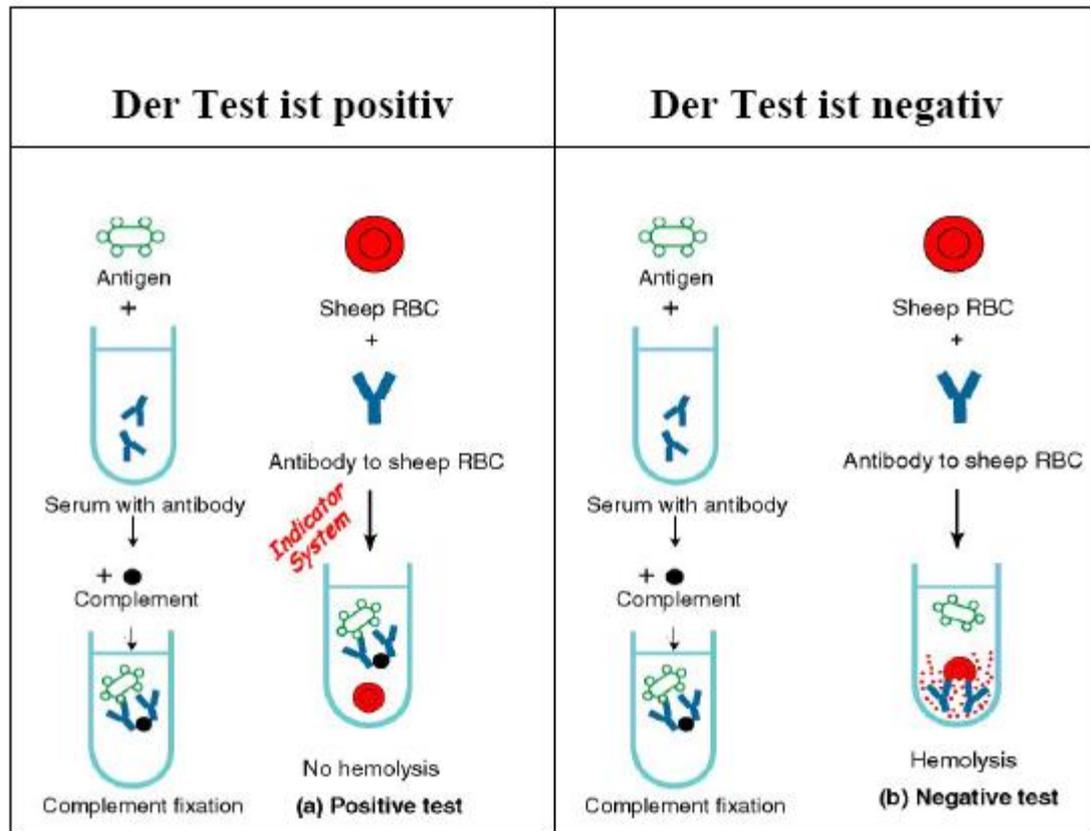


Abb. 2-1 Prinzip der MKBR: sind im Serum Antikörper enthalten, wird das Komplement durch den Antigen-Antikörper-Komplex verbraucht. Die Erythrozyten bleiben intakt. Somit fällt der Test positiv aus. Enthält das Serum dagegen kein Antikörper, steht das Komplement zur Verfügung, was zur Lyse der Erythrozyten führt

### 2.2.1.15 Polyethylenglykolpräzipitation

Das hydrophile, ungeladene Polymer Polyethylenglykol konkurriert mit den Proteinen in wässriger Lösung um das Hydratationswasser und führt ab einer bestimmten Konzentration, die von der Proteinkonzentration und dem Polymerisationsgrad des PEGs abhängt, zu einer reversiblen Fällung des Proteins. Diese Methode ist sehr schonend für Proteine und wird daher häufig auch bei der Proteinkristallisation eingesetzt. Anders als bei einer Fällung mit Ammoniumsulfat müssen PEG-gefällte Proteine nicht vor ihrer weiteren Verwendung entsalzt werden. Das PEG kann aus dem Proteinpellet durch Dialyse entfernt werden.

Polyethylenglykol 6000 (BDH Chemikalien Ltd., Dorset) wurde in Borat-Puffer (0-1M Borsäure, 25mM Natriumtetraborat, 75mM NaCl, pH 8.4) aufgelöst, um eine 12,5%-ige Stammlösung herzustellen. 50µl Borat-Puffer und 50µl 0,2M EDTA wurden zu 0,3ml Serum hinzugefügt und die Lösungen kurz gemischt. 0,1ml einer 12,5%-igen PEG-Lösung wurden zugegeben, kurz gemischt und bei 4°C für 90min geschwenkt. Die Probe wurde dann bei 1700 x g und 4°C für

10min abzentrifugiert. Nach Ausfällen der Immunkomplexe wurde der Überstand abgenommen und direkt für weitere Versuche verwendet oder bei 4°C aufgelagert.

### **2.2.2 Durchflußzytometrie**

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie wurde die Bindung der Komplementkomponente C1q an Immunkomplexe bestehend aus Plättchenantigen und -antikörper detektiert. Zunächst wurde das aufgereinigte  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 Protein (HPA-1a und -1b Isoform) über eine Streptavidin-Biotinbindung an Dynal M-280 Beads immobilisiert. Gebundenes C1q wurde über einen FITC-konjugierten Sekundärantikörper durchflußzytometrisch (FACS-Calibur) detektiert. Die markierten Beads gelangten in die mit isotoner Hüllstromflüssigkeit gefüllte Durchflussszelle des Durchflußzytometers. Dort werden sie in den Hüllstrom aufgenommen und durch dessen Geschwindigkeit einzeln im Zentralstrom aufgereiht. Nach Passieren des fokussierten Laserstrahls (488nm) wurde das Streulicht (Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht) bzw. das von den Fluoreszenzfarbstoffen nach Anregung emittierte Licht über eine Linse in ein optisches Detektionssystem weitergeleitet, für jedes einzelne Partikel quantifiziert und proportional zu Lichtintensität, in elektrische Impulse umgewandelt. Diese wurden dem Rechner zugeleitet und dort ausgewertet.

### **2.2.3 Antigen-Beschichtung der Partikel**

#### **2.2.3.1 Herstellung der GPIIb/IIIa-Streptavidin-Partikel**

Die Beladung der Partikel mit spezifischen Antigenen erfolgte mit einem Biotin-Streptavidin-System. Die chromatographisch aufgereinigten Antigene wurden mit Biotin markiert und anschließend an die Streptavidin-Partikel (M-280; Dynal, Hamburg) gekoppelt. Die Streptavidin-Partikel (Durchmesser 2,8 $\mu$ m; Dichte 1,4g/cm<sup>3</sup>) sind aus rotem Polystyrol hergestellt und besitzen paramagnetische Eigenschaften. Diese Eigenschaften erleichtern die Waschschriffe während des Kopplungsverfahrens. Durch die Rotfärbung sind die Partikel in der Gelmatrix leicht zu erkennen.

#### **2.2.3.2 Durchführung der GPIIb/IIIa-Biotinylierung**

Biotin ist ein Vitamin (MW 244Da), das als Co-Faktor der Carboxylasen fungiert. Biotin reagiert mit  $\epsilon$ -amino-Gruppen des Lysins und des Tyrosins (NHS-Biotin) unter Bildung einer Amin-Bindung. Da Antikörper auch im Bereich der variablen Regionen Lysin enthalten können, kann die Biotinylierung zu einem Verlust der Antigenbindung führen. Um diesen Effekt auszuschließen oder zu reduzieren, muss für jeden Antikörper eine optimale Biotinkonzentration (Biotin-Überschuss) gefunden werden, bei der die funktionellen Bereiche der Antikörperbindung nicht gestört werden (Diamandis, et al., 1991). Um eine optimale Biotinylierung zu erreichen, wurde eine Ratio von 20Mol

Biotin zu 1Mol GPIIb/IIIa festgelegt. Die Folgenden Gleichungen zeigen wie die erforderliche Menge an Biotin berechnet wird:

Zunächst wurde die Menge an GPIIb/IIIa ausgerechnet, die benötigt wurde. Betrag z.B. die Konzentration des GPIIb/IIIa Proteins nach der BCA-Proteinbestimmung 0,5mg/ml ergibt sich folgende Rechnung:

Da 100µl GPIIb/IIIa für den Versuch gebraucht wurden, wurde die Menge an Protein gerechnet, die in 100µl enthalten sind: dabei entspricht

$$\begin{aligned} 1\text{ml} &\triangleq 0,5\text{mg Protein} \\ 100\mu\text{l} &\triangleq X\text{mg} \\ X &= 50\mu\text{g} \end{aligned}$$

Das Protein GPIIb/IIIa hat ein Molekulargewicht von  $\approx 235\text{kDa} \approx 235 \cdot 10^3 \text{g/mol}$ .

Daraus errechnet sich die Menge in mmol wie folgt:

$$0,05 \cdot 10^{-3} \text{g} / 235 \cdot 10^3 \text{g/mol} = 2,12 \cdot 10^{-10} \text{mol} = 2,12 \cdot 10^{-7} \text{mmol}$$

Die Menge an Biotin, die benötigt wurde muss in 20-fachem Überschuss zugegeben werden:

$$\Rightarrow 20 \times 2,12 \cdot 10^{-7} \text{mmol} = 42,4 \cdot 10^{-7} \text{mmol} = 4,24 \cdot 10^{-6} \text{mmol} = 4,24 \cdot 10^{-9} \text{mol}$$

Die Menge an Biotin in g berechnet sich wie folgt:

das Molekulargewicht von Biotin beträgt: 556g/mol

$$\begin{aligned} 556\text{g} &\triangleq 1\text{mol} \\ X\text{g} &\triangleq 4,24 \cdot 10^{-9} \text{mol} \\ X &= 4,24 \cdot 10^{-9} \text{mol} \cdot 556\text{g} / 1\text{mol} = 2,357\mu\text{g} \end{aligned}$$

2,357µg ist die Menge an Biotin, die für einen Versuch nötig war.

Zunächst wurde 1mg des lyophilisierten Sulfo-NHS-LC-Biotins (Pierce, Rockford, IL, USA) auf Raumtemperatur gebracht und in 1ml PBS gelöst (1mg/ml). 50µg des gereinigten GPIIb/IIIa-Komplexes in 100µl PBS wurden mit der entsprechenden Biotinlösung für eine Stunde bei RT auf dem Rotor inkubiert. Anschließend wurden die freien überschüssigen Biotin-Moleküle nach einer Stunde Inkubation durch Zentrifugation über einen YM-50-Filter (Millipore) bei 14000 x g und 4°C für 10min entfernt. Biotinmarkierte GPIIb/IIIa wurden nun in 100µl PBS aufgenommen und für die Immobilisation direkt verwendet. Streptavidin-Partikel wurden mit den biotinylierten GPIIb/IIIa im Verhältnis 1:1 (v/v) bei RT für 60min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die beschichteten Partikel mit Hilfe eines Partikelkonzentrators dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Partikel in

Partikelpuffer (DiaMed AG, Cress Morat, Schweiz) resuspendiert und bis zur Testung bei 4°C aufbewahrt (max. 4 Wochen).

### **2.2.3.3 Durchflusszytometrischer Komplementbindungstest**

Die mit dem aufgereinigten  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 Protein beschichteten Partikel wurden zur Detektion der antikörpervermittelten Komplementbindung verwendet. 10 $\mu$ l der HPA-1a- oder HPA-1b- Beads wurden mit 20 $\mu$ l inaktiviertem (30min 56°C) AB-Serum oder anti-HPA-1a-Seren für 30min bei 37°C inkubiert. Ein doppelter Ansatz wurde durchgeführt. Nach dem Waschen wurden jeweils 2,5 $\mu$ g der Komplementkomponenten C1q (Sigma, Saint Louis, USA) für 30min bei 37°C einen Ansatz zugegeben. Ein zweiter Ansatz diente als Kontrolle und wurde ohne Komplement weiter untersucht. Über einen gegen Komplement gerichteten, FITC- markierten Sekundäantikörper, wurde gebundenes C1q durchflusszytometrisch (FACS Calibur) detektiert. Um die Qualitätskontrolle des Systems zu überprüfen wurden zwei monoklonale Antikörper vergleichend getestet: der monoklonale Antikörper Gi5, der gegen GPIIb/IIIa gerichtet ist, und der gegen GPIa/IIa gerichtete Gi9. Damit wurde die spezifische Bindung des GPIIb/IIIa-Proteins an die Blutplättchen kontrolliert.

Außerdem soll der doppelte Ansatz des Versuchs durch die Inkubation der Seren einmal ohne und einmal mit Komplement dazu beitragen, die Fähigkeit der an Blutplättchen gebundenen Ak das Komplement zu fixieren, zu beurteilen.

### 3 Fragestellung

Die Autoimmunthrombozytopenie (ITP) gehört mit einer Inzidenz von ca. 5,8-6,6 pro 100.000 Erwachsene mit zu den häufigsten Ursachen einer gestörten zellulären Gerinnung. Da Patienten mit Autoimmunthrombozytopenie ein sehr variables klinisches Bild zeigen und Unklarheit über die diagnostische Aussagekraft verschiedener, potenziell hilfreicher Biomarker der Erkrankung besteht, gilt nach wie vor die Diagnose einer ITP als klassische Ausschlussdiagnose (George, et al., 1996) .

Bei einer Autoimmunthrombozytopenie sind die Mechanismen der Elimination von Blutplättchen aus dem Blutkreislauf nur unzureichend geklärt. Drei dieser Mechanismen sind bekannt und in der Literatur mehrfach beschrieben worden:

- T-Zell-Elimination
- Fc $\gamma$ -Rezeptor vermittelte –Phagozytose
- Komplementabhängige Elimination

Trotz der rasanten Entwicklung, der erheblichen Verbesserung und der Vielfalt der Nachweismethoden und Testverfahren bleibt die Bedeutung der Labordiagnostik zweifelhaft, da bei manchen Testverfahren die Spezifität, bei anderen die Sensitivität unbefriedigend ist. Wichtige Fragen bezüglich klinischer Diagnostik und Verlauf der ITP sind unzureichend oder gar nicht beantwortet. Einige dieser offenen Fragen sollen mit dieser Arbeit beantwortet werden. Dazu gehören folgende Fragen:

Warum ist die Sensitivität gängiger Testverfahren so niedrig?

Gibt es eine Möglichkeit, die Sensitivität dieser Testverfahren zu erhöhen?

Warum ist das klinische Bild bei der Autoimmunthrombozytopenie so variabel?

Wie können Blutplättchen so schnell abgebaut und aus dem Blutkreislauf eliminiert werden, obwohl keine messbaren Antikörper auf den Blutplättchen detektierbar sind?

Da die Autoantikörper gegen Thrombozyten nach herrschender Meinung den zentralen Krankheitsmechanismus der ITP darstellen, sollte der spezifische Nachweis dieser Autoantikörper eine diagnostische Relevanz haben. Wie im Kapitel (1.7.4 MAIPA, Seite 38) erwähnt, gilt der MAIPA-Test mit einer Spezifität von 78% bis 100% und einer Sensitivität von 38,9% bis 56,4% als Goldstandard (George, et al., 1996). Die Frage, warum die Sensitivität dieses Testverfahrens so

niedrig ist, konnte bisher nur unzureichend beantwortet werden. Daraus resultieren unter anderem zwei bisher ungeklärte Fragen, die Gegenstand dieser Arbeit sind:

1. Ein beschleunigter Abbau von Thrombozyten ist Folge der Bindung von Antikörpern, die gegen Zellmembranbestandteile der Thrombozyten gerichtet sind. Da Blutungskomplikationen unterschiedlicher Ursachen bei Thrombozytopenien verschieden therapiert werden, ist die Diagnose von Immunthrombozytopenien durch den Nachweis der auslösenden Antikörper für die Diagnostik relevant. Hieraus ergibt sich die erste wichtige Frage:

Suchen wir nach dem falschen Antikörper?

Folgende Arbeitshypothese wurde aufgestellt: Kann eine Ausweitung der Zielantigene (insbesondere auf die Antigene GPV, GPIa/IIa, GPVI und CD62), die Erfassung weiterer Antikörperklassen (IgM, IgA) oder der Einsatz verschiedener immobilisierender Antikörper dazu beitragen, die Sensitivität zu verbessern? Dazu sollen Antikörper gegen GPV bei Patienten mit Verdacht auf ITP untersucht werden, um die Bedeutung dieses Glykoproteins als Zielantigen bei der Entwicklung der ITP zu beurteilen. Außerdem soll geklärt werden, ob der Ansatz von GPV zusätzlich zu GPIIb/IIIa und GPIb/IV zu einer Verbesserung der Sensitivität des MAIPA-Tests führt.

2. Bei vielen Autoimmunerkrankungen wird die Beteiligung des Komplementsystems beschrieben, so z.B. beim systemischen Lupus erythematoses (SLE). In den letzten Jahren sind bedeutende Funktionen des Komplementsystems bezüglich Immunregulation, Toleranzinduktion und Apoptose aufgedeckt worden. Daraus ergaben sich jedoch völlig neue und wichtige Bedeutungen des Komplementsystems für Autoimmunerkrankungen. Aufgrund dieser wegweisenden Erkenntnisse hat die Bestimmung von Komplement bei diesen Erkrankungen an Bedeutung gewonnen. Seine Beteiligung bei der Entwicklung der Autoimmunthrombozytopenie wurde mehrfach beschrieben (Kurata, et al., 1985; Hed, 1998; McMillan, 2007).

Da wir beobachten konnten, dass bei Patienten, bei denen mit den bekannten Nachweisverfahren die wenigen Antikörper nicht messbar sind, die Blutplättchen trotzdem schnell abgebaut werden, stellt sich folgende wichtige Frage:

Welcher Mechanismus ist für den schnellen Abbau der Thrombozyten verantwortlich?

Es ist bekannt, dass Antikörper auf Blutplättchen Komplement fixieren können (Hed, 1998).

Klinik und Verlauf deuten darauf hin, dass die Autoimmunthrombozytopenie in vielen Varianten verlaufen kann. Diese Erkenntnisse werfen weitere Fragen auf: Findet bei

manchen ITP-Formen eine Komplementaktivierung statt? In wieweit konnte das Komplement einer der modulierenden Faktoren sein?

Und schließlich, wenn die Komplementaktivierung eine Bedeutung bei der Entwicklung der ITP haben sollte: Kann Ihr Nachweis von diagnostischer Relevanz sein? Hilft uns das Komplementsystem bei den Fortschritten in der Therapie der ITP, indem es eine zügige und sichere Diagnostik unterstützen kann?

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Untersuchungen zum Nachweis von Autoantikörper gegen GPV

In dieser Arbeit wurden Antikörper gegen das Glykoprotein GPV bei Patienten mit Verdacht auf ITP untersucht. Das Ziel dabei war, die Bedeutung dieses Glykoproteins als Zielantigen bei der Entwicklung der ITP zu beurteilen. Außerdem sollte sichergestellt werden, ob der Ansatz von GPV zusätzlich zu GPIIb/IIIa und GPIb/IV zu einer Verbesserung der Sensitivität des MAIPA-Tests führt. Der MAIPA-Test mit einer Spezifität von 78% bis 100% und einer Sensitivität von 38,9% bis 56,4% gilt bis heute als Goldstandard in der Labordiagnostik der ITP (George, et al., 1996).

Tab. 4-1 Spezifität und Sensitivität des MAIPA-Tests in ITP

Studie	ITP-Patientenzahl (n)	Sensitivität	Spezifität
(Kiefel, et al., 1996)	78	46,2%	100%
(Brighton, et al., 1996)	81	49%	78%
(Warner, et al., 1999)	49	39%	91%
(Hagenstöm, et al., 2000)	18	38,9%	96,7%
alle	226	45,1%	91,2%

Eine mögliche und plausible Erklärung für einen negativen Befund des direkten MAIPA-Tests bei ITP-Patienten ist, dass die Autoantikörper dieser Patienten gegen andere Glykoproteine auf der Thrombozytenmembran gerichtet sind, die in diesem Test nicht untersucht werden.

Etwa die Hälfte aller ITP-Patienten kann mit dem Test nicht identifiziert werden (Brighton, et al., 1996; Warner, et al., 1999; Hagenstöm, et al., 2000). Immer wieder wurde spekuliert, ob eine Autoimmunisierung gegen andere Rezeptoren auf der Oberfläche von Blutplättchen von Relevanz sein könnte. Eine Reihe von Zielantigenen wurden untersucht u. a. GPIa/IIa (Kiefel, 1992), GPVI (Boylan, et al., 2004), GMP140 (CD62) (Bierling, et al., 1994), CD9 (Yanabu, et al., 1993), JAM-A (Sobocka, et al., 2000) und nicht zuletzt JAM-C (Santoso, et al., 2002). Keines dieser oben erwähnten Antigene scheint eine wichtige Rolle als Zielantigen der ITP zu spielen.

Es stellt sich die Frage, ob eine Ausweitung der Zielantigene (insbesondere auf die Antigene GPV, GPIa/IIa, GPVI und CD62), die Erfassung weiterer Antikörperklassen (IgM, IgA) oder der Einsatz verschiedener immobilisierender Antikörper dazu beitragen kann, die Sensitivität des MAIPA-Tests zu verbessern?

Das Glykoprotein GPV wurde in Zusammenhang mit virusinduzierter und medikamentabhängiger Thrombozytopenie beschrieben (Greinacher, et al., 2001; Garner, et al., 2002). GPV ist ein Teil des GPIIb/IX-Komplexes und reguliert die Antwort der Thrombozyten auf Kollagen und Thrombin (Moog, et al., 2001; Ramakrishnan, et al., 2001).

EDTA-antikoaguliertes Vollblut von 9.421 Patienten mit Thrombozytopenie wurde über einen Zeitraum von 8 Jahren (2000-2007) unserem Labor zur Verfügung gestellt.

Eine kurze Anamnese der Patienten einschließlich der vorläufigen Diagnose wurde vom behandelten Arzt des Patienten zur Verfügung gestellt. Begleitende Erkrankungen, früherer Bluttransfusionen und Schwangerschaften, wichtige klinische Befunde (Lymphknoten, Milz, Leber, Knochenmark) und Laborparameter (vollständiges Blutbild, Laktat-Dehydrogenase-Aktivität, Bilirubin, Haptoglobin, Thromboplastin-Zeit und partielle Thrombinzeit) wurden über einen Standardfragebogen erfasst. Von den Patienten wurde zusätzlich ein komplettes Blutbild erstellt (KX-21N, Sysmex Europe GmbH, Germany).

Von den 9.421 Blutproben wurden für die weiteren Untersuchungen solche ausgenommen, die folgende Kriterien aufwiesen:

- Patienten mit einer Thrombozytenzahl mehr als  $140 \times 10^9/L$
- Patienten, deren klinischen Daten nicht rechtzeitig herbeigeführt werden konnten
- und Patienten, von denen eine ausreichende Menge von Thrombozyten nicht isoliert werden konnte, um alle Laboruntersuchungen durchzuführen.

Somit verblieben 4.217 verwertbare Blutproben. In diesem Kollektiv von 4.217 Patienten konnten freie reaktive Antikörper bei 755 Proben im PAIFT detektiert werden.

Thrombozytengebundene Antikörper wurden im direkten MAIPA bei 657 Probanden nachgewiesen. In den meisten Proben wurde eine Mischung aus Thrombozytengebundenen Antikörper gegen GPIIb/IIIa, GPIIb/IX und/oder GPV festgestellt (379 Proben, 58%). Die meisten dieser Proben (248 Proben, 38%) enthalten Antikörper gegen alle drei Glykoproteine. Bei Kombinationen von zwei Entitäten wurden bei 21% Antikörper detektiert.

Im Gegensatz zu den Proben, die alle drei Antikörper enthalten, wurde in 276 Proben (42%) Antikörper gegen einen einzigen Glykoproteinkomplex nachgewiesen, von denen:

- 140 (21%) gegen GP IIb/IIIa
- 72 (11%) gegen GPIIb/IX
- 64 (10%) gegen GPV gerichtet waren.

Demgegenüber wurde unter den insgesamt 657 in MAIPA positiv getestete Proben folgendes nachgewiesen:

- in 476 (72%) Antikörper gegen GPIIb/IIIa allein und in Kombination mit GPIb/IX und/oder GPV
- in 402 (61%) Antikörper gegen GPIb/IX allein und in Kombination mit GPIIb/IIIa und/oder GPV
- in 406 (62%) Antikörper gegen GPV allein und in Kombination mit GPIIb/IIIa und/oder GPIb/IX.

Bei Patienten mit Anti-GPV als einzigen spezifischen Antikörper wurde nach ausführlicher Analyse der Daten und Befragungen durch den behandelnden Arzt folgendes festgestellt:

Von 64 Patienten waren 32 männlich und 32 weiblich, mit einem Durchschnittsalter von 49,5 Jahren. Die Thrombozytenzahl betrug im Mittel  $58 \times 10^9/L$ , und das Thrombozytenvolumen im Durchschnitt  $12,6 \pm 1,6fl$  (Bereich: 9,7-15,6fl und Referenzbereich: 7,5-11,5fl).

Keiner dieser Patienten hatte eine andere Blutbildanomalie als Thrombozytopenie und/oder leicht erhöhtes Thrombozytenvolumen. Keiner der Patienten hatte gleichzeitig eine andere Erkrankung. Milz und Leber hatten bei allen Patienten eine normale Größe. Es wurden keine Veränderungen der Lymphknoten beobachtet und die Laborparameter wiesen keine Anzeichen einer Hämolyse oder Störung der Gerinnung auf. Schwangerschaft oder Bluttransfusionen waren bei den Patienten nicht bekannt.

Tab. 4-2 Antikörperspezifitäten der im MAIPA positiv geteste Seren

Seren mit Antikörper gegen ein einziges Glycoprotein	276	(42%)
Anti-GPIIb/IIIa allein	140	(21%)
Anti-GPIb/IX allein	72	(11%)
Anti-GPV allein	64	(10%)
Seren mit Antikörper gegen mehrere Glykoproteine	379	(58%)
Anti-GPIIb/IIIa und anti-GPIb/IX	39	(6%)
Anti-GPIIb/IIIa und anti-GPV	49	(7%)
Anti-GPIb/IX und anti-GPV	43	(7%)
Anti-GPIIb/IIIa und anti-GPIb/IX und anti-GPV	248	(38%)
Gesamte Zahl der im MAIPA positiv geteste Seren	657	(100%)

In dieser Studie wurden Antikörper gegen GPV in 64 (10%) von 657 Patienten ohne detektierbare Antikörper gefunden. Verglichen mit der Zahl der Antikörper gegen GPIIb/IIIa 140 von 657 (21%), und gegen GPIb/IX 72 (11%) stellt GPV ein Hauptzielantigen bei vielen ITP-Patienten dar. Patienten mit anti-GPV erfüllen alle Kriterien der ITP-Diagnose. Daher kann GPV als ein relevanter Marker der Autoimmunthrombozytopenie betrachtet werden (Rühl, et al., 2009).

## 4.2 Untersuchungen zum Nachweis von Autoantikörper gegen GP I Ib/IIIa

Die Komplementfixierung durch Autoantikörper in Seren von ITP-Patienten wurde zunächst in einem funktionellen Test, dem Mikrokomplementbindungstest (MKBR), analysiert. Wir haben 129 ITP-Patienten zunächst auf Autoantikörper und HLA-Antikörper untersucht. Ziel der Studie war es folgendes nachzuweisen:

- Sind gebundene und freie thrombozytenreaktive Antikörper nachweisbar?
- Liegen HLA-Antikörper (durch Schwangerschaft oder Bluttransfusionen gebildet) neben plättchenspezifischen Antikörper vor?
- Besitzen die Seren der Patienten komplementaktivierende Eigenschaften?

Da HLA-Antikörper Komplement aktivieren können, wurden HLA-antikörperhaltige Seren ausgeschlossen (3/129).

Die Patienten haben wir in verschiedene Tests untersucht:

- MAIPA-Test (Kiefel, 1992), direkt und indirekt
- Komplementbindungs-Test (Colombani, et al., 1971)
- HLA-Antikörpersuchtest

Die ITP-Seren wurden nach den Ergebnissen im MAIPA-Test in drei Gruppen aufgeteilt:

- Seren mit freien und gebundenen Antikörpern gegen Thrombozyten-Glykoproteine
- Seren mit nur gebundenen Antikörpern gegen Thrombozyten-Glykoproteine
- Seren ohne detektierbare Antikörper gegen Thrombozyten-Glykoproteine

### 4.2.1 Etablierung des Systems zur Beurteilung der Ergebnisse in der Mikrokomplementbindungsreaktion

Thrombozyten von gesunden Blutspendern wurden mit inaktiviertem Serum in An- oder Abwesenheit von Meerschweinchenkomplement inkubiert. Nach Zugabe von Hammelerythrozyten,

welche zuvor mit komplementaktivierenden Antikörpern sensibilisiert worden sind, wurde über die Inhibition der Erythrozytenlyse (erkennbar an Ringbildung) die Komplementfixierung der Antikörper mikroskopisch abgelesen (siehe Abb. 4-1, Seite 75). Es wurde für das Serum eines gesunden Spenders (Normalhumanserum) keine Komplementfixierung beobachtet. Erkennbar an der Totalhämolyse (Abb. 4-1 A, Seite 75). Als positive Kontrolle wurde in der MKBR ein Poolserum von 20 PTP-Patienten eingesetzt, welche in diesem Test bekanntermaßen durch ihre Komplementbindung die Erythrozytenlyse vollständig hemmen (Deutsche Norm: Serodiagnostik von Infektionskrankheiten, 1989) (siehe Abb. 4-1, Seite 75).

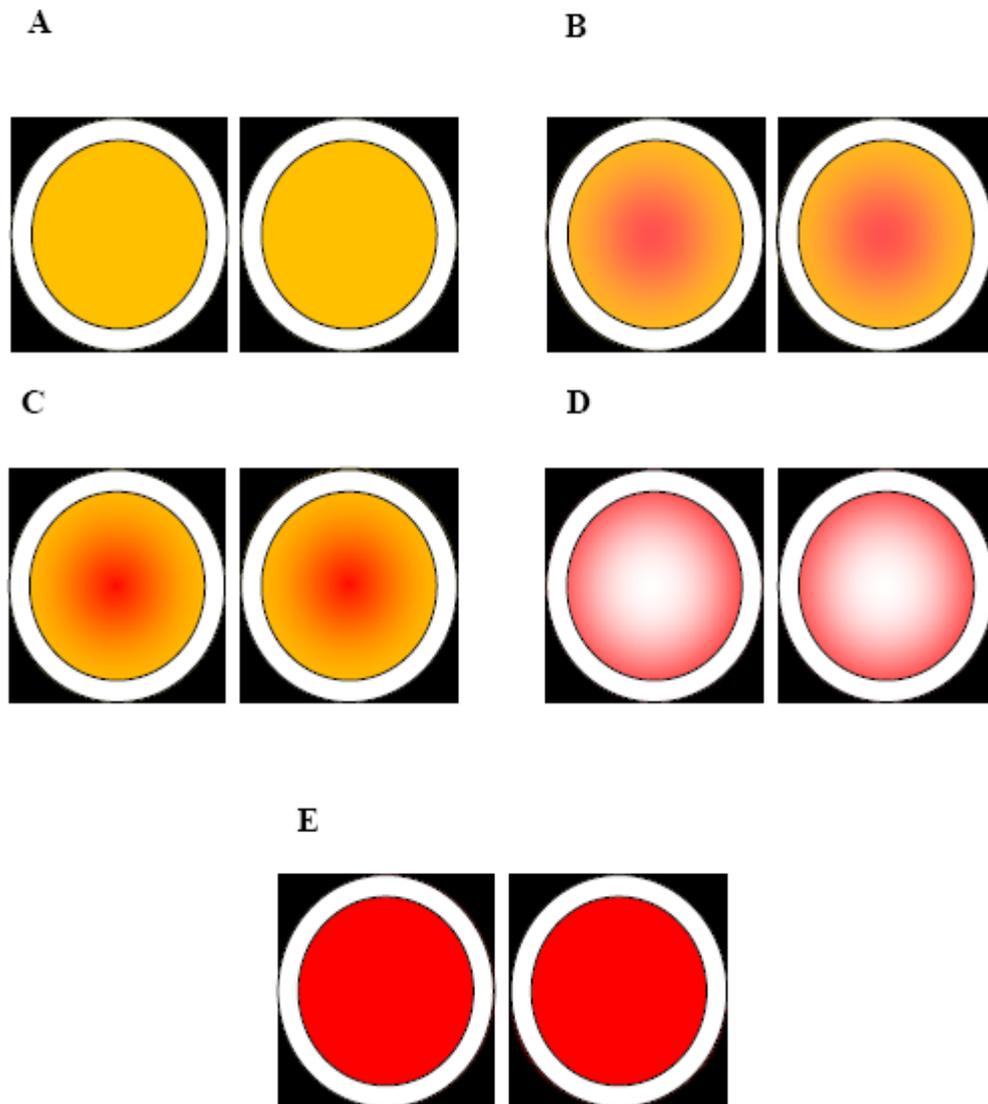


Abb. 4-1 Funktionelle Analyse im Mikrokomplementbindungstest (MKBR). Antigen-Antikörper-Komplexe aktivieren das Komplementsystem und führen zum Verbrauch von Komplementfaktoren. Der Verbrauch dieser Komplementfaktoren ist die Messgröße für die Menge an Antikörpern im Blutserum. Der Verbrauch von Komplementfaktoren wurde über antikörperbeladene Erythrozyten sichtbar gemacht (hämolytisches System). Der Hemmgrad der Erythrozytenlyse wurde mikroskopisch beurteilt: Grad 4: > 80 % Hämolyse, keine Komplementfixierung oder keine Antikörper (A); Grad 3: 50 – 75 % Hämolyse, schwache Autoantikörperreaktivität (B); Grad 2: 25 – 50 % Hämolyse, moderate Autoantikörperreaktivität (C); Grad 1: < 10 % Hämolyse, starke Antikörperreaktivität (D); Grad 0: keine Hämolyse (Ringbildung), sehr starke Antikörperreaktivität (E) (Deutsche Norm: Serodiagnostik von Infektionskrankheiten, 1989)

#### 4.2.1.1 Analyse von ITP-Seren im Komplementbindungstest mit Thrombozyten von gesunden Spendern

In den nachfolgenden Untersuchungen sollte geprüft werden, ob ITP-Seren in der Lage sind, das Komplement zu fixieren. Die Beteiligung von Komplement an der Pathogenese der ITP ist

mehrfach beschrieben, aber nicht systematisch untersucht worden (Kurata, et al., 1985; Hed, 1998; McMillan, 2007).

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle (Tab. 4-3, Seite 76) dargestellt:

Tab. 4-3 126 Seren von ITP-Patienten getestet im Komplementbindungs-Test mit Thrombozyten von gesunden Spendern

	Anzahl der Seren mit gebundenen und freien AK im MAIPA	Anzahl der Seren mit nur gebundenen AK im MAIPA	Anzahl der Seren ohne detektierbare AK im MAIPA
<b>Gesamtzahl der untersuchten Patienten (n=126)</b>	26	80	20
<b>Anzahl der Seren mit komplementaktivierenden Eigenschaften</b>	21/26 (81%)	52/80 (65%)	6/20 (30%)

50 Seren von gesunden Blutspendern dienten als Kontrolle, davon waren nur vier (8%) in der Lage Komplement zu binden

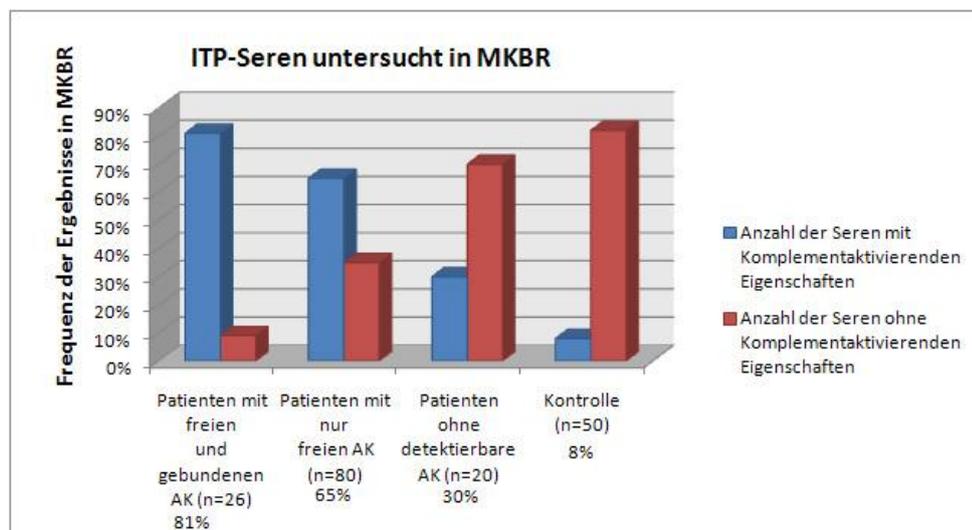


Abb. 4-2 Seren von 126 ITP-Patienten und 50 gesunde Kontrollen getestet in Komplementbindungs-Test

4 von 50 (8%) der Kontrollseren konnten Komplement aktivieren. 21 von 26 (81%) der ITP-Seren mit freien und gebundenen Antikörper waren in der Lage, das Komplement zu aktivieren, während dies nur 6 von 20 (31%) Patienten ohne detektierbare Antikörper konnten. Bei Patienten, bei denen nur gebundene Antikörper nachweisbar waren, haben 52 von 80 (65%) Komplement aktiviert.

#### 4.2.2 Analyse der ITP-Seren mit Thrombozyten von gesunden Spendern und von Patienten mit Morbus Glanzmann im Komplementbindungs-Test und in Aggregometrie

Um die Spezifität des Komplementbindungs-Tests zu überprüfen, haben wir Thrombozyten von gesunden Blutspendern und Thrombozyten von Patienten untersucht, bei denen der GPIIb/IIIa-

Rezeptor nicht exprimiert ist (Glanzmann-Patienten). Weiterhin wurden die Thrombozyten beider Kollektive aggregometrisch getestet.

#### **4.2.2.1 Die Aggregometrie**

Seit der Erstbeschreibung durch Born 1962 (Born, 1962) ist die Untersuchung der Thrombozytenaggregation ein wichtiges Instrument zur Erfassung angeborener, erworbener und auch medikamentös induzierter Funktionsstörungen der Thrombozyten. Bei der Untersuchung zur Wirksamkeit von Aggregationshemmern ist die Methode gut einsetzbar. Die Messung der Plättchenaggregation unterstützt die Diagnose von Erkrankungen, die mit einer Dysfunktion der Plättchen in Zusammenhang stehen und erlaubt die Unterscheidung von angeborenen Blutungsneigungen wie z.B. Hämophilie A oder von-Willebrand-Erkrankung sowie erworbenen Blutungsneigungen nach Medikamenteneinnahme bzw. aufgrund anderer Grunderkrankungen.

#### **4.2.2.2 Aggregometrische Charakterisierung der Glanzmann-Thrombozyten**

Nachstehende Aspekte der Thrombozytenaktivierung von Glanzmann-Patienten wurden aggregometrisch geprüft:

- Untersuchung der Aggregationen unter Verwendung von ADP, Kollagen, Epinephrin, Arachidonsäure und Ristocetin
- Einfluss der Prüfsubstanzen auf die Thrombozytenaggregation

Nach Stimulation der Aggregation im thrombozytenreichen Plasma mit ADP, Kollagen, Arachidonsäure, Epinephrin oder Ristocetin wird die Differenz der Intensität der Lichttransmission zwischen dem thrombozytenarmen (PPP) und dem thrombozytenreichen Plasma (PRP) einer Blutprobe registriert und prozentual berechnet. Das Ergebnis stellt somit eine unmittelbare Proportionalität zu der Aggregationsfähigkeit von Thrombozyten dar.

#### **4.2.2.3 Interpretation der Ergebnisse**

Bei Glanzmann Patienten findet keine Aggregation nach Zusatz von ADP, Kollagen, Epinephrin oder Arachidonsäure statt. Bis auf Ristocetin zeigen ADP, Kollagen, Arachidonsäure und Epinephrin eine ausbleibende Aggregation, jedoch einen normalen Shape Change. Die ristocetininduzierte Aggregation verläuft typischerweise normal und wellenförmig.

#### **4.2.2.4 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Glanzmann-Thrombozyten**

Während durch die Aggregometrie herausgefunden werden kann, wie stark die Blutplättchen nach Zugabe eines Stimulus aggregieren, d.h. wie funktionstüchtig sie sind, können in der Durchflußzytometrie spezifische Eigenschaften der Plättchenoberfläche festgestellt werden. So

können in der Durchflußzytometrie qualitative Aussagen über den Funktionszustand der thrombozytären Oberflächenrezeptoren gemacht und z.B. hereditäre Defekte wie das Bernard-Soulier-Syndrom oder der Morbus-Glanzmann-Naegeli erkannt werden. Die Expression von Antigenen auf der Oberfläche des Thrombozyten gibt Aufschluss über seinen Aktivierungsgrad. Die verschiedenen Glykoproteine wie der Fibrinogenrezeptorkomplex können je nach Funktionszustand im Durchflußzytometer dargestellt werden, wenn sie in gesättigten Konzentrationen mit fluoreszierenden monoklonalen Antikörpern inkubiert wurden. Spezifische Photodioden registrieren das von den einzelnen Zellen ausgesendete Streulicht und die Intensität der Fluoreszenz. Dabei kann durch das vorwärts gestreute Licht („forward scatter“) auf die Größe und durch das seitwärts gestreute Licht („side scatter“) auf die Granularität der gemessenen Partikel geschlossen werden (Gawaz, 1999). Die Proben in unserer Studie wurden mit dem 2-Watt-Argonlaser-Durchflußzytometer „FACScan“ (Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gemessen und die Ergebnisse durch das angeschlossene Datenverarbeitungsprogramm ausgewertet. Das Gerät war mit Standard-Fluoreszenz-Mikrobeads (Calibrite®, Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) geeicht worden. Die Daten der Parametereinstellung des Durchflußzytometers finden sich im Anhang (Tab. Anhang 1, Seite 141).

#### 4.2.2.5 Die Auswertung

Die Auswertung der Fluoreszenzhistogramme erfolgt mit CELLQUEST-Software (Becton Dickinson, Heidelberg) noch während der Messung. Es gibt 2 Verfahren für die Darstellung der erhobenen Daten:

- Dotplot: Bei dieser Form der Darstellung werden zwei Parameter gegeneinander aufgetragen. Jede Zelle erscheint hierbei als Punkt im Diagramm. Besonders geeignet ist diese Darstellungsform für die Parameter FSC und SSC, weil somit einzelne Zellpopulationen anhand ihrer Größe und ihrer Granularität abgegrenzt werden können.
- Histogramm: Das Histogramm gibt die Häufigkeitsverteilung in einer Probe wieder. Auf der Y-Achse wird die Zahl der gemessenen Zellen, also die Häufigkeit der Ereignisse aufgetragen, auf der X-Achse sind die einzelnen Kanäle, also die relative Fluoreszenz, FSC oder SSC dargestellt. Für die weitere Auswertung wird in der Regel der Mittelwert (mean fluorescence) verwendet, der allerdings anfällig für „Ausreißer“ ist. Ebenso kann aber auch der Prozentsatz der Zellen bestimmt werden, der einen relativen Wert übersteigt. Hierfür wird an der Schnittstelle zwischen Negativ- und Positivkontrolle ein Marker gesetzt.

Die Thrombozytendurchflußzytometrie leistet jedoch wertvolle Beiträge bei der Abklärung angeborener und erworbener Thrombozytenfunktionsstörungen. Besonders bei familiären

Syndromen, bei denen der eine oder andere Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche fehlt oder nicht funktionstüchtig ist. Diese Störungen können durchflusszytometrisch erkannt werden. Die Thrombozytendurchflusszytometrie wird deshalb nicht nur im Rahmen der Forschung, sondern auch für die Betreuung von Patienten im Rahmen der Gerinnungsambulanz der Klinik verwendet. Durch dieses integrative Angebot wird die Qualität der Patientenversorgung deutlich erweitert. Die spezifischen quantitativen Werte (sABC: specific Antibody Binding Capacity) sind äquivalent der Anzahl von Glykoprotein-Oberflächen-Moleküle pro Plättchen.

Um akkurate, vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, bedarf es einer Eichung der Fluoreszenzintensitätsskalierung mit Hilfe von fluorochromkonjugierten Kalibrierungsbeads. Das verwendete QuantiBRITE-Set besteht aus einem Gemisch von vier Bead-Populationen mit jeweils definierter Anzahl CD45 FITC-Molekülen. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der Beads wurden gegen die entsprechenden CD45 FITC-Molekülzahlen aufgetragen, so dass die lineare Regressionsgerade  $y=ax+b$  (mit  $a$ =Steigung,  $b$ =Achsen Schnittpunkt,  $y$ =log 10 der Fluoreszenzintensität,  $x$  = log 10 der PE-Molekülzahl) berechnet werden konnte. Voraussetzung für die Kalibrierung ist, dass die Beads mit exakt denselben Instrumenteneinstellungen gemessen werden wie später die Proben. Anhand der ermittelten Regressionsgleichung konnten später die geometrischen Mittel der gemessenen Fluoreszenzintensitäten in „CD45 FITC-Moleküle pro Zelle“ konvertiert werden, um so einen exakten Vergleich der unterschiedlichen Oberflächenantigene zu ermöglichen.

Die durchflusszytometrische Bestimmung der Oberflächenantigene und der mittleren Fluoreszenzintensität erfolgten mit markierten Beads von verschiedenen Herstellern als auch unter Einsatz von Glanzmann-Thrombozyten.

Tab. 4-4 Die spezifische Zahl der gebundenen mAk Moleküle (sABC: specific Antibody Binding Capacity) von gesunden erwachsenen Spendern und Glanzmann-Patienten im Vergleich

Zelloberflächen-Glykoproteine	Spezifische Zahl der gebundenen mAk Moleküle	Glanzmann-Patient
GPIIb (CD41a)	51,000 +/- 14,000	3.000
GPIba (CD42b)	39,000 +/- 11,000	38.000
GPIIIa (CD 61)	53,000 +/- 12,000	2.000

#### 4.2.2.6 Interpretation der durchflusszytometrischen Ergebnisse

Die Intensität der Immunfluoreszenz schwankt je nach Expression der Antigenzahl auf Beads (nach Hersteller) und weist bei Glanzmann-Patienten je nach verwendetem Antikörper niedrige Werte auf. Die mittlere Immunfluoreszenz von Antikörper bei Glanzmann-Patienten ist der, der Beads mit der niedrigen Antigenzahl vergleichbar. Die Glanzmann Thrombozyten exprimieren wenige Glykoproteine (GPIIb/IIIa) auf ihrer Oberfläche, an welche die fluoreszierenden Immunmarker

binden können. Die Intensitäten der verschiedenen Antikörper liegen dabei auf niedrigen Niveaus. Dabei entspricht die Zahl der gebundenen mAK- Moleküle, der Zahl der spezifischen Rezeptoren auf der Thrombozytenmembran. Bei GPIIb (CD42b) liegt die Zahl der Membranrezeptoren bei Glanzmann-Patienten im Normbereich. Dagegen liegt die Zahl der Rezeptoren für GPIIb (CD41a) und für GPIIIa (CD61) viel niedriger.

Tab. 4-5 Ausgesuchte ITP-Seren (mit anti-GPIIb/IIIa-Antikörper; MAIPA) getestet mit normalen Thrombozyten und Thrombozyten von Patienten mit Morbus-Glanzmann

Kollektive	Normale Thrombozyten	Thrombozyten von Patienten mit Morbus Glanzmann
Patienten mit freien und gebundenen Antikörper (n=21)	100%	3/21 (14%)
Patienten mit nur gebundenen Antikörper (n= 52)	100%	16/52 (31%)
Patienten ohne detektierbare Antikörper (n= 6)	100%	3/6 (50%)

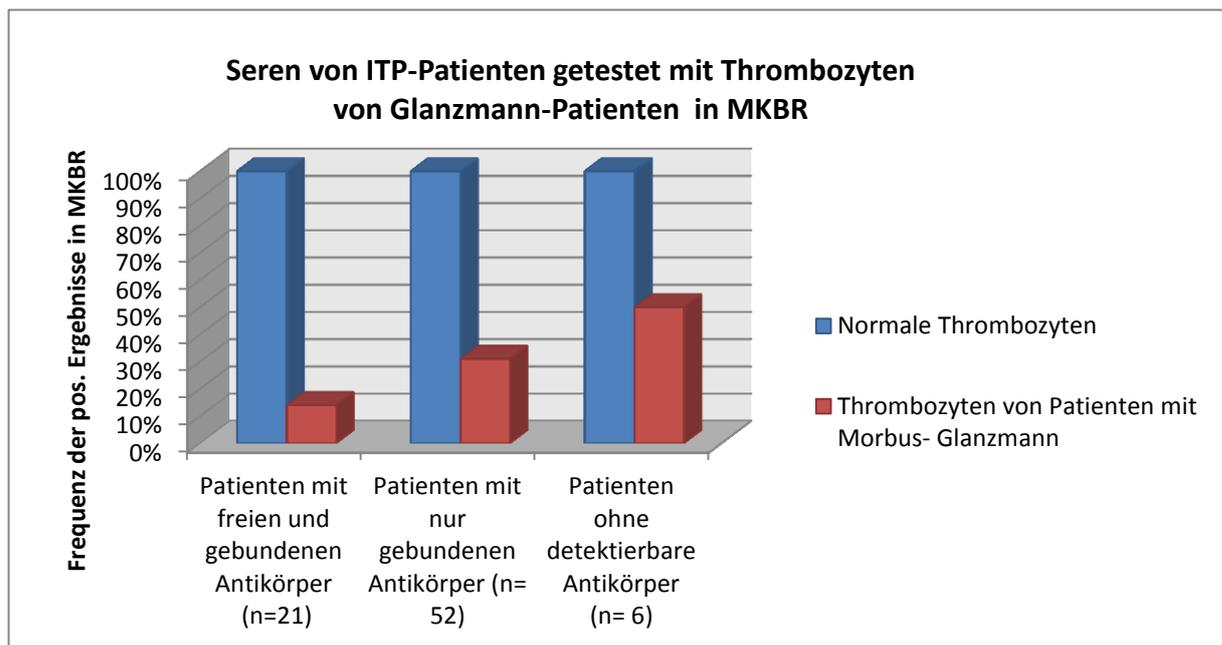


Abb. 4-3 Die gleichen, vorher getesteten Kollektive, wurden im Komplementbindungs-Test mit Thrombozyten von Glanzmann-Patienten getestet

3 von 21 (14%) der ITP-Seren mit freien und gebundenen Antikörpern haben Komplement an Thrombozyten von Patienten mit Morbus-Glanzmann binden können. Bei Seren von ITP-Patienten ohne detektierbare freie Antikörper waren 16 von 52 (31%) in der Lage, Komplement zu binden, während 3 von 6 (50%) der ITP-Seren ohne detektierbare Antikörper Komplement in

Thrombozyten von Patienten mit Morbus-Glanzmann aktivieren konnten. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Tab. 4-6 In MAIPA und Komplementbindungs-Test untersuchte Seren (n=79) getestet mit Thrombozyten von Patienten mit Morbus-Glanzmann

Zahl der getestete Seren (n=79)	Normale Thrombozyten	Thrombozyten von Patienten mit Morbus-Glanzmann
Frequenz der positiven Ergebnisse	100%	28%

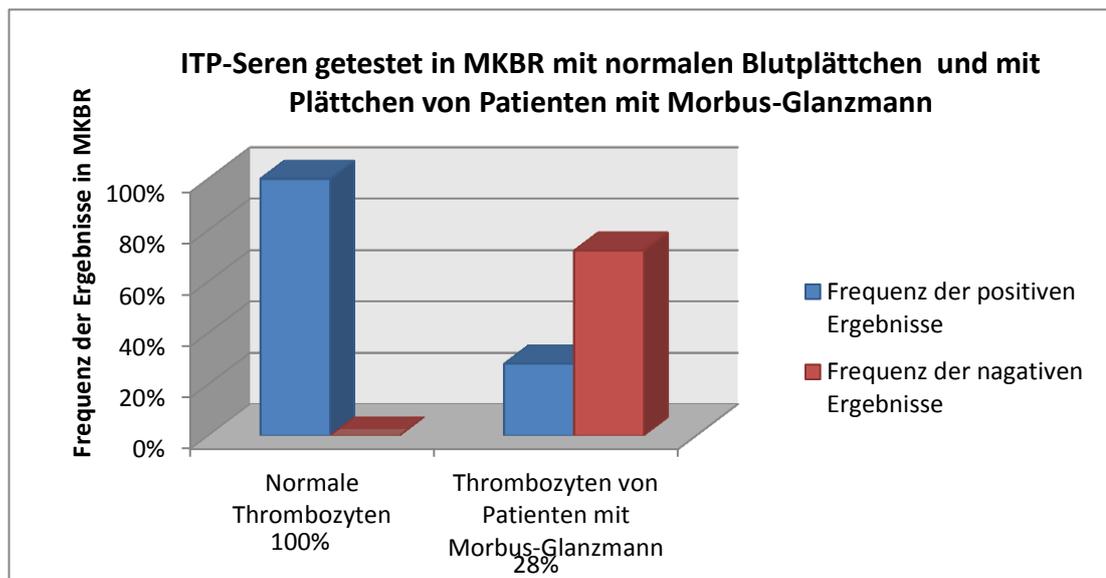


Abb. 4-4 Ergebnisse der ITP-Seren in Komplementbindungs-Test mit normalen Blutplättchen und Plättchen von Patienten mit Morbus-Glanzmann zusammengefasst

Fassen wir diese Ergebnisse zusammen, sind 28% (22/79) aller ITP-Seren, die im Komplementbindungs-Test positiv reagieren, in der Lage mit Thrombozyten von Patienten mit Morbus-Glanzmann zu reagieren, d.h. die Mehrheit der Seren aktiviert das Komplementsystem nur in Anwesenheit von GP IIb/IIIa.

Seren von Patienten mit ITP können sowohl freie Antikörper als auch zirkulierende Immunkomplexe enthalten. Um zu überprüfen, ob freie Antikörper oder möglicherweise Immunkomplexe für die Komplementbindung verantwortlich sind, wurde mit Hilfe von Melon<sup>TM</sup> Gel-Spin-Reinigung (Pierce, München, Deutschland), wie oben beschrieben, IgG-Fractionen aus 28 Seren gewonnen und im Komplementbindungs-Test eingesetzt.

Aus Seren wurde durch Negativselektion die IgG-Fraktion gewonnen und vor ihrer Verwendung in den funktionellen Test in der Silberfärbung auf Reinheit überprüft.

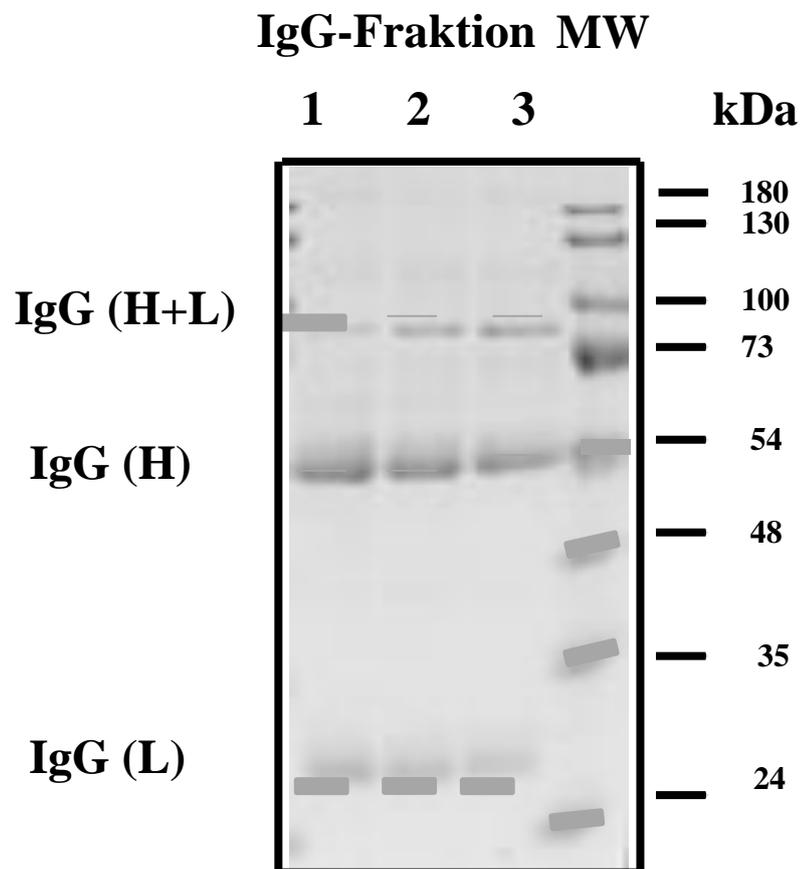


Abb. 4-5 Silberfärbung bestätigt die Reinheit der isolierten IgG-Fraktion aus ITP-Seren. IgG wurde mit Hilfe des Melon™ Gel IgG Spin Purification Kits (Pierce, Rockford, USA) isoliert und nach Auftrennung der Proteine unter reduzierten Bedingungen in der Silberfärbung analysiert. Es sind die Fc $\gamma$  (75kDa), F(ab) $\prime$ 2 (50kDa) und Fab (25kDa) Fragmente eindeutig zu erkennen

Nach Auftrennung der Proteine unter reduzierten Bedingungen sind die einzelnen IgG-Fragmente nach der Silberfärbung deutlich zu erkennen. Hauptsächlich sind die drei Fragmente: Fc $\gamma$  (75kDa), F(ab) $\prime$ 2 (50kDa) und Fab (25kDa) auf dem Gel zu sehen.

#### **4.2.3 Analyse der gereinigten IgG-Fractionen aus ITP-Seren mit normalen Thrombozyten und mit Thrombozyten von Patienten mit Morbus-Glanzmann im Komplementbindungs-Test**

Aus 28 ITP-Seren, die im MAIPA-Test und im Komplementbindungs-Test positiv getestet wurden, wurde IgG aufgereinigt. Die gewonnenen IgG-Fractionen wurden im Komplementbindungs-Test sowohl mit normalen Blutplättchen als auch mit Plättchen von Patienten mit Morbus-Glanzmann untersucht.

In Bezug auf die Komplementbindung erzielt man mit Seren genauso wie mit gereinigten IgG-Fractionen vergleichbare Ergebnisse (siehe Tab. 4-7, Seite 83).

Tab. 4-7 Es ist keine signifikante Diskrepanz zwischen Seren und gereinigten IgG-Fractionen aus ITP-Seren festzustellen. Deutlich dagegen die Diskriminanzanalyse zwischen normalen Thrombozyten und Thrombozyten von Patienten mit Morbus-Glanzmann

Komplementbindungs-Test	Seren (n=28)	IgG-Fractionen (n=28)
Normale Thrombozyten	28 (100%)	26 (93%)
Thrombozyten von Patienten mit Morbus-Glanzmann	9 (32%)	8 (29%)

9 von 28 (32%) der ITP-Seren waren in der Lage das Komplement in Thrombozyten von Patienten mit Morbus-Glanzmann zu aktivieren. Alle diese Seren konnten Komplement in normalen Blutplättchen aktivieren.

#### 4.2.4 Analyse von ITP-Seren nach Ausfällen von Immunkomplexen

Bei dem nächsten Versuch soll überprüft werden, ob die Reaktivität der untersuchten Seren wirklich auf die im Serum enthaltenden Immunglobuline und nicht auf Immunkomplexe zurückzuführen ist. Für diesen Zweck haben wir die Immunkomplexe in Seren mit Polyethylenglykol gefällt. Die immunkomplexfreien Seren wurden dann im Komplementbindungs-Test untersucht.

Tab. 4-8 In MAIPA und Komplementbindungs-Test getestete Seren aufgereinigt mit Polyethylenglykol (PEG-Assay)

Komplementbindungs-Test (n= 20)	Vor PEG-Prezipitation	Nach PEG-Prezipitation
Frequenz der positiven Ergebnisse	10/20 (50%)	9/20 (45%)

Seren von 20 ITP-Patienten, bei denen je zur Hälfte freie und gebundene oder nur gebundene Antikörper nachweisbar waren, wurden vor und nach der Polyethylenglykol-Prezipitation im Komplementbindungstest untersucht.

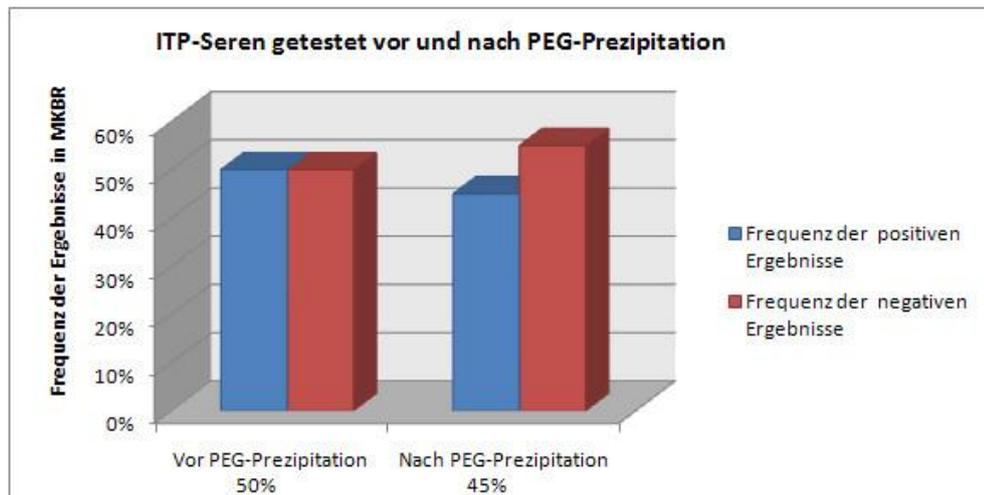


Abb. 4-6 20 ITP-Seren wurden mit PEG (Polyethylenglykol) behandelt, um Immunkomplexe auszufällen, und anschließend im Komplementbindungs-Test untersucht. Es konnte keine signifikante Diskrepanz zwischen den Seren vor und nach der PEG-Fällung festgestellt werden

Fast 50% aller in dieser Studie untersuchten ITP Seren waren in der Lage, Komplement in Gegenwart von GPIIb/IIIa zu binden. Die meisten von denen konnten in Seren ohne freie anti-Thrombozyten-Antikörper nachgewiesen werden. Aus diesem Grund entwarfen wir einen weiteren Komplementbindungstest auf Basis der GPIIb/IIIa beschichteter Partikel für eine FACS-Analyse (siehe Kapitel 4.3, Seite 92).

Ergebnisse der Komplementbindungs-Reaktion:

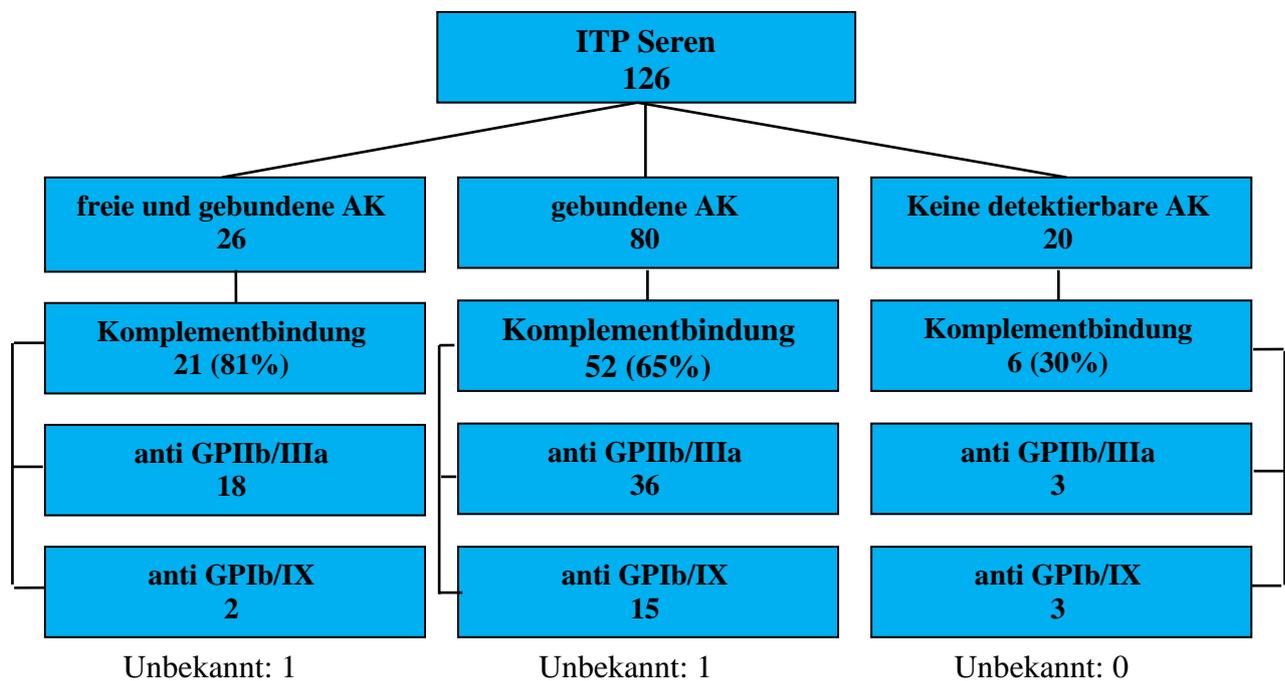


Abb. 4-7 Analyse der ITP-Seren mit Thrombozyten von gesunden Blutspendern, Thrombozyten von Glanzmann-Patienten und von Patienten mit Bernard-Soulier-Syndrome in der MKBR

#### 4.2.5 Analyse der ITP-Seren mit Thrombozyten von gesunden Spendern, mit Thrombozyten von Glanzmann-Patienten und von BSS-Patienten in der MKBR und in der Aggregometrie

Autoantikörper gegen das Glykoprotein GPIb/IX treten häufig in Seren von ITP-Patienten auf (Kiefel, et al., 1996). Um die, gegen Blutplättchen gerichtete Autoantikörper, in Bezug auf ihre Fähigkeit das Komplement zu fixieren, zu differenzieren, haben wir Seren mit Blutplättchen verschiedener Patientenkollektive in MKBR-Test untersucht.

Bei dem ersten Kollektiv handelt es sich um 21 ITP-Seren, die zuvor positiv im Komplementbindungs-Test mit Thrombozyten gesunder Spender reagiert hatten. Diese Seren zeigten auch im Komplementbindungs-Test mit Thrombozyten von Patienten mit Morbus Glanzmann eine positive Reaktion.

Die Blutplättchen von Patienten mit Bernard-Soulier-Syndrom (BSS) zeigen eine niedrige bis fehlende Expression des Glykoproteins GPIb/IX.

#### 4.2.5.1 Aggregometrische Charakterisierung der BSS-Plättchen

Bei Patienten mit Bernard-Soulier-Syndrom findet eine normale Aggregation nach Zusatz von ADP, Kollagen, Epinephrin oder Arachidonsäure, jedoch eine verringerte Aggregation nach Zusatz von Ristocetin, statt.

#### 4.2.1 Durchflusszytometrische Charakterisierung der BSS-Thrombozyten

Tab. 4-9 Die spezifische Zahl der gebundenen mAk-Moleküle (sABC: specific Antibody Binding Capacity) von gesunden erwachsenen Spendern und BSS-Patienten im Vergleich

Zelloberflächen-Glykoproteine	Spezifische Zahl der gebundenen mAk-Moleküle von gesunden Spendern	BSS-Patient
GPIb	38.000 +/- 10	3.432
GPIX	30.000 +/- 7,5	2.163
GPV	15.000 +/- 6,2	1.864

Wie oben erwähnt, schwankt die Intensität der Immunfluoreszenz je nach Expression der Antigenzahl auf Beads (nach Hersteller) und weist bei BSS-Patienten je nach verwendetem Antikörper niedrige Werte auf. Die mittlere Immunfluoreszenz von Antikörper bei BSS-Patienten ist der, der Beads mit der niedrigen Antigenzahl vergleichbar. Die Thrombozyten von BSS-Patienten exprimieren wenige Glykoproteine (GPIb, GPV, GPIX) auf ihrer Oberfläche, an welche die fluoreszierenden Immunmarker binden können. Die Intensitäten der verschiedenen Antikörper liegen dabei auf niedrigen Niveaus. Bei GPIb, GPIX und GPV liegt die Zahl der Membranrezeptoren bei BSS-Patienten auf einem viel niedrigeren Niveau im Vergleich zu gesunden Spendern.

##### 4.2.1.1 Aggregometrische Charakterisierung der Plättchen eines normalen Spenders

Alle Induktoren starten eine normale Aggregation (60-90%). Gesunde Personen zeigen eine gesteigerte Aggregation bis zu >60% mit 1,2mg/ml und 0,9mg/ml Ristocetin und eine proportionale Abnahme der Aggregation entsprechend der absteigenden Ristocetin-Konzentrationen. Es erfolgte in Folge der primären Aggregation eine Abnahme der Lichttransmission, welche aber nach vorübergehendem Erreichen eines kleinen Plateaus von der sekundären Aggregation abgelöst wurde.

Tab. 4-10 Analyse der 21 Seren in der MKBR mit verschiedenen Testzellen

Anzahl der getesteten Seren (n=21)	Thrombozyten von Patienten mit Morbus Glanzmann	Thrombozyten von Patienten mit BSS	Thrombozyten von gesunden Spendern
Frequenz der positiven Ergebnisse	21/21 (100%)	2/21 (10%)	21/21 (100%)

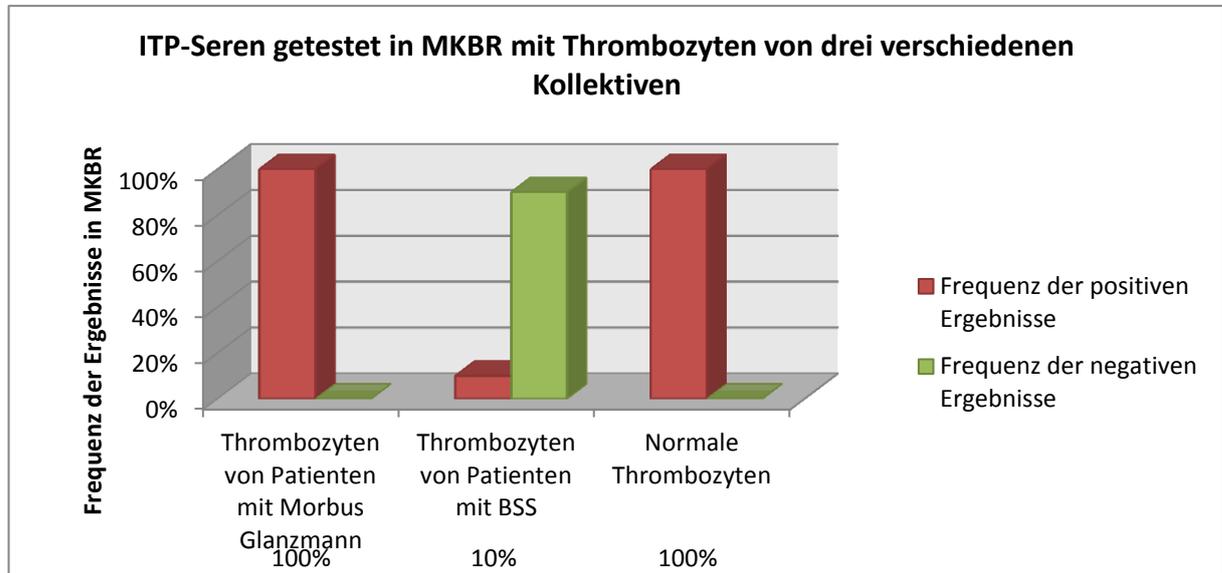


Abb. 4-8 In MAIPA-Test (GPIb/IX, GPIIb/IIIa) positiv getestete Seren (n=21) wurden mit verschiedenen Testzellen in der MKBR untersucht

21 ITP-Seren, die zuvor im Komplementbindungs-Test mit Thrombozyten von gesunden Blutspendern und Thrombozyten von Glanzmann-Patienten positiv reagiert haben, wurden weiter in der MKBR analysiert. Diese Seren wurden im Komplementbindungs-Test mit Thrombozyten von BSS-Patienten untersucht. Dabei zeigten 2/21 (10%) eine positive Reaktion.

Ergebnisse des ersten Kollektivs:

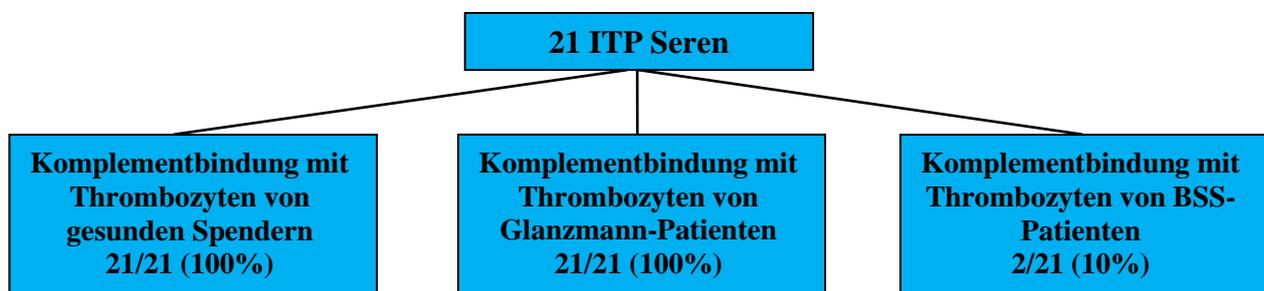


Abb. 4-9 Ergebnisse der Komplementbindungs-Untersuchungen von 21 ITP Seren mit Thrombozyten von gesunden Spendern, Thrombozyten von Glanzmann-Patienten und von BSS-Patienten

Bei dem zweiten Kollektiv handelt es sich um 28 Seren, die vorher positiv in der MKBR mit normalen Thrombozyten reagiert haben, wohingegen keine Komplementbindung mit Thrombozyten von Patienten mit Morbus-Glanzmann gezeigt werden konnte.

Tab. 4-11 Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der 28 untersuchten Seren in der MKBR mit Thrombozyten von drei verschiedenen Kollektiven. Diese Seren zeigten keine Reaktion in einem vorherigen Versuch mit Thrombozyten von Patienten mit Morbus-Glanzmann

Anzahl der getestete Seren (n=28)	Thrombozyten von Patienten mit Morbus Glanzmann	Thrombozyten von Patienten mit BSS	Thrombozyten von gesunden Blutspendern
Frequenz der positiven Ergebnisse	2/28 (7%)	24/28 (86%)	26/28 (93%)

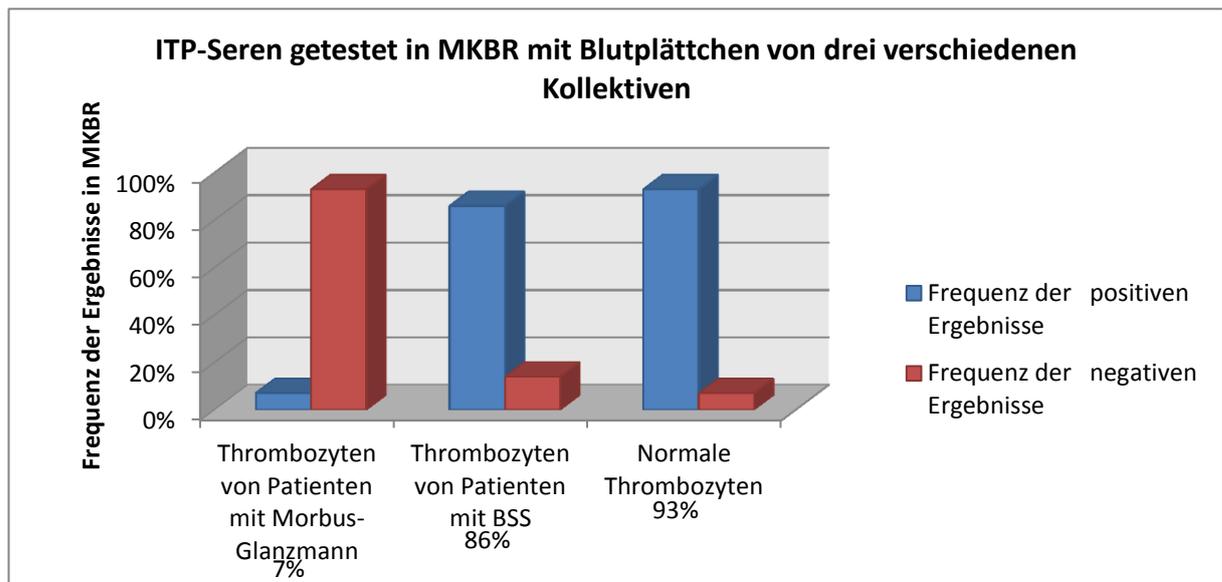


Abb. 4-10 In MAIPA positive (GPIb/IX, GPIIb/IIIa) getestete Seren, die vorher keine Reaktion in der MKBR mit Thrombozyten von Patienten mit Morbus Glanzmann gezeigt haben, wurden im Komplementbindungs-Test mit drei verschiedenen Kollektiven untersucht

Nur 2 von 28 Seren (7%) waren in der Lage das Komplement in der MKBR mit Blutplättchen von Patienten mit Morbus-Glanzmann zu binden. Dagegen reagieren 24 von 28 (86%) und 26 von 28 (93%) jeweils mit Blutplättchen von Patienten mit Bernard-Soulier-Syndrom beziehungsweise mit Thrombozyten von gesunden Spendern.

Die Diskrepanz der Ergebnisse bei der Untersuchung der ITP-Seren in der MKBR mit Thrombozyten von Glanzmann-Patienten und von Patienten mit Bernard-Soulier-Syndrom zeigt, dass die Autoantikörper, die die Fähigkeit zur Komplementbindung besitzen, bevorzugt gegen GPIIb/IIIa gerichtet sind.

Ergebnisse des zweiten Kollektivs:

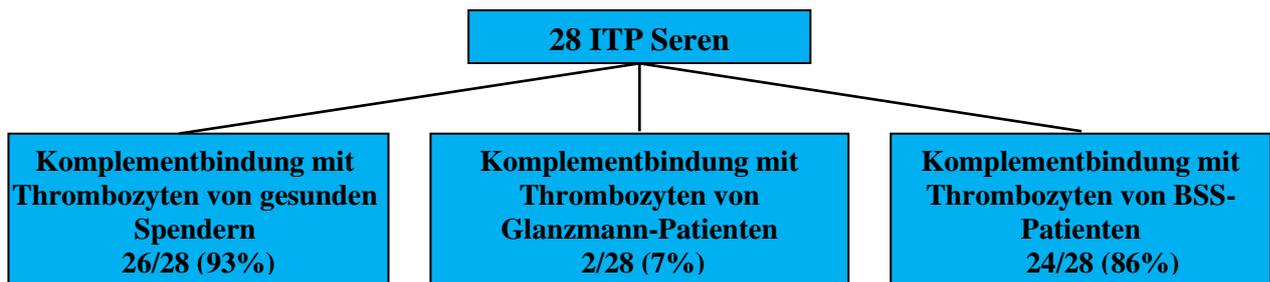


Abb. 4-11 Ergebnisse der Komplementbindungs-Untersuchungen von 28 ITP Seren mit Thrombozyten von gesunden Spendern, Thrombozyten von Glanzmann-Patienten und von BSS-Patienten

Das dritte und letzte Kollektiv enthält Seren, die im direkten MAIPA mit GPIb/IX positiv, mit GPIIb-IIIa hingegen negativ reagiert haben.

Tab. 4-12 In der Tabelle sind die Ergebnisse der 16, in der MKBR mit Blutplättchen von drei verschiedenen Kollektiven untersuchten Seren, zusammengefasst. Diese Seren zeigten im direkten MAIPA mit GPIb-IX eine positive, mit GPIIb-IIIa dagegen eine negative Antwort

Anzahl der untersuchten Seren (n=16)	Thrombozyten von Patienten mit Morbus Glanzmann	Thrombozyten von Patienten mit BSS	Thrombozyten von gesunden Spendern
Frequenz der positiven Ergebnisse	2/16 (13%)	1/16 (6%)	3/16 (19%)

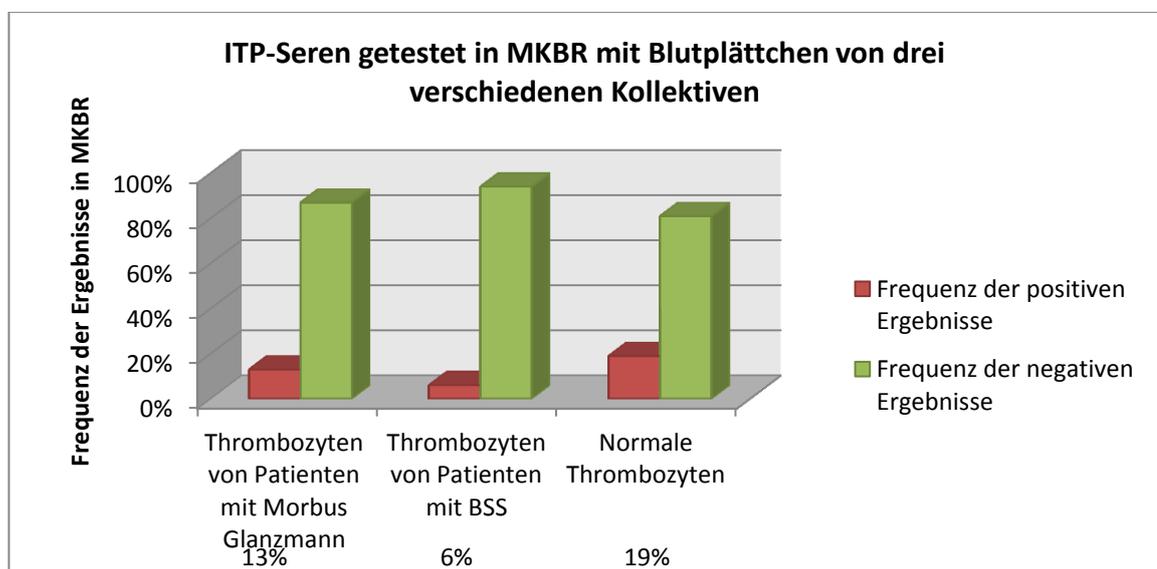


Abb. 4-12 In direkten MAIPA mit GPIb/IX positiv, mit GPIIb/IIIa dagegen negativ getestete Seren, wurden in Komplementbindungs-Test mit Blutplättchen von drei verschiedenen Kollektiven untersucht

2 von 16 untersuchten Seren (13%) waren in der Lage, Komplement an Thrombozyten von Patienten mit Morbus-Glanzmann zu aktivieren. 1 von 16 (6%) und 3 von 16 (19%) reagierten jeweils mit Blutplättchen von Patienten mit BSS beziehungsweise mit normalen Thrombozyten.

Obwohl alle 16 Seren Autoantikörper gegen GPIIb/IX enthielten, konnte nur ein Serum 1/16 (6%) im Komplementbindungs-Test positiv reagieren.

Ergebnisse des dritten Kollektivs:

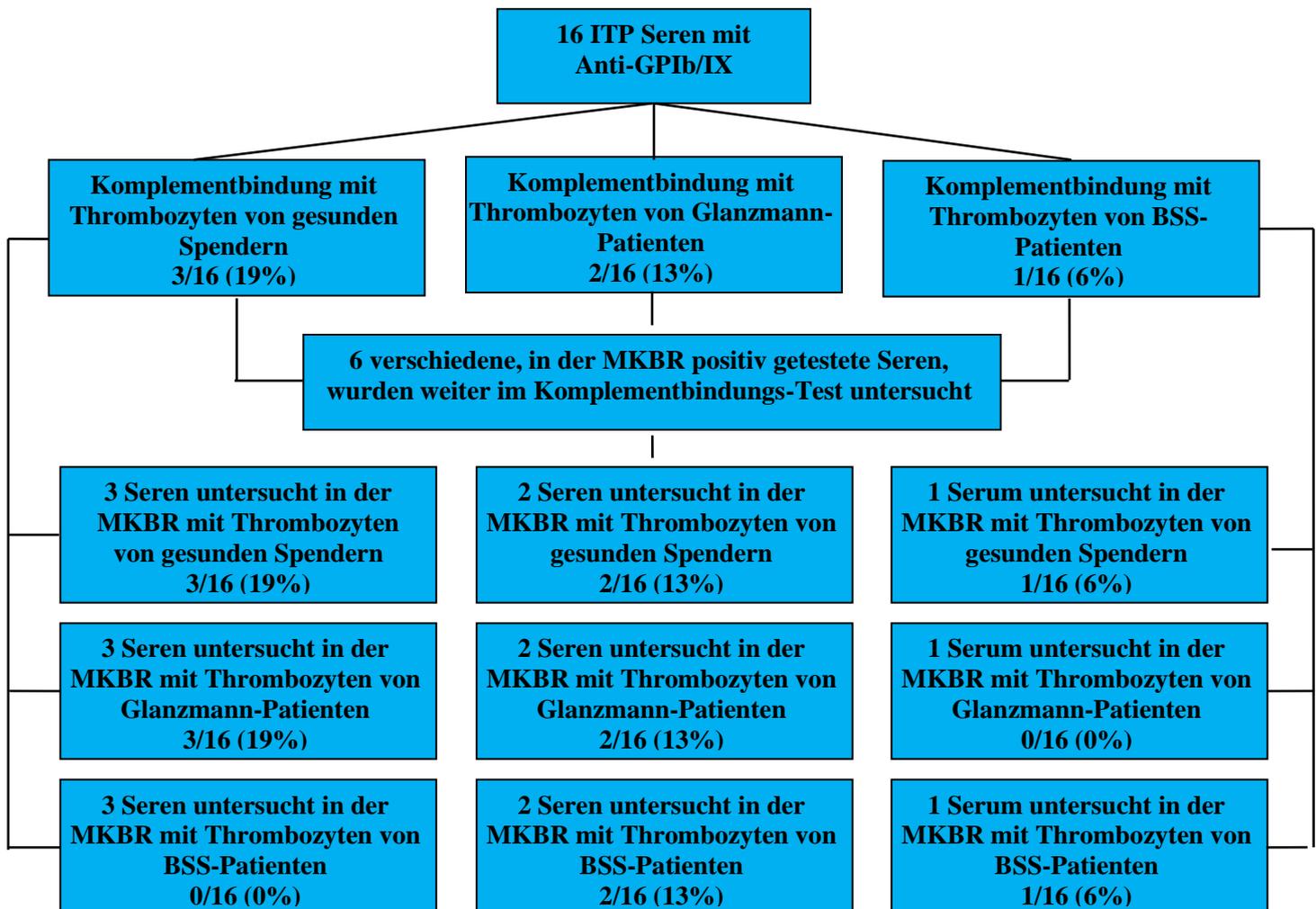


Abb. 4-13 Ergebnisse der Komplementbindungs-Untersuchungen von 16 ITP Seren, die anti GPIIb-IX Antikörper enthalten, mit Thrombozyten von gesunden Spendern, Thrombozyten von Glanzmann-Patienten und von BSS-Patienten

Schließlich wurde ein Kontrollkollektiv in der MKBR getestet. Das Kollektiv umfasst Seren von Patienten mit heparininduzierter Thrombozytopenie. Die heparininduzierte Thrombozytopenie (HIT) ist eine Erkrankung, bei der durch die Verabreichung von Heparin, einem Mittel zur Hemmung der Blutgerinnung, die Anzahl der Thrombozyten (Blutplättchen) abfällt.

Zwei Formen der HIT sind bekannt: die HIT Typ I und Typ II. Die HIT Typ II beruht auf einer Antikörperbildung gegen Heparin/Protein-Komplexe. Aufgrund seiner negativen Ladung bindet der Wirkstoff an zahlreiche Proteine. Als wichtigster krankheitsauslösender Faktor wird der Komplex aus Heparin und dem Plättchenfaktor 4 angesehen.

Eine andere Form der Thrombozytopenie stellt die neonatale alloimmune Thrombozytopenie (FAIT/NAIT) dar. Die Phagozytose ist ein wichtiger Aspekt bei der Entwicklung einer Thrombozytopenie. Die Aufnahme und Zerstörung der Blutplättchen durch Phagozytose ist bei der neonatalen alloimmune Thrombozytopenie (FAIT/NAIT) mehrfach beschrieben (Wiener, et al., 2003 Feb). Die neonatale Alloimmunthrombozytopenie wird beim Kind durch eine Immunisierung der Mutter gegen Antigene der Thrombozyten des Kindes ausgelöst, die auf den Thrombozyten der Mutter nicht vorhanden sind. Zumeist sind die Antikörper gegen das humane Plättchen-Antigen HPA-1a auf dem Glykoprotein IIIa gerichtet. Um eine mögliche Beteiligung des Komplements in NAIT auszuschließen habe ich 7 Seren in MKBR untersucht. Die Seren stammen aus NAIT-Patienten. Fünf der Seren enthalten bekanntermaßen anti-PLA-1-Antikörper und in 2 Seren waren keine Antikörper nachweisbar. Keine der 7 Seren war in der Lage das Komplement zu binden. Mithin besteht kein Hinweis auf eine Aktivierung der klassischen Komplementkaskade und somit eine mögliche Verstärkung der Phagozytose und Elimination von Plättchen im Fall einer NAIT.

Tab. 4-13 Ergebnisse der in MKBR untersuchten 3 Kollektive

Kollektive	Seren von gesunden Spendern	Seren von Patienten mit HIT-Typ II	Seren von NAIT-Patienten
Anzahl der getestete Seren	20	20	7
Frequenz der positiven Ergebnisse	1/20 (5%)	1/20 (5%)	0/7 (0%)

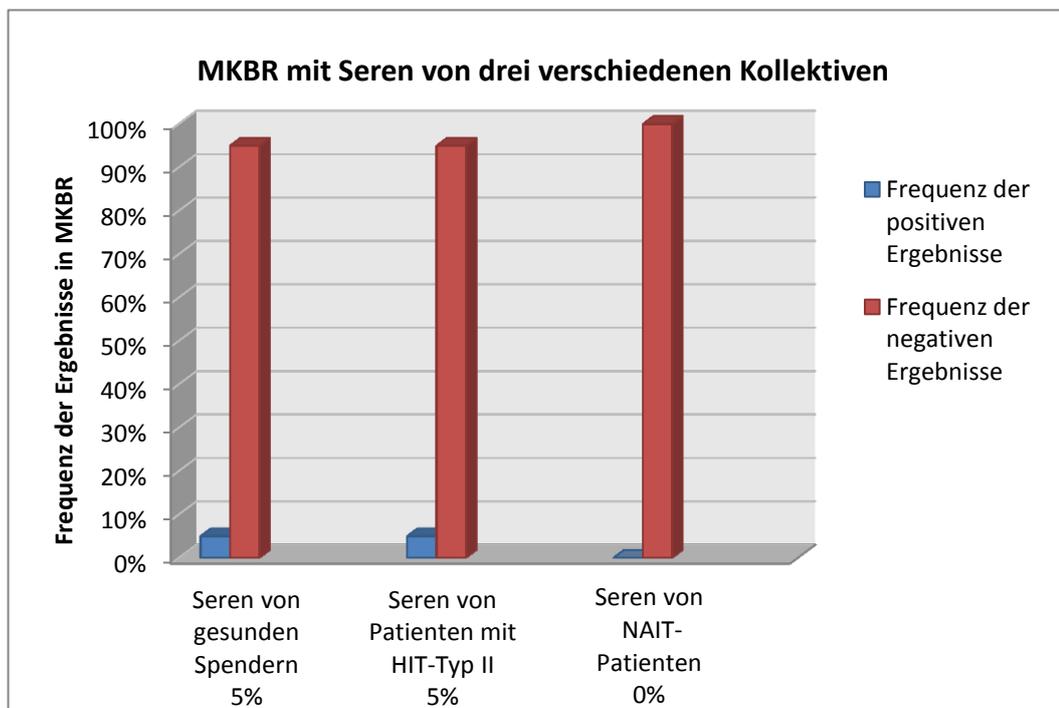


Abb. 4-14 Vergleicht man die 3 Kollektive, so ist die Frequenz der positiven Ergebnisse in der MKBR relativ klein und schwankt zwischen 0% bei Seren von NAIT-Patienten und 5% bei Seren von gesunden Spendern und von HIT-Patienten

Die drei Kollektive zeigten vergleichbare Frequenzen der positiven Ergebnisse (0-1%). Werden ITP-Seren in der MKBR untersucht, reagierten 79/126 (62%) positiv (siehe Kapitel, 4.2.1.1, Seite 75). Die große Diskrepanz unterstreicht die Spezifität der MKBR und gibt Hinweise darauf, dass Autoantikörper, die die Fähigkeit zur Komplementbindung besitzen, bevorzugt in bestimmten Patientenkollektiven vorkommen.

### **4.3 Analyse der C1q-Bindung an GPIIb/IIIa mit Hilfe der Durchflusszytometrie**

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente zeigen die wesentlichen Versuche, die FACS-Analyse zur Charakterisierung von Autoantikörpern zu etablieren. Für diese Experimente wurde das  $\alpha$ IIB $\beta$ 3-Integrin benötigt. Thrombozyten wurden aus Apheresekonzentraten isoliert und das  $\alpha$ IIB $\beta$ 3-Integrin mit Hilfe der Immunitätschromatographie aufgereinigt. Die hochspezifische Wechselwirkung zwischen dem  $\alpha$ IIB $\beta$ 3-Integrin und dem monoklonalen Antikörper Gi5 wurde für diesen Zweck genutzt. Die Reinheit und Aktivität des isolierten  $\alpha$ IIB $\beta$ 3-Integrins wurde immunchemisch durch Auftrennung der Proteine in einer SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung sowie durch Western-Blot überprüft. Zwei Hauptbanden mit Molekulargewichten von ungefähr 130 und 90kDa wurden sichtbar. Die zwei Banden ließen sich als GPIIb- und GPIIIa-Untereinheiten identifizieren (siehe Abb. 4-15, Seite 93). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Immunchromatographie sich zur praktischen Anwendung der Aufreinigung von Plättchenantigenen einsetzen lässt. Mittels Western-Blot-Analyse wurde die Antigenität der isolierten Proteine überprüft. Dafür wurden zwei monoklonale Antikörper SZ21 und SZ22, die gegen  $\beta$ 3 bzw. gegen  $\alpha$ IIB gerichtet sind, eingesetzt. In diesem Experiment konnte die Reaktivität der gereinigten Proteine bestätigt werden. Beide monoklonale Antikörper zeigten spezifische Banden mit einem Molekulargewicht von 130kDa (GPIIb) und 90kDa (GPIIIa) (siehe Abb. 4-16, Seite 93).

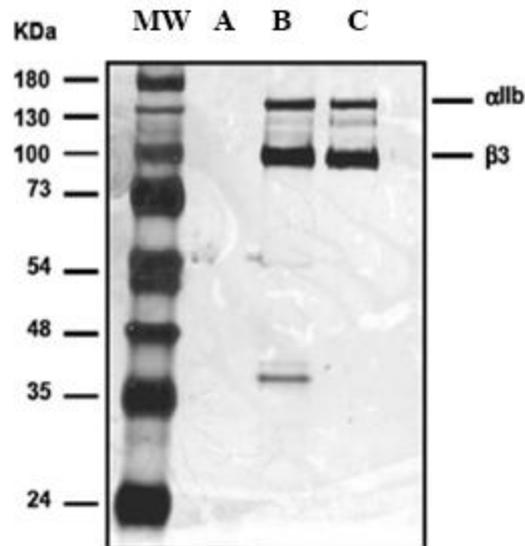


Abb. 4-15 Immunchemische Analyse bestätigt die Reinheit und Aktivität der isolierten  $\alpha$ II $\beta$ 3-Protein-Fractionen. Silberfärbung nach Auftrennung der Plättchenproteine in einer SDS-PAGE zeigt die  $\alpha$ IIb- und  $\beta$ 3-Untereinheit. MW: Molekulargewichtsmarker; (A) Durchlauf der Proteinfraction; (B) isoliertes HPA-1a-Protein; (C) isoliertes HPA-1b-Protein

Abbildung (Abb. 4-16, Seite 93) zeigt die Detektion sowie die Aktivität des GPIIb/IIIa Proteins im Western-Blot nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran.

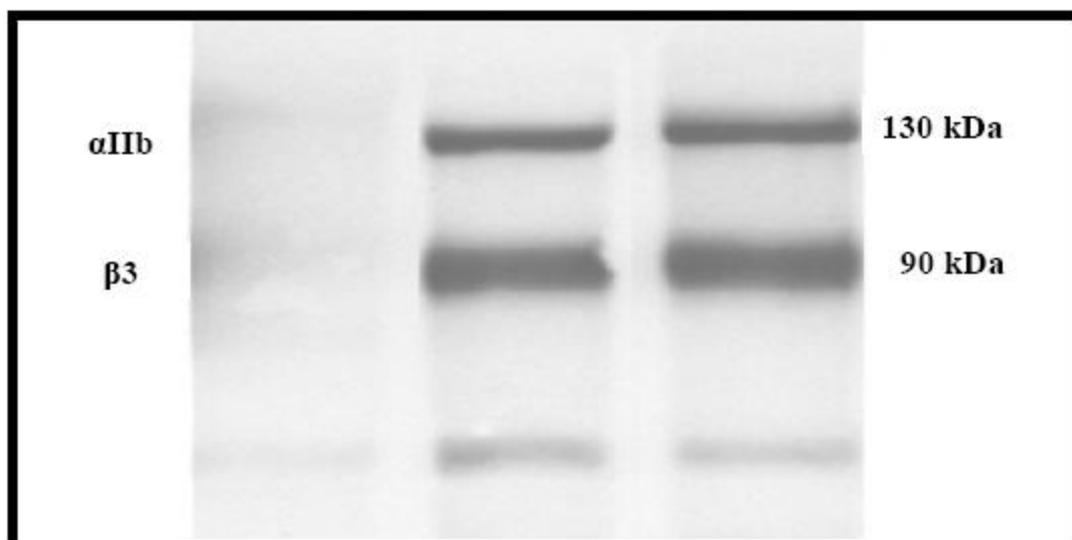


Abb. 4-16 Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde die Aktivität des GPIIb/IIIa Antigens durch Inkubation mit mAK gegen  $\alpha$ IIb (SZ22) und gegen  $\beta$ 3 (SZ21) analysiert

### 4.3.1 Qualitätskontrolle des Systems mit einem neu entwickelten Testverfahren für die FACS-Analyse

Die Mehrheit der komplementfixierenden Seren braucht die Anwesenheit von GPIIb/IIIa, um Komplement rekrutieren zu können. Auf diesem Prinzip aufbauend wurde ein neues, auf antigenbeschichteten Partikeln basierendes Testverfahren entwickelt. Aus Plättchenkonzentraten isoliertes  $\alpha$ IIB $\beta$ 3-Protein wurde über N-Hydroxy-Succinimido-LC-Biotin an Streptavidinbeschichtete Partikel gekoppelt. Für die Qualitätskontrolle unseres Systems wurden sowohl an GPIIb/IIIa gekoppelte Partikel einerseits als auch rinderserumalbumin beschichtete Partikel (BSA-Partikel) andererseits eingesetzt, und in parallelen Ansätzen mit zwei monoklonalen Antikörpern inkubiert.

- Gi5: gegen GPIIb/IIIa
- Gi9: gegen GPIa/IIa

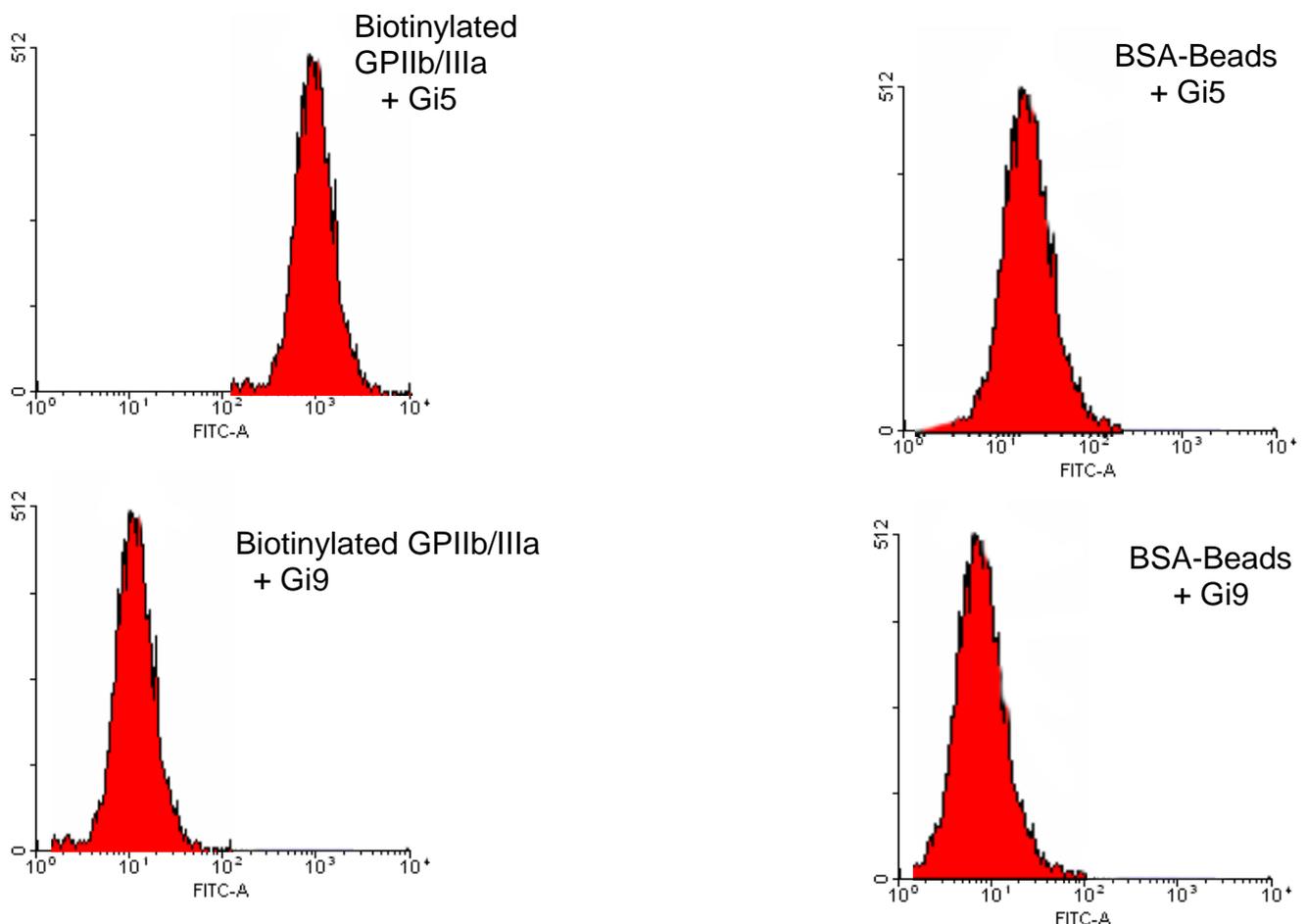


Abb. 4-17 Zur Sicherheitskontrolle des verwendeten Systems wurden streptavidinbeschichtete Partikel einerseits und rinderserumalbumin beschichtete Partikel (BSA-Partikel) andererseits eingesetzt und verglichen. Zwei spezifische monoklonale Antikörper, Gi5 gegen GPIIb/IIIa und Gi9 gegen GPIa/IIa, wurden auf ihre Bindung an die verwendeten Partikel getestet. Die Detektion erfolgte mit FITC markiertem anti-mouse-IgG Antikörper

Hier war deutlich zu erkennen, dass der monoklonale Antikörper Gi5 eher an die mit GPII/IIIa beschichtete Partikel und nicht an die BSA-Partikel bindet. Auch der monoklonale Antikörper Gi9 war nicht in der Lage, sich an die mit GPII/IIIa beschichtete Partikel zu binden, was die Spezifität unseres Systems bestätigt.

### 4.3.2 Systemaufbau für die FACS-Analyse

Das folgende Bild zeigt schematisch den Systemaufbau, der zur Analyse in die Durchflusszytometrie verwendet wurde.

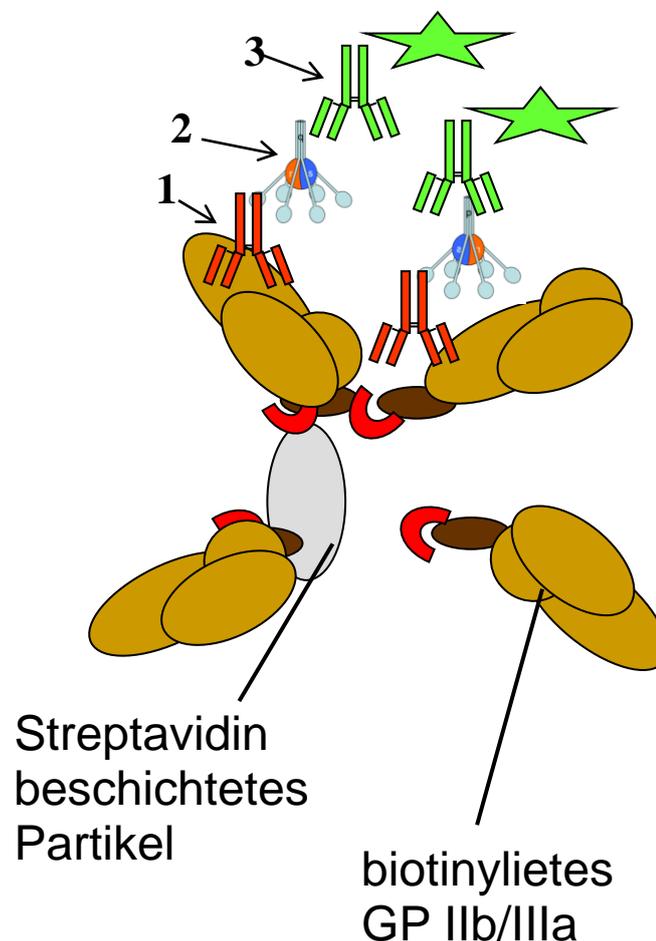


Abb. 4-18 Systemaufbau für die durchflusszytometrische Analyse schematisch dargestellt: Aus Plättchenkonzentraten isoliertes  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Protein wurde über N-Hydroxy-Succinimido-LC-Biotin an Streptavidinbeschichtete Partikel gekoppelt und mit den zu untersuchenden Seren inkubiert. C1q-Komplement wurde zugegeben und das ganze mit fluoresceinkonjugierten Anti-C1q-Komplement-Antikörper für die Durchflusszytometrie markiert. (1) aus ITP-Serum stammende Antikörper; (2) C1q-Komplement-Komponente; (3) fluoresceinkonjugierter anti-C1q-Komplement-Antikörper

### 4.3.3 Komplementbindungs-Test mit Seren von verschiedenen Patientenkollektiven

In diesem Versuch wurde die Spezifität der Antikörper- und Komplementbindung mit Seren von ITP-Patienten, sowie von Patienten mit NAIT, PTP und HIT-Typ II durchflusszytometrisch überprüft und validiert.

Zur Evaluation der Methode wurden ferner AB-Serum eines gesunden Spenders (Normalhumanserum) als negative Kontrolle für die Komplementfixierung und ein Pool aus 20

Seren von ITP-Patienten, welche in diesem Test bekanntermaßen durch ihre Komplementbindung die Erythrozytenlyse vollständig hemmen als positive Kontrolle eingesetzt.

Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse der FACS-Analyse mit den verschiedenen Kollektiven zusammen.

Tab. 4-14 Wie erwartet und in den vorherigen Versuche bestätigt wurde, konnte die Hälfte der Seren von ITP-Patienten mit gebundenen anti-GPIIb/IIIa, C1q-Komplement auf die mit GPIIb/IIIa gekoppelten Partikel fixieren. Die Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity: MFI) wurde auf den MFI der Negativkontrolle (AB-Serum eines normalen Spenders) normalisiert (mean MFI 23,020; range, 5,412-77,391; cut-off MFI 1,811). Nur 2/56 (3,6%) Kontrollen aus drei verschiedenen Kollektive gaben falsche positive Signale (mean MFI 1,011; range, 448-16,141)

Kollektive	ITP-Seren ohne freien AK		Seren von Patienten mit HIT-Typ II	Seren von gesunden Spender
	nur anti-GPIIb/IIIa	nur anti-GPIb/IX		
Frequenz der positiven Ergebnisse	13/24 (54%)	1/16 (6%)	1/20 (5%)	0/20 (0%)
Frequenz der negativen Ergebnisse	11/24 (46%)	15/16 (94%)	19/20 (95%)	20/20 (100%)
Gesamt	24	16	20	20

#### 4.3.3.1 Auswertung der Ergebnisse von ITP-Seren in FACS

Tab. 4-15 Durchflusszytometrische Analyse der Komplement-C1q-Bindung durch Autoantikörper in Seren von ITP Patienten. Die Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity:MFI) wurde auf den MFI der Negativkontrolle (AB-Serum eines normalen Spenders) normalisiert (mean MFI 23,020; range, 5,412-77,391; cut-off MFI 1,811)

Kollektive	ITP-Seren mit freien und gebundenen AK	
	nur anti-GPIIb/IIIa	nur anti-GPIb/IX
Frequenz der positiven Ergebnisse in MKBR	24/24 (100%)	1/16 (6%) *
Frequenz der Seren, die in FACS C1q fixieren	23/24 (96%)	1/16 (6%) *
Gesamt	24	16

\* Bei diesem Serum handelt es sich um ein und dasselbe Serum

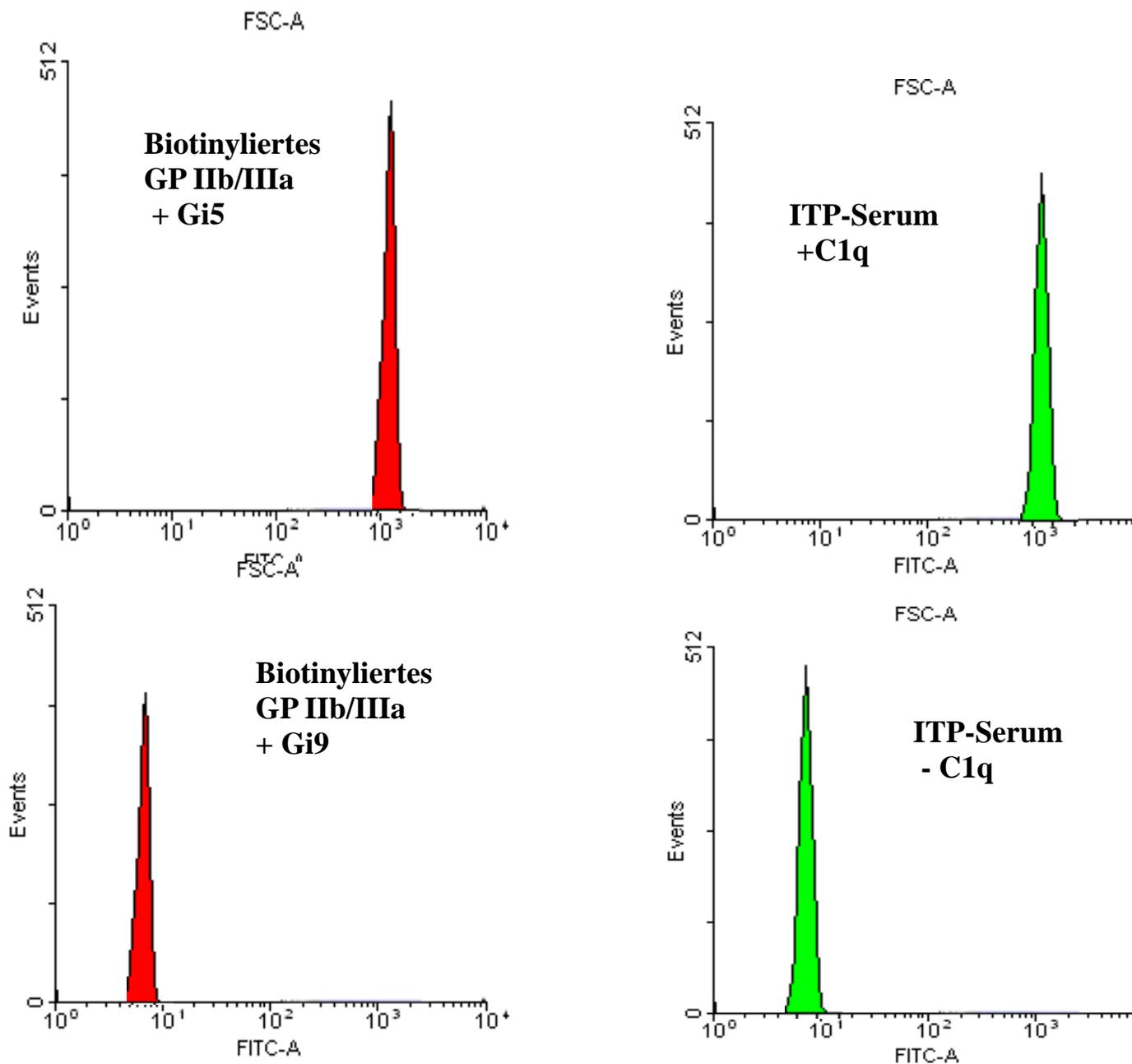


Abb. 4-17 Durchflusszytometrische Analyse detektiert Komplement C1q-Bindung durch Antikörper von ITP-Patienten in Anwesenheit von C1q-Komplement, in seiner Abwesenheit hingegen nicht. Zur Kontrolle des verwendeten Systems wurden erneut zwei spezifische monoklonale Antikörper, Gi5 gegen GPIIb/IIIa und Gi9 gegen GPIa/IIa, auf ihre Bindung an das biotinylierte Antigen getestet. Mit GPIIb/IIIa beschichtete Partikel wurden mit inaktiviertem ITP-Serum in Abwesenheit oder Anwesenheit von Komplement (C1q-Komplement) inkubiert und die Komplementbindung über einen FITC-konjugierten anti-human-C1q-Antikörper detektiert. Die Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity: MFI) wurde auf den MFI der Negativkontrolle (AB-Serum eines normalen Spenders) normalisiert (mean MFI 23,020; range, 5,412-77,391; cut-off MFI 1,811)

Die Zuverlässigkeit des entwickelten Testverfahrens wurde sowohl durch Einsetzen von spezifischen monoklonalen Antikörpern als auch durch Testen von mit BSA beschichteten Partikeln bestätigt. Die Hälfte der Seren von ITP-Patienten mit gebundenen anti-GPIIb/IIIa konnte C1q-Komplement auf die mit GPIIb/IIIa gekoppelten Partikel fixieren, wohingegen nur 2/56 (3,6%) Kontrollen aus drei verschiedenen Kollektiven falsche positive Signale gaben.

#### **4.3.4 Mikropartikel**

Es ist bekannt, dass aktivierte Blutplättchen Vesikel freisetzen, die als Blutplättchen-Mikropartikel (BMP) bezeichnet werden. Diese so genannten Mikropartikel sind zwar kleiner als reguläre Blutplättchen [ $\varnothing$  0,02 (Wu, et al., 1975) bis 0,5 $\mu$ m (Ault, 2001)], tragen jedoch ebenfalls spezifische Oberflächenmarker wie GPIIb/IIIa und GPIb/IX.

#### **4.3.5 Abgrenzung der Thrombozyten gegen andere Zellen**

Thrombozytäre Strukturen, d.h. Singulettten, Aggregate und Mikropartikel, können im Durchflusszytometer anhand einer Kopplung an thrombozytenspezifische PE-markierte CD 42b-Antikörper identifiziert und im so genannten „Dot Plot“ (Dean, 1990) von anderen Zellen oder Partikeln abgegrenzt werden. Es wurde ein Schwellenwert definiert, welcher sämtliche CD42b-negativen Zellen und Partikel (Erythrozyten, Leukozyten etc.) von der weiteren Analyse ausschloss.

Einzelne Thrombozyten (Singulettten), Thrombozyten-Aggregate und Thrombozyten -Mikropartikel stellen sich aufgrund verschiedener Lichtstreuung im Forward-Scatter unterschiedlich dar und können daher differenziert werden. Die Durchflusszytometrie von Thrombozyten könnte bezüglich dieser Differenzierung einen prädikativen Wert besitzen.

Mit dem folgenden Versuch soll die Rolle des Komplements für die BMP-Bildung überprüft werden. Dazu wurden Blutplättchen mit Seren inkubiert und die BMP-Bildung durchflusszytometrisch verfolgt. Sowohl Seren, die komplementaktivierende Aktivität aufweisen, als auch solche, die nicht zur Komplementaktivierung führen, wurden eingesetzt.

4.3.5.1 Darstellung der Ergebnisse

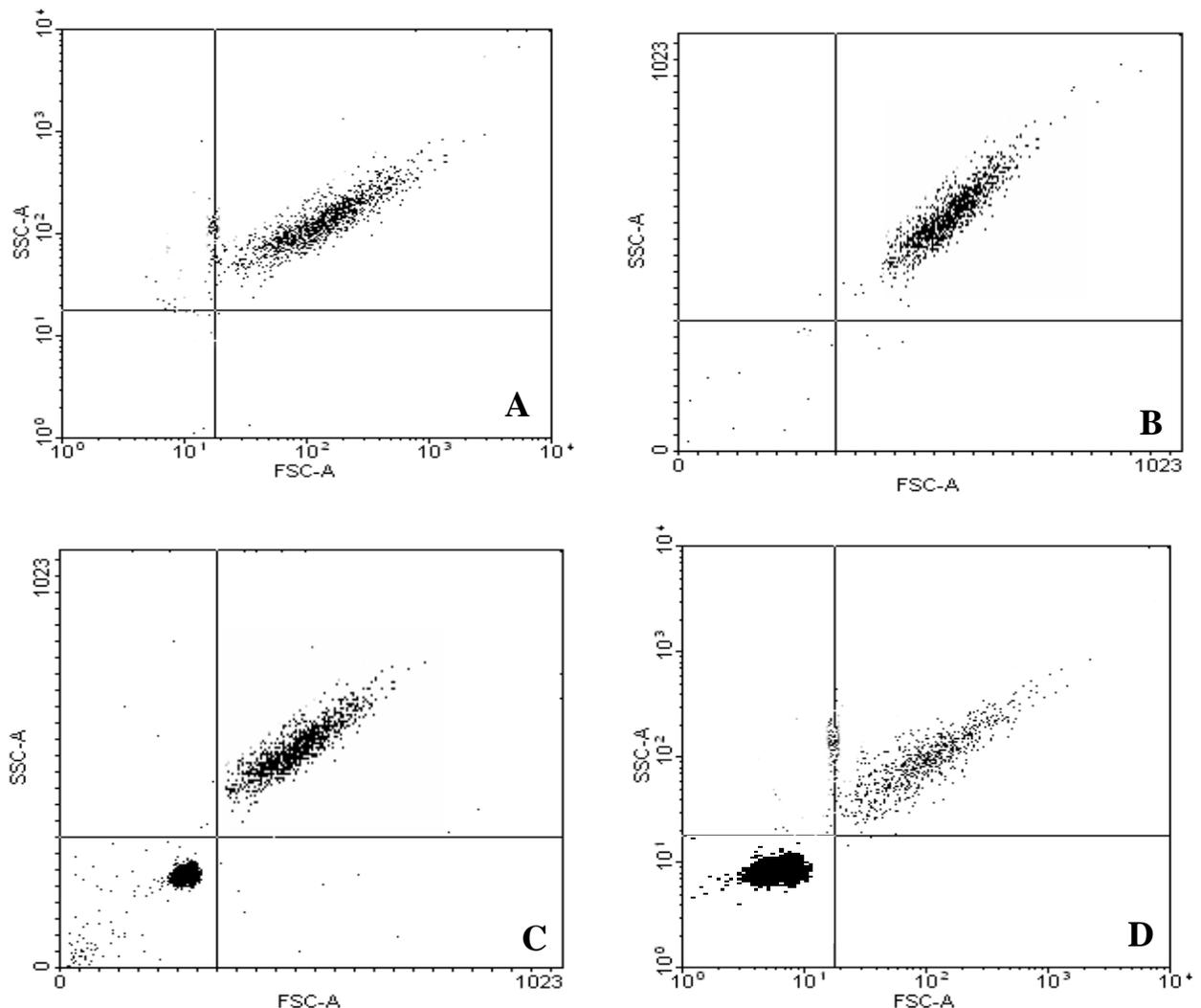


Abb. 4-20 Die Bildung von Blutplättchen-Mikropartikel (BMP) ist bei in der MKBR positiv getesteten Seren konzentrationsabhängig, bei negativ untersuchte Seren dagegen nicht. A: PRP + 25µl in der MKBR negativ getestetes Serum; B: PRP + 50µl in der MKBR negativ getestetes Serum; C: PRP + 25µl in der MKBR positiv getestetes Serum; D: PRP + 50µl in der MKBR positiv getestetes Serum

Tab. 4-16 IgG-Fractionen aus Seren, von denen 10 in der MKBR positiv getestet und 10 negativ getestet sind, wurden auf ihre Fähigkeit, Mikropartikel zu bilden im FACS analysiert

FACS-Analyse der Mikropartikelbildung	IgG-Fractionen der in MKBR positiv getestete Seren (n=10)	IgG-Fractionen der in MKBR negativ getestete Seren (n=10)
Anzahl der Seren, die Mikropartikel bilden	5/10 (50%)	1/10 (10%)

Im Vergleich der in MKBR positiv und negativ untersuchten Seren, ist eine signifikante Diskrepanz bezüglich der Blutplättchen-Mikropartikel-Bildung deutlich in den „Dot Plots“ zu erkennen. Die Blutplättchen, die mit in Komplementbindungs-Test positiv getestete Seren inkubiert wurden, bilden mehr Mikropartikel verglichen mit Seren ohne Komplementaktivierung. Die BMP-Bildung ist von der Konzentration des komplementbindenden Serums abhängig. Auffällig ist, dass nicht alle Seren bzw. ihre IgG-Fractionen, die vorher in der MKBR Komplement aktiviert haben, auch eine Mikropartikelbildung hervorrufen können.

## 5 Diskussion

Die Immnthrombozytopenie ist eine chronische Autoimmunerkrankung, die mit einer Inzidenz von 5,8-6,6 pro 100.000 Erwachsene zu den häufigsten Ursachen einer gestörten zellulären Gerinnung zählt. Frauen sind rund dreimal häufiger betroffen als Männer. Bei Kindern ist die Inzidenz mit 4,0-5,3 etwas niedriger. Das klinische Bild der ITP ist ausgesprochen variabel. Ein Teil der Patienten hat keine Symptome und die Krankheit wird zufällig entdeckt. Andere Patienten müssen wegen akuter Blutungen sofort in die Klinik. Ein typisches Merkmal der ITP sind kleine rötlich-braune "flohstichartige" Flecken, die so genannten "Petechien", die meistens zuerst an den Sprunggelenken und Unterschenkeln, seltener auch an den Unterarmen bemerkt werden. Erste Zeichen können auch "blaue Flecken" sein, die schon bei leichtem Anstoßen oder ohne vorhergehende Verletzung entstehen und sich sogar bis zu großen Blutgerinnseln ausdehnen können. Ein weiteres Indiz ist verstärktes Nasen- oder Zahnfleischbluten. Bei Frauen sind starke Monatsblutungen auffällig. Im Extremfall können Blutungen im Magen-Darm-Trakt oder sogar lebensgefährliche Hirnblutungen auftreten. Es besteht kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen der Zahl der Thrombozyten und der Blutungsneigung.

Nachwievor gilt die Diagnose einer ITP als klassische Ausschlussdiagnose, da Unklarheit über die diagnostische Aussagekraft verschiedener, potentiell hilfreicher Biomarker der Erkrankung besteht. Aus den Pathomechanismen lassen sich einige Biomarkern ableiten, denen diagnostische Relevanz im Sinne eines positiven Krankheitsnachweises zukommen kann: Biomarker der Autoimmunreaktion (Leptin, freie und gebundene Autoantikörper gegen Thrombozyten, Nachweis spezifischer B-Lymphozyten) und Biomarker der Thrombopoese (Knochenmarkhistologie, Thrombopoietin, Glykocalicin, retikulierte Thrombozyten). In Anbetracht der modernen Entwicklungen von Therapiemöglichkeiten (TPO-Agonisten) scheint der Nachholbedarf für einen Diagnosemarker besonders dringlich.

Werden diese Biomarker für die Diagnose der ITP in Betracht gezogen, stellt man fest, dass keiner dieser Parameter jedoch zuverlässig mit der Hämolysestärke korreliert. Somit konnte für die ITP kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Antikörperklasse, Titer oder Antigenspezifitäten einerseits und dem Ausmaß der Thrombozytenzerstörung andererseits festgestellt werden. Es fehlt also ein verlässlicher Parameter, der eindeutige Rückschlüsse auf den Schweregrad der Hämolyse beziehungsweise der Thrombozytopenie zulässt.

---

In der vorliegenden Arbeit wurde die Beteiligung des Komplements an der Entwicklung der Autoimmunthrombozytopenie untersucht. Ziel dabei war einen tieferen Einblick über die Rolle des Komplements in der ITP zu erhalten. Es sollte auch geklärt werden, welche Rolle spezifische Plättchenantikörper dabei spielen und ob der Nachweis solcher Antikörper zur Diagnose einer Autoimmunthrombozytopenie beitragen kann. Ebenso sollte überprüft werden, ob sich Patienten mit erhöhter Thrombozytenzerstörung bezüglich ihrer Plättchenantikörper und Komplementaktivität voneinander unterscheiden, und welchen prädikativen Wert die Komplementbindungsreaktion (Mikrokomplementbindungsreaktion: MKBR) für die Diagnose leisten kann. Zu diesem Zweck wurden Seren verschiedener Patientenkollektive und gesunder Blutspender in verschiedenen Testverfahren untersucht und verglichen.

Jüngste Entwicklungen zeigen, dass insbesondere eine verbesserte Autoantikörperdiagnostik zentrale Bedeutung haben könnte, zumal prognostische und therapeutische Konsequenzen mit dem Nachweis von Autoantikörpern verknüpft zu sein scheinen.

Autoantikörper können sowohl als Zufallsbefund beim symptomlosen Gesunden als auch im Zusammenhang mit jeder Verlaufsform vom moderaten Krankheitsbild ohne Therapiebedarf bis hin zum lebensbedrohlichen Zustand detektiert werden. Antikörper können frei im Serum (freie Autoantikörper) oder gebunden an Thrombozyten (gebundene Autoantikörper) nachgewiesen werden. Ursprüngliche diagnostische Verfahren konzentrierten sich auf den Nachweis der Gesamt-Immunglobuline auf Thrombozyten (platelet associated IgG, PAIgG) (Li, et al., 2001). Bei den Testverfahren wurden neben den Autoantikörpern auch gespeichertes IgG in den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten, auf Fc-Rezeptoren immobilisiertes IgG und unspezifisch an die Thrombozytenoberfläche immobilisiertes IgG nachgewiesen. Nicht überraschend, variiert die Sensitivität des PAIgG-Nachweises laut Studien zwischen 59,5% und 74% und die Spezifität zwischen 19% und 74%. Auch die Menge des pro Thrombozyt nachgewiesenen IgG variiert (je nach Nachweisteknik) beachtlich zwischen 0,02 und 400fg/Thrombozyt (Chong, et al., 2000).

Aufgrund der niedrigen Spezifität des PAIgG-Nachweises im Vergleich zu anderen glykoproteinspezifischen Nachweismethoden erlangte der Nachweis keine bedeutende diagnostische Relevanz.

Autoantikörper gegen Antigene auf dem GPIIb/IIIa-Komplex und GPIb/IX-Komplex sind unter anderem die am häufigsten serologisch nachgewiesenen Antikörper bei Patienten mit ITP (Kiefel, et al., 1996). Die durch Autoantikörper induzierten Thrombozytopenien können zu mehr oder weniger schweren Blutungsmanifestationen vom thrombozytopenischen Typ führen. Petechien und

Hautblutungen stehen im Vordergrund. Schleimhautblutungen mit Blutaustritt aus Körperöffnungen weisen auf eine schwere hämorrhagische Diathese hin. In seltenen Fällen treten intrazerebrale Blutungen auf, die oft schwerwiegende neurologische Komplikationen hinterlassen. Alle Laborparameter sind, mit Ausnahme der isolierten Thrombozytopenie, in unkomplizierten Fällen unauffällig. Eine zeitnahe Identifizierung dieser Autoantikörper kann die rechtzeitige Durchführung der adäquaten Therapie ermöglichen und erspart damit gefährliche Komplikationen. Mit den gegenwärtig vorhandenen Nachweismethoden ist eine schnelle Nachweisbarkeit nur bedingt möglich.

Aus diesem Grund soll in dieser Arbeit eine Methode zum Nachweis von Autoantikörpern entwickelt werden, die zuverlässig, einfach und schnell durchführbar ist. Diese Testmethode soll zeitnah die klinische Diagnose unterstützen, um die Dauer bis zur Einleitung der adäquaten Therapie zu verkürzen und Blutungskomplikationen zu vermeiden.

In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche Tests mit sehr unterschiedlicher Empfindlichkeit publiziert (Janisiw, et al., 1998; Hagenstöm, et al., 2000). Viele dieser Tests weisen thrombozytenassoziierte Immunglobuline (d.h. auf der Thrombozytenoberfläche oder intrazellulär vorhandenes Immunglobulin) ohne glykoproteinspezifische Bindung nach. Sie können nicht unterscheiden zwischen spezifisch gebundenen Immunglobulinen und adsorbierten Immunkomplexen ohne eine pathophysiologische Wirkung (Legler, et al., 1997; Janisiw, et al., 1998).

Heute ist der Plättchenimmunfluoreszenztest (Von dem Borne, et al., 1978; Schneider, et al., 1981) weit verbreitet. Bei diesem Testsystem handelt es sich um einen Antiglobulintest, der fluoreszenzmarkierte, antihumane-Antikörper verwendet. Alternativ lassen sich auch enzym- (Taaning, 1985) oder radioaktivmarkierte (Mueller-Eckhardt, et al., 1978) Sekundärantikörper verwenden. In neuerer Zeit wird auch zunehmend die Durchflusszytometrie zum Nachweis von Antikörpern gegen Thrombozyten eingesetzt (Tazzari, et al., 1995; Janisiw, et al., 1998). Alle oben beschriebenen Testsysteme sind mit wesentlichen Nachteilen verbunden. Es ist mit ihnen nicht möglich, thrombozytenspezifische Antikörper von HLA-Antikörpern zu differenzieren. Somit lässt sich die Spezifität der Antikörper nicht immer aufklären und die Auswahl antigenkompatibler Thrombozytenkonzentrate zur Transfusion ist praktisch nicht möglich.

Die Sensitivität der beschriebenen Testsysteme hinsichtlich des Nachweises thrombozytärer Autoantikörper ist sehr hoch, die Spezifität ist jedoch äußerst gering. Dies liegt vor allem daran, dass diese Testsysteme sowohl unspezifisch an die Thrombozytenmembran angelagerte als auch an

thrombozytäre Fc-Rezeptoren gebundene IgG-Moleküle (sog. Plättchen-assoziiertes IgG, Pa-IgG) detektieren können. Gerade bei Patienten mit nicht-immunologischer Thrombozytopenie lässt sich ein erhöhtes Pa-IgG nachweisen (Sinha, et al., 1990; Warner, et al., 1999).

Erst durch die Einführung glykoproteinspezifischer Testverfahren konnten thrombozytäre Antikörper antigenspezifisch nachgewiesen werden. Zunächst wurden Immunoblotting- und Radioimmunopräzipitationstests verwendet (Huisman, 1986; Santoso, et al., 1989). Die Durchführung dieser Testsysteme ist an die Durchführung einer Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) gebunden. Daher sind sie technisch nicht nur sehr komplex und zeitaufwendig, sondern es können auch nur Antikörper gegen Antigene nachgewiesen werden, deren korrespondierendes Antigen durch die Behandlung mit SDS nicht denaturiert wird.

Die Einführung des Immunobead Assays (McMillan, et al., 1987) und des Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA) Assays (Kiefel, et al., 1987; Kiefel, 1992) erlaubte es schließlich ein glykoproteinspezifisches Testsystem für die Routinediagnostik einzusetzen. Bei diesem Testsystem werden die autologen Thrombozyten des Patienten bzw. Thrombozyten bekannter Spender, die zuvor mit Patientenserum inkubiert wurden, mit einem monoklonalen Mausantikörper inkubiert. Nach Lyse der Thrombozyten werden die Glykoproteine über die monoklonalen Mausantikörper an eine mit polyklonalen Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte immobilisiert. Als Detektionsantikörper wird ein enzymmarkierter (Peroxidase) Ziege-anti-Human-IgG- Antikörper eingesetzt, welcher in einer chromogenen Enzym-Substrat-Reaktion den Nachweis der gebundenen Humanantikörper ermöglicht. Die Spezifität des MAIPAs beim Nachweis antithrombozytärer Autoantikörper wird mit bis zu 95% angegeben (Warner, et al., 1999; Kiefel, 2001). Verglichen mit den oben beschriebenen Testsystemen liegt die Sensitivität des MAIPAs beim Nachweis von Autoantikörpern nur zwischen 50 und 70% (Warner, et al., 1999).

Bisher wird der MAIPA-Test nur in wenigen spezialisierten Laboren angeboten, da die technische Durchführung anspruchsvoll und zeitaufwendig ist. Dadurch ist eine schnelle Diagnostik vor allem in peripheren Krankenhäusern nicht immer verfügbar. Im Vergleich zum Bindungstest mit intakten Zellen (PAIFT) weist der MAIPA-Test gelegentlich eine niedrige Sensitivität auf (Gonzalez-Conejero, et al., 1996). Neuere Hinweise deuten daraufhin, dass bestimmte Antigenstrukturen aufgrund des Solubilisierungsprozesses leiden (Harrison, et al., 2003).

Im MAIPA-Test dienen monoklonale Antikörper der Immobilisierung von thrombozytären Glykoproteine. Theoretisch könnten diese monoklonalen Antikörper mit den gleichen Epitopen

---

reagieren, welche von den humanen Antikörpern erkannt werden. Dadurch kann eine kompetitive Inhibition entstehen, die zu falschen negativen Ergebnissen führt (Morel-Kopp, et al., 1996). Es ist bekannt, dass thrombozytäre Antikörper verschiedene Epitope erkennen können, die sich von einem Individuum zum anderen unterscheiden (Kroll, et al., 2005). Aufgrund dieser Heterogenität ist die Vorhersage einer kompetitiven Inhibition zwischen monoklonalen und humanen Antikörpern schwierig und stellt deshalb ein großes Problem bei der Auswahl der geeigneten monoklonalen Antikörper dar. Manche Laboratorien verwenden verschiedene monoklonale Antikörper, die gegen unterschiedliche Epitope gerichtet sind, um das Problem zu umgehen (Allen, et al., 1994). Die Verwendung verschiedener monoklonaler Antikörper ist mit einem großen Zeit- und Personalaufwand verbunden und führt zur Verzögerung der Diagnose.

Bei der Durchführung des MAIPA-Tests sind zahlreiche Waschprozesse unabdingbar. In unserer Arbeitsgruppe konnten wir beobachten, dass sich manche thrombozytäre Antikörper im MAIPA-Test nicht nachweisen lassen. Daher gilt, ein positiver Antikörpernachweis kann die Diagnose ITP bestätigen, der negative Test schließt sie aber nicht aus.

Mit Hilfe der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Technik (Surface Plasmon Resonance SPR) wurde gezeigt, dass solche Antikörper in der SPR reagieren, obwohl sie eine niedrige Bindungsaffinität besitzen (Socher, et al., 2007). Bei der SPR-Technik wurde die direkte Interaktion zwischen Antigen und Antikörper ohne Waschschrte gemessen (Cooper, et al., 1999). Dieser Vorteil ermöglicht sogar niedrigaffine Antikörper nachzuweisen. Möglicherweise führte das häufige Waschen im MAIPA-Test zur Abdissoziation solcher niedrigaffiner Antikörper.

Nguyen und Mitarbeiter führten einen Test zur simultanen Bestimmung und Differenzierung von verschiedenen spezifischen Thrombozyten-, IgM- und IgG-Antikörpern mittels Durchflusszytometrie durch (SASPA = simultaneous analysis of specific platelet antibodies) (Nguyen, et al., 2004). Dieser durchflusszytometrische Test verwendet Partikel mit unterschiedlicher Fluoreszenzintensität, welche mit monoklonalen Antikörpern gegen Mausimmunglobuline beladen sind. Hierdurch ist es möglich, simultan Antikörper gegen die verschiedenen thrombozytären Antigene nachzuweisen. Allerdings benötigt der SASPA-Test viel Erfahrung bei der Anwendung der Durchflusszytometrie und einen hohen apparativen Aufwand. Hinsichtlich Sensitivität und Spezifität ist der SASPA dem MAIPA vergleichbar. Es steht außer Frage, dass Autoantikörper gegen Thrombozyten Biomarker mit diagnostischer Relevanz sind, die verbreitet anerkannt wird (Chong, et al., 2000; McMillan, 2005). Aufgrund der hohen Spezifität kann ihr Nachweis die ITP-Diagnose bestätigen; aufgrund der niedrigen Sensitivität kann ihr fehlender Nachweis die Diagnose aber nicht ausschließen. Neben der unmittelbaren Relevanz für die ITP-Diagnose ergeben sich erste

Hinweise auf eine prognostische und therapeutische Relevanz der Antikörperbestimmung. So haben ITP-Patienten mit positivem Autoantikörpernachweis eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit für eine klinische Verschlechterung als ITP-Patienten ohne Antikörpernachweis (Fabris, et al., 2004). Tierexperimente legen nahe, dass Antikörper gegen GPIb/IX mit einem schlechteren Ansprechen auf Immunglobuline assoziiert sein könnten als Antikörper gegen GPIIb/IIIa (Webster, et al., 2006).

Die spezifische Ermittlung der relevanten Antikörper bleibt unerlässlich für Diagnose und Therapie der Immunthrombozytopenie. Die Frage, warum die Sensitivität bei ihrer Bestimmung im MAIPA-Test so niedrig ist, ist unzureichend beantwortet. Aus immunologischer Sicht wird diskutiert, ob eine Ausweitung der Zielantigene (insbesondere auf die Antigene der Glykoproteine V, Ia/IIa, VI und CD62), die Erfassung weiterer Antikörperklassen (IgM, IgA) oder der Einsatz verschiedener immobilisierender Antikörper dazu beitragen kann, die Sensitivität zu verbessern. Das letztgenannte Argument wird unter der Annahme eingebracht, dass der monoklonale, an die Testplatte gebundene Antikörper zur Immobilisierung des Glykoproteins (GP) mit den nachzuweisenden Autoantikörpern um die Bindungsstelle am Antigen konkurriert. Mehrere Studien zeigen aber, dass Antikörper, die nicht gegen GPIIb/IIIa oder GPIb/IX gerichtet sind, nur selten als alleinige Entität, sondern meist begleitend zu klassischen Autoantikörpern vorliegen. Ebenso werden IgA- und IgM-Antikörper meist zusammen mit IgG-Antikörpern nachgewiesen (Chong, et al., 2000), so dass die Ausweitung der Antikörpernachweisverfahren auf zusätzliche Antigene und weitere Antikörperklassen nur geringe Verbesserungen der Sensitivität erwarten lässt. Das gilt ebenso für weitere immobilisierende Antikörper. Relevant sein könnte, ob unter Testbedingungen nur Antikörper von der Thrombozytenoberfläche nachgewiesen werden oder auch Antikörper aus dem Thrombozyteninneren (mit)erfasst werden. Auch hier ergaben Vergleiche nur geringe Sensitivitätsunterschiede (Chong, et al., 2000).

Eine plausible Erklärung für einen negativen Befund des direkten MAIPA-Tests bei ITP-Patienten ist, dass die Autoantikörper dieser Patienten gegen andere Glykoproteine auf der Thrombozytenmembran gerichtet sind, die in diesem Test nicht untersucht wurden.

Ein vielversprechendes Zielantigen ist GPV, da es schon in anderem Zusammenhang beschrieben wurde, z.B. bei medikamentösabhängiger Thrombopenie (Kiefel, et al., 1993) und bei virusabhängiger Thrombopenie (Mayer, et al., 1996). Außerdem wurden Antikörper gegen GPV bei ITP-Patienten nachgewiesen (Joutsu-Korhonen, et al., 2001).

Thrombozytenassoziierte IgG (PA-IgG) zeigen häufig Spezifität gegen Glykoprotein GPIIb/IIIa und/oder GPIb/IX. Da ein hoher Anteil der Patienten mit positiv Thrombozyten-assoziierten Immunglobulinen (PA-IgG) nicht durch die oben erwähnten Spezifitäten erklärt werden können, stellen Studien, die andere Zielproteine im Vordergrund stellen einen sinnvollen Ansatz dar.

Die Arbeitsgruppe um Joutsu-Korhonen untersuchte im direkten MAIPA-Test die Spezifität des Thrombozyten-assoziierten IgG (PA-IgG), die gegen GPV gerichtet sind. Sie verwenden dafür den monoklonalen Antikörper SW16 (Joutsu-Korhonen, et al., 2001). In dieser Studie wurden 69 ITP-Patienten untersucht, die zuvor im Immunfluoreszenz-Test (PIFT: platelet immunofluorescence test) eine starke positive Reaktion lieferten. In 15 von 69 (22%) der Patienten könnten Antikörper gegen das Glykoprotein GPV nachgewiesen werden. Die Gruppe stellte außerdem fest, dass die im PIFT gemessene Thrombozyten-assoziierte Immunglobuline und die im direkten MAIPA gegen GPIIb/IIIa und/oder GPIb/IX gerichteten Antikörper direkt mit den gegen GPV gerichteten Antikörper korrelieren ( $P < 0.001$ ).

Bei einem Patienten sind GPV-spezifische Antikörper mit Chinidin-induzierter Thrombozytopenie assoziiert. Obwohl bei dem Patienten stark positive GPV-spezifische Antikörper nachweisbar sind, blieb der Nachweis im direkten MAIPA-Test für GPIIb/IIIa und GPIb/IX negativ. Zwei Patienten, die wegen einer mit Gold-Therapie assoziierten Thrombozytopenie untersucht wurden, zeigten ein stark positives GPV-spezifisches Thrombozyten-assoziiertes IgG. Bei einem Patienten mit rheumatoider Arthritis und schwerer Gold-induzierten Thrombozytopenie sank die Höhe der GPV spezifischen IgG während der Erholungsphase. So kann GPV ein wichtiges Zielantigen bei der autoimmunvermittelten Thrombozytopenie darstellen, vor allem bei der drogeninduzierten Thrombozytopenie (Joutsu-Korhonen, et al., 2001).

Über einen Zeitraum von 8 Jahren (2000-2007) wurde EDTA-antikoaguliertes Vollblut von 9.421 Patienten mit Thrombozytopenie an unser Labor eingesandt. Ein Fragebogen, mit dem relevante Kriterien für die Widerlegung oder Bestätigung von ITP gemäß den britischen Richtlinien abgefragt wurden, einschließlich Fragen zur Allgemeinanamnese und zur Blutungsanamnese, Fragen zum körperlichen Allgemeinzustand sowie zum Blutbild (Br J Haematol 2003; 120:574-96) wurde den behandelten Ärzten und Krankenhäusern zugesandt. Patienten mit anderen Diagnosen, die eine Thrombozytopenie erklären konnten, einschließlich aplastischer Anämie, Leukämie, Lymphome, myelodysplastisches Syndrom, Geschwülste, Leber-Zirrhose, Herzfehler, Knochenmark-/Blutstammzell-Transplantation, Sepsis und medikamentinduzierter Thrombozytopenie wurden nicht in die Studie eingeschlossen. Auch Patienten, die keine relevante Diagnose bezogen auf ITP zeigten, wurden von der Kohorte bei einer vergrößerten Milz ( $n=43$ ) oder bei unerklärter Leukopenie ( $n=80$ )

ausgeschlossen. Die Kontrollgruppe bestand aus 50 gesunden Blutspendern mit normaler Thrombozytenzahl. Für die weiteren Untersuchungen wurde von den 9.421 Blutproben solche ausgenommen, die folgende Kriterien aufwiesen:

- Patienten mit einer Thrombozytenzahl mehr als  $140 \times 10^9/l$
- Patienten, deren klinischen Daten nicht rechtzeitig herbeigeführt werden konnten
- und Patienten, von denen eine ausreichende Menge von Thrombozyten nicht isoliert werden konnte, um alle Laboruntersuchungen durchzuführen.

Somit verblieben 4.217 verwertbare Blutproben. In diesem Kollektiv von 4.217 Patienten konnten freie reaktive Antikörper bei 755 Proben im PAIFT detektiert werden. Die Studie wurde vom lokalen Ethischen Gremium genehmigt.

Bei 657 Probanden wurden im direkten MAIPA-Test thrombozytengebundene Antikörper nachgewiesen. Wir haben die Autoantikörper auf ihre Spezifität gegen folgende Glykoprotein-Komplexe untersucht und verglichen: GPIIb/IIIa, GPIb/IX und GPV. In den meisten Proben wurde eine Mischung aus thrombozytengebundenen Antikörpern gegen GPIIb/IIIa, GPIb/IX und/oder GPV festgestellt (379 Proben, 58%).

Im Gegensatz zu den Proben, die alle drei Antikörper enthielten, wurden in 276 (42%) Proben Antikörper gegen einen einzigen Glykoproteinkomplex nachgewiesen, von denen:

- 140 (21%) gegen GPIIb/IIIa
- 72 (11%) gegen GPIb/IX
- 64 (10%) gegen GPV gerichtet waren.

In einer früheren Studie (Joutsu, et al., 1997) konnten GPV-spezifische Antikörper auf Thrombozyten in nur 13 (28%) von 46 thrombozytopenen Patienten mit nachweisbaren GP spezifischen Antikörpern und in einer späteren Studie in nur 15 (22%) von 69 thrombozytopenen Patienten mit nachweisbaren Antikörpern (Joutsu-Korhonen, et al., 2001) gefunden werden. Jedoch war die Patientenkollektive in diesen Studien für ein stark positives Ergebnis im direkten PAIFT vorausgewählt worden und Patienten mit schwach positiven Tests waren ausgeschlossen. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass mehrere Patienten mit glykoproteinspezifischen Antikörpern durch dieses Verfahren ausgeschlossen wurden.

In unserer Studie wurden 64 von 657 Proben (10%) reaktiv in direktem MAIPA für anti-GPV als einziger Antikörper getestet. In der Studie von Joutsu-Korhonen (Joutsu-Korhonen, et al., 2001) wurde von nur einem vergleichbaren Patienten (1,5%) berichtet. Wieder kann diese Diskrepanz

---

durch den Ansatz von direktem PAIFT als einziger Entscheidungskriterium erklärt werden, besonders weil es nur 11.000 GPV-Moleküle auf die Thrombozytoberfläche lokalisiert sind, im Vergleich zu 24.000 GPIb-Molekülen und 80.000 GPIIb/IIIa Molekülen (Wagner, et al., 1996).

Die ausführliche Analyse der Patientenfragebögen offenbarte, dass alle Patienten mit anti-GPV die gegenwärtigen Kriterien für die Diagnose von ITP erfüllen. Folglich kann angenommen werden, dass das in diesen Patienten identifizierte anti-GPV ein diagnostischer Marker für die ITP ist. Eine 10%-ige Frequenz von anti-GPV als einzige Antikörperentität ist nicht überraschend, wenn man in Betracht zieht, dass die Immunisierung gegen GPIb/IX und GPV in dieser Studie im Gleichgewicht zu sein scheint: 402 Proben enthielten Antikörper gegen GPIb/IX und 406 Proben enthielten Antikörper gegen GPV. Anti-GPIb/IX als einziger Antikörper wurde in 72 (11%) Proben identifiziert, während anti-GPV als einziger Antikörper in 64 (10%) Proben festgestellt wurde. Damit ist belegt, dass GPV ein wichtiges Zielantigen ist. Kritisch muss man hinterfragen, ob die zusätzliche Untersuchung von Antikörpern gegen GPV in MAIPA die Sensitivität der Labordiagnostik für ITP verbessern kann? Prospektive Untersuchungen an gut charakterisierten Patientengruppen sind erforderlich, um die Genauigkeit und Sensitivitätswerte für den MAIPA-Test zu ermitteln. Dabei sollten die thrombozytengebundene Antikörper gegen GPV, GPIIb/IIIa und GPIb/IX im Test erfasst werden.

Wenn Antikörper von geringer Affinität eine klinische Bedeutung besitzen, stellt sich die Frage nach den möglichen Mechanismen, die dann zur Eliminierung von Thrombozyten führen.

Eine Schädigung von Thrombozyten durch Antikörper kann auf unterschiedliche Weise zustande kommen. Der wichtigste Mechanismus besteht darin, dass sich Antikörper mit ihren antigenen Bindungsstellen an ihre korrespondierenden Antigene anhaften. Wird durch die Bindung von Antikörpern an ihre Epitope das lytische Komplementsystem auf der Thrombozytenmembran aktiviert, können Blutplättchen bereits intravasal durch komplementabhängige Lyse zerstört werden. Tritt keine oder eine nur unvollständige Komplementaktivierung ein, werden die antikörperbeladenen Thrombozyten über entsprechende Rezeptoren des retikuloendothelialen Systems (RES) aus der Blutbahn eliminiert. Da Thrombozyten aber auch Rezeptoren für den Fc-Teil von IgG-Antikörpern besitzen (Rosenfeld, et al., 1989), ist eine Schädigung von Blutplättchen auch durch Anhaftung von zirkulierenden Immunkomplexen, die aus nicht gegen Thrombozytenantigene gerichteten Antikörpern und löslichen oder partikulären Antigenen bestehen können, an diese Fc-Rezeptoren mit anschließender Sequestrierung der Blutplättchen im RES denkbar. Schließlich ist eine Beeinträchtigung von Thrombozyten durch eine Komplementaktivierung vorstellbar, die sich nicht primär an Thrombozytenantigenen abspielt, aber

in ihrer unmittelbaren Nachbarschaft ausgelöst wird. Die Thrombozytenschädigung würde in diesem Fall durch die passive Anlagerung von Aktivierungsprodukten des Komplementsystems (vor allem von C3) zustande kommen (Sims, et al., 1991). Die verschiedenen Mechanismen, die zu einer gesteigerten Thrombozytenschädigung führen, spiegeln auch die Tatsache wieder, dass die ITP ein vielfältiges Krankheitsbild hat.

Bei der Komplementaktivierung bleibt C3b auf den Plättchen als Phagozytosemarker. Durch Bindung eines Antikörpers an einen bestimmten Komplementfaktor wird eine Kaskade von Reaktionen ausgelöst, von denen jede zur Aktivierung der nächsten Komplementkomponente führt. Diese Aktivierung endet in einem Membranangriffskomplex (MAC), der aus mehreren Komplementfaktoren besteht und in der Lage ist, Zellen direkt zu lysieren. Einige spezielle Komplementfaktoren können sich auch direkt an Zellen binden und opsonisieren sie so für die Phagozyten, die Komplementrezeptoren tragen.

Für eine C3-Beladung sprechen alte Arbeiten, in denen C3 an Plättchen nachgewiesen werden konnten. Cines und Schreiber konnten mit Hilfe von einem radioaktivmarkierten Coombs-Antiglobulintestverfahren zeigen, dass die Mehrheit von Patienten mit Immunthrombozytopenie sowohl einen erhöhten IgG-Spiegel als auch eine gesteigerte C3-Bindung auf ihrem Thrombozyten vorweisen (Cines, et al., 1979). In einem anderen Ansatz konnte die Gruppe zeigen, dass der anti-PLA-1-Antikörper die klassische Komplementkaskade aktiviert. Dieser Effekt hängt von der Konzentration der IgG-Antikörper an der Thrombozytenoberfläche ab (By Alan, et al., 1979). Ursprünglich in die Diagnostik eingebrachte Verfahren konzentrieren sich auf den Nachweis der Gesamtimmunglobuline auf Thrombozyten (platelet associated IgG, PAIgG). Eine Variation dieses Testverfahrens wurde von Meyers et.al verwendet. Diese Wissenschaftler haben in einem quantitativen Immunfluoreszenztest thrombozytengebundenen C3 (PA-C3) gemessen. Sie stellten einen erhöhten PA-C3-Spiegel verbunden mit einer reduzierten Lebensdauer der Blutplättchen bei ITP-Patienten verglichen mit normalen Spendern fest (Meyers, et al., 1982). Auch die Gruppe um McMillan zeigte, dass gereinigtes IgG aus Milzzellen von zwei ITP-Patienten *in vitro* zur C3-Fixierung auf Blutplättchen führt. Da zellgebundenes C3 die Zellerstörung in vielen experimentellen Antikörpersystemen deutlich erhöht, kann die Fähigkeit des IgG-Antikörpers zur C3-Fixierung in Patienten mit ITP die Schwere der Erkrankung beeinflussen (McMillan, et al., 1981).

Cines und Schreiber (Douglas, et al., 1979) untersuchten die Wechselwirkung zwischen Komplement und menschlichen Thrombozyten. Sie induzieren die Komplementaktivierung durch IgG anti-PLA-1-Antikörper von Patienten mit Posttransfusionspurpura-Syndrom, eine sehr selten

auftretende verzögerte Thrombozytenreaktion durch Thrombozytenalloantikörper. Sie verwendeten dafür ein Puffersystem aus Heparin und Plasma, das die Komplementaktivierung erlaubt ohne die Thrombozytenfunktion zu beeinträchtigen. Sie fanden heraus, dass anti-PLA-1-Antikörper nur in Anwesenheit von Komplement effektiv reagieren. In diesem Fall wurde sowohl eine Thrombozytenlyse als auch die Serotoninfreisetzung ohne Schädigung der Thrombozyten beobachtet. Die Thrombozytenlyse, die sich in einer Abnahme des  $^{51}\text{Cr}$  manifestiert, benötigt 10-fach mehr Antikörper als die Menge, die nötig war um die Thrombozytenaggregation und Freisetzung von  $^{14}\text{C}$ -Serotonin zu induzieren. Diese Plättchenfreisetzungsreaktion benötigt eine intakte klassische Komplementkaskade bis C6. Das Ausmaß der Serotoninfreisetzung entsprach dem Rückgang von C1 und C4 im thrombozytenreichen Plasma (PRP: platelet-rich plasma). Auch niedrige Antikörperkonzentrationen, die nicht in der Lage waren, die Thrombozytenaggregation und Serotoninfreisetzung zu induzieren, könnten noch C1 aktivieren und erhöhte C3-Mengen auf der Thrombozytenoberfläche auflagern. Diese Studien zeigten, dass es verschiedene Phasen der komplementvermittelten Thrombozytenlyse stattfinden können. Dies ist vor allem von der Antikörperkonzentration abhängig.

Mit Hilfe dieser natürlich vorkommenden Isoantikörper konnten Cines und Schreiber drei Phasen der Komplement-Thrombozyten-Interaktion definieren: Thrombozytenlyse, Blutplättchenserotoninfreisetzung, und Komplementaktivierung ohne Freisetzungsreaktion.

Die Wirkung des Komplementsystems auf Thrombozyten ist abhängig von der eingesetzten Menge an anti-PLA-1-Antikörper. Bei hohen Antikörperkonzentrationen führt eine Komplementaktivierung zur Lyse von Thrombozyten. Eine mäßige Antikörperkonzentration veranlasste das Komplement zur Serotoninfreisetzung ohne Thrombozytenlyse. Niedrige Konzentrationen der anti-PLA-1-Antikörper aktivieren den klassischen Komplementweg und erhöhen die Anlagerung größerer C3-Mengen an der Thrombozytenoberfläche.

Unter den experimentellen Bedingungen können aufgereinigte Antikörper weder die Thrombozytenlyse noch die Thrombozytenaggregation und die Serotoninfreisetzung in Abwesenheit einer Komplementquelle oder in Gegenwart von C4-defizienten Plasma induzieren. Hitzeinaktiviertes Plasma, das die stabile Komponente C4 enthält, kann unter höherer Antikörperkonzentration Serotoninfreisetzung induzieren. Vielleicht spiegelt sich darin zum Teil die Interaktion von Plasma-C4 mit C1 oder mit anderen Komponenten, die auf der Thrombozytenmembran lokalisiert sind wieder (Zimmerman, et al., 1976).

In einem anderen Ansatz untersuchten Cines und Schreiber den Komplementaktivierungs-Mechanismus, der durch anti-PLA-1-Antikörper hervorgerufen wird und die Thrombozyten-freisetzungsreaktion auslöst. Anti-PLA-1-Antikörper vermitteln ihre Wirkung durch den klassischen Komplementweg und ihre Wirkung hängt von der Konzentration der IgG-Antikörper auf der Thrombozytenoberfläche ab. Bei relativ hohen anti-PLA-1-Antikörperkonzentrationen wurde die Freisetzungsreaktion durch einen Mechanismus vermittelt, der zum Teil von der extrazellulären ADP und der metabolischen Energie unabhängig ist und nur durch hohe Konzentrationen von Prostaglandin E1 (PGE1) verhindert wird. Jedoch bei niedrigeren anti-PLA-1-Antikörperkonzentrationen ist die Freisetzungsreaktion von der metabolischen Energie und ADP abhängig. Außerdem gleicht die PGE1 Konzentration, die die Freisetzungsreaktion hemmt, die Konzentration, die zur Hemmung der ADP-induzierten Freisetzung führt, aus. Der Cyclooxygenaseinhibitor Acetylsalicylsäure inhibiert die Freisetzungsreaktion mit allen verwendeten Antikörperkonzentrationen, die nicht zur Lyse führten. Keiner der untersuchten Substanzen hemmt die Induktion der Thrombozytenlyse, die durch sehr hohe Konzentrationen von anti-PLA-1-Antikörper ausgelöst wird. Außerdem wurde keine Wirkung der Antikörper auf <sup>14</sup>C-Serotonin-Aufnahme beobachtet bei Antikörperkonzentrationen, die nicht eine direkte in-vitro-Veränderung vermitteln. Diese Studien legen den möglichen Einsatz von den erwähnten Pharmaka in komplementvermittelte Thrombozytenreaktionen nahe (By Alan, et al., 1979).

Antikörper, die gegen humane Thrombozyten gerichtet sind, können zur Thrombozytenlyse oder Aggregation führen, setzen Blutplättchenserotonin frei und können sowohl den Plättchenfaktor als auch Säurephosphatase an der Membranoberfläche anlagern. Obwohl die Aktivierung des Komplementsystems in jeder dieser Mechanismen stattfinden kann, bleibt der spezifische Mechanismus der Komplementwechselwirkung mit humanen Thrombozyten nicht vollständig verstanden. Komplement-Thrombozyten-Interaktion kann die Membranfluidität der Thrombozyten beeinflussen und die Thrombozytenlyse herbeiführen. Darüber hinaus kann die Ablagerung von der dritten Komplementkomponente C3 auf der Thrombozytenoberfläche eine unabhängige Rolle bei dem Abbau von Blutplättchen bei einigen Patienten mit immunthrombozytopenischer Purpura spielen (Cines, et al., 1979). Der thrombozytäre Isoantikörper anti-PLA-1 kann auch die komplementabhängige <sup>14</sup>C-Serotoninfreisetzung ohne Thrombozytenlyse induzieren und durch diesen Mechanismus die Lebensdauer der Thrombozyten verkürzen oder ihre Funktion beeinträchtigen. Die Ergebnisse zeigen die Bedeutung der Antikörperkonzentration bei der komplementvermittelten Reaktion und deuten auf das Potential der pharmakologischen Modifikation dieser Komplement-Thrombozyten-Interaktion.

---

Cines und Schreiber untersuchten die Wirkungsweise des durch anti-PLA-1-Antikörper aktivierten Komplements auf humanen Thrombozyten. Anti-PLA-1-Antikörper lösen die Thrombozytenlyse aus ( $^{51}\text{Cr}$  Verlust), und bei niedrigeren Konzentrationen vermitteln sie die Thrombozytenfreisetzung ( $^{14}\text{C}$ -Serotonin-Freisetzung). Diese Reaktionen werden durch den klassischen Komplementweg vermittelt. Die Forscher untersuchten den Mechanismus dieser komplementabhängigen Freisetzung, wenn sie durch unterschiedliche Konzentrationen von Antikörpern eingeleitet wird (Cines, et al., 1979).

Die Daten zeigen, dass die komplementvermittelte Freisetzung in humanen Thrombozyten von mindestens zwei verschiedenen Mechanismen eingeleitet wird, die abhängig von der Konzentration des eingesetzten anti-PLA-1-Antikörpers sind. Bei niedrigeren Konzentrationen von anti-PLA-1-Antikörper, die komplementvermittelte Freisetzung umfasst einen Mechanismus, der die Freisetzung von ADP benötigt, die metabolische Energie erfordert und der leichter mit PGE 1 zu inhibieren ist (Schreiber, et al., 1979). Dieser Weg läuft ganz anders ab als der durch den heterologen Antikörper vermittelte Weg, ist aber ähnlich, wenn nicht identisch, mit dem durch exogenen ADP- und epinephrinevermittelten Weg.

Ähnlich wie bei der ADP- und epinephrineinduzierten Freisetzung werden niedrigaffiner PF4 und ATP auch durch diese Konzentrationen von anti-PLA-1-Antikörper freigesetzt. Eine weitere Ähnlichkeit mit ADP- oder epinephrinevermittelten Blutplättchenserotoninfreisetzung ist die ausgeprägte Hemmung mit Acetylcyclopropancarbonsäure (ASA). Die Ergebnisse legen nahe, dass die Komplementwirkung der Thrombozyten zum Teil über den Prostaglandinsyntheseweg abläuft.

Bei relativ hohen Antikörperkonzentrationen erfolgt die komplementvermittelte Thrombozytenreaktion durch verschiedene Mechanismen. Einer dieser Mechanismen ist zum Teil unabhängig von ADP und metabolischer Energie und erfordert eine hohe PGE1-Konzentration sowie Phosphodiesterasehemmer für die signifikante Hemmung, die in Gegenwart von  $100\mu\text{M}$  Imipramin erfolgt. Diese Ergebnisse sind den Ergebnissen, die die Forschergruppe mit heterologen Antikörper in einer komplementunabhängigen Reaktion beobachtet haben, sehr ähnlich.

Der Mangel an signifikanter Hemmung der Freisetzung durch ASA, verursacht durch eine Reihe von heterologen Antikörperkonzentrationen, zeigt, dass die durch komplementvermittelte Änderung nicht identisch ist mit der, die durch heterologe Antikörper vermittelt wird. Die Inkubation mit Imipramin, ein Mediator, der die Blutplättchen-Serotonin-Aufnahme hemmt, änderte nichts an der Kinetik der Thrombozyten Serotoninfreisetzung. Daher erscheint es wahrscheinlich, dass die erforderliche Zeit, um die Serotoninfreisetzung zu initiieren, weitgehend durch die

langsame Aktivierung von Komplement in Anwesenheit einer begrenzten Menge von Antikörper verursacht wird.

Cines und Schreiber stellten auch fest, dass eine Antikörperkonzentration, die unzureichend ist um eine Thrombozytenaggregation zu lösen und Serotoninfreisetzung zu stimulieren, jedoch ausreichend ist, um die klassische Komplementkaskade in Gang zu setzen und C3 auf die Thrombozytenmembran aufzulagern, hemmt nicht die  $^{14}\text{C}$ -Serotonin-Aufnahme durch Blutplättchen.

Es wurde außerdem festgestellt, dass die Exposition von humanen Thrombozyten zu Isoantikörper die anaerobe Glykolyse und der anaerobe Metabolismus stimulieren (Shulman, et al., 1973). Shulman et al. beobachteten, dass eine Thrombozytenaggregation verursacht durch eine einzige Gabe von Isoantikörper, durch PGE gehemmt werden kann. Die Arbeit dieser Gruppe vertieft diese Studien durch die Untersuchung der Wirkung der Antikörperkonzentration in einem komplementabhängigen System. Es wird aus ihren Studien sowie aus der Arbeit anderer klar, dass Antikörper humane Thrombozyten auf verschiedene Weise verändern können. Die Menge der Antikörper oder Komplement auf der Thrombozytenoberfläche ist ein deutlich wichtiger Faktor bei der Bestimmung der Art der Veränderung (Shulman, et al., 1973).

Eine vielfältige Anzahl nichtimmunisierter Moleküle verändert auch humanen Thrombozyten. Antikörper oder Komplementauflagerung auf Thrombozyten können die Interaktion mit solchen nichtimmunisierten Agonisten beeinflussen. Studien mit monospezifischen Antikörpern einer definierten Klasse in der Gegenwart und Abwesenheit von Komplement sollten dazu beitragen, diese Wechselwirkungen abzugrenzen.

Die Komplementaktivierung kann die Freisetzung von Mediatoren aus anderen Zellen, wie Leukozyten und Mastzellen, stimulieren (Grant, et al., 1975). Es wurde ebenfalls beobachtet, dass an diesen komplementabhängigen Freisetzungsmechanismen Prostaglandine beteiligt sind und durch Mediatoren, die den Spiegel der intrazellulären zyklischen AMP erhöhen, geändert werden (Grant, et al., 1975).

Ebenso erscheint ADP für die Komplement-vermittelte Thrombozytenfreisetzung erforderlich, die durch Immunkomplexe oder Zymosan initiiert wird (Pfueller, et al., 1974). Cines und Schreiber kamen zu dem Schluss, dass die Thrombozytenfreisetzung von dem klassischen Weg der Komplementaktivierung abhängig ist und von anti-Thrombozyten-Antikörper initiiert wird.

Es ist durchaus möglich, dass andere komplementvermittelte Freisetzungsreaktionen durch ähnliche Mechanismen ablaufen. So könnten diese Studien für das Verständnis des Mechanismus der

komplementvermittelten Schäden in anderen Zellsystemen relevant werden. Pharmakologische Eingriffe in einige dieser komplementabhängigen zellulärvermittelten Reaktionen sind möglich. Solche pharmakologische Eingriffe könnten dazu beitragen, die *in situ* immunologischen Schäden zu eliminieren oder mit solchen veränderten Zellen zu interagieren.

Plättchen und Komplementfaktoren aktivieren sich gegenseitig. Dieser Effekt scheint sich durch Thrombin zu verstärken: Zum einen besitzen Plättchen Komplementrezeptoren für die Faktoren C3b und C5b (Cosgrove, et al., 1987 ). Dadurch wird das Komplement fixiert und lokal auf der Plättchenoberfläche angereichert. Zum anderen fördert der Faktor D, eine Serinprotease und ein Akutes-Phase-Protein, das auch in den Plättchengranula vorkommt, die Aktivierung des Komplements. Der Faktor D wird nach Thrombinstimulierung von Plättchen freigesetzt (Kenney, et al., 1981 ). Auf diese Weise begünstigt ein thrombinstimuliertes Plättchen die Komplementaktivierung. Plättchen vermitteln zudem die Zusammenlagerung des cytolytischen Komplexes C5b-9 (Polley, et al., 1983 ) ohne sich dabei selbst zu lysieren (Zimmerman, et al., 1976 ). Aber auch Thrombin selbst aktiviert das Komplement auf der Plättchenoberfläche (Polley, et al., 1979 ). Die aktiven Faktoren C3b und C5b wiederum führen zur Stimulierung der Plättchen mit nachfolgender Radikalbildung und Degranulation (Hansch, et al., 1985 ). Thrombinstimulierte Plättchen aggregieren stärker, wenn Komplement (C3, C5-C9) anwesend ist.

Für phagozytoseunabhängige Mechanismen spricht unter anderem die Beobachtung, dass nach Entfernung der Milz bis zu 1/3 der Erwachsenen (Bell WR, 2000) und viele der operierten Kinder (Tarantino, et al., 1999) weiterhin thrombopen bleiben.

Wir haben zunächst festgestellt, dass 81% aller ITP-Patienten mit nachweisbaren freien Antikörpern komplementaktivierende Ak besitzen. Ebenfalls besitzen 65% mit gebundenen aber nicht detektierbaren freien Antikörper und 30% ohne nachweisbaren Antikörper komplementaktivierende Eigenschaften. Dies weist darauf hin, dass sich möglicherweise niedrigaffine Antikörper in den Proben der Nachweisbarkeit entziehen.

Bemerkenswert war die Tatsache, dass auch Seren, bei denen keine freien Autoantikörper in MAIPA nachweisbar waren, in der Lage sind, Komplement zu fixieren (30%). Eine Vermutung legt nahe, dass diese Antikörper für die Komplementaktivierung verantwortlich sind, die folglich zur Phagozytose und/oder zur Lyse von Blutplättchen führt.

Die Spezifität der komplementaktivierenden Ak wurde mit Hilfe von Thrombozyten von Patienten mit Morbus Glanzmann und mit Bernard-Soulier-Syndrom weiter untersucht. Hier zeigte sich, dass die Mehrheit der komplementaktivierenden Ak eine anti-GPIIb/IIIa-Spezifität besitzen (72%). Die

---

Reaktivität gegen GPIIb/IX wurde in 25% der komplementaktivierenden Ak beobachtet. 3% sind gegen andere Antigene gerichtet, ihre Spezifität blieb aber unbekannt.

Humane Seren der ITP-Patienten enthalten zusätzlich zu den Autoantikörpern eine hohe Menge an Liganden des thrombozytären  $\alpha$ IIB $\beta$ 3-Rezeptors (Fibrinogen). Diese können direkt an das  $\alpha$ IIB $\beta$ 3-Protein binden und stören dadurch die Messung unserer Autoantikörper. Außerdem wollen wir uns vergewissern, ob es tatsächlich um Immunglobuline handelt, die in Seren von ITP-Patienten komplementaktivierende Eigenschaften besitzen. Daher wurde von allen Humansen die IgG-Fraktion mittels Negativselektion isoliert (Melom<sup>TM</sup>-Gel-IgG-Spin-Purification-Kit) und in der MKBR angesetzt. Zwischen Seren und gereinigter IgG-Fraktionen konnte keine signifikante Diskrepanz in MKBR festgestellt werden 26/28 (93%). Die Ergebnisse liefern den Beweis dafür, dass die Thrombozytenautoantikörper, die für die Komplementbindung verantwortlich sind, IgG-Immunglobuline sind.

Seren von ITP-Patienten enthalten sowohl freie Antikörper als auch Immunkomplexe. Beide besitzen komplementaktivierende Eigenschaften (Kiefel, et al., 1986). Ziel der anschließenden Untersuchungen war es herauszufinden, ob die Reaktivität der untersuchten Seren wirklich auf die im Serum enthaltenden Immunglobuline und nicht auf Immunkomplexe zurückzuführen ist. Bei dieser Untersuchung konnte vor und nach der PEG-Fällung keine signifikante Diskrepanz festgestellt werden. Dieser Befund deutet daraufhin, dass Immunglobuline und nicht Immunkomplexe zur Komplementfixierung führen. Fast 50 % aller in dieser Studie untersuchten ITP-Seren waren in der Lage, Komplement in Gegenwart von GPIIb/IIIa zu fixieren.

Neben dem funktionellen Test belegen auch Daten aus einem Bindungstest (FACS) diese Ergebnisse. Für diesen Test wurde die Bindung der Komplementkomponente C1q an Immunkomplexen aus Plättchenantigen und -antikörper durchflusszytometrisch mit antigenbeschichteten Mikropartikeln detektiert. Wie erwartet, war die Hälfte der ITP-Seren mit gebundenem anti-GPIIb/IIIa in der Lage C1q auf die mit GPIIb/IIIa beschichteten Partikel zu fixieren. Nur 2/56 (3,6%) aus drei verschiedenen Patientenkollektiven gaben falsch positive Signale.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass Komplementaktivierung eine wesentliche Rolle in der Entwicklung der ITP spielt. Hinweise darauf gab es schon in der Vergangenheit. Die Arbeitsgruppe um McMillan stellte in einer Studie fest (McMillan, et al., 1981), dass viele chronische ITP-Patienten einen erhöhten thrombozytgebundenen IgG-, C3-, C4- und C9-Spiegel haben, was eine *in vivo* Komplementaktivierung vermuten lässt. In dieser Studie untersuchten sie die Fähigkeit von verschiedenen antithrombozytären Antikörper (APA) Komplementproteine zu aktivieren,

---

abzulagern und schließlich den Thrombozytenabbau *in vitro* zu induzieren. Die Sensibilisierung der Thrombozyten mit dem Kaninchen anti-thrombozytären Antikörper (APA), anti-PLA-1-Antikörper, anti-HLA-Antikörper und ITP- Autoantikörper führt zur Ablagerung von C4 und C3 auf Thrombozyten in einem proportionalen Verhältnis zur Menge der Antikörper, die zur Sensibilisierung der Plättchen angesetzt wurde. Obwohl die C9-Ablagerung auf Thrombozyten, die mit dem ITP-Serum sensibilisiert wurden nicht quantitativ demonstriert werden konnte, wurde die Thrombozytenlyse (erkennbar an  $^{51}\text{Cr}$  Freisetzung) nach der Inkubation mit jedem von drei ITP-Seren und Komplement beobachtet. Im Vergleich aktivierten ITP-Autoantikörper, anti-HLA und anti-PLA-1-Antikörper gleichermaßen Komplement. Die Wissenschaftler kamen dann zu dem Ergebnis, dass einige Autoantikörper der chronischen ITP die klassische Komplementkaskade aktivieren. Der Nachweis einer *in vitro* Zerstörung der Thrombozyten durch Autoantikörper und Komplement weist darauf hin, dass *in vivo* eine Thrombozytenlyse bei einigen chronischen ITP Patienten vorkommen kann (Tsubakio, et al., 1986). Die Fähigkeit von plättchenreaktiven Antikörpern zur Komplementbindung konnte *in vitro* für medikamentabhängige Antikörper und Autoantikörper beobachtet werden (Kiefel, et al., 1989a).

Ob die Komplementaktivierung zu Phagozytose oder Lyse führt, wurde weitergehend durch die Darstellung von Mikropartikeln untersucht. Eine starke Aktivierung der Plättchen (z.B. durch Kollagen plus Thrombin) oder eine Aktivierung mit Komplementfaktoren (C5b-9) führt über eine kalziumionenabhängige Aktivierung von Calpain zu einer Mikropartikelbildung aus Plättchen. Dieser Vorgang, bei dem nur intrazytoplasmatische Substanzen eingeschlossen werden, ist ein echtes Abschnüren (Budding) (Sims, et al., 1989; Holme, et al., 1997). Diese Mikropartikel, auch Mikrovesikel genannt, die sich bei Patienten unter Bypass-Operation oder bei Sepsis in erhöhter Anzahl finden, sind prokoagulatorisch hoch wirksam (Nieuwland, et al., 1997). Eine isolierte Störung der Mikropartikelbildung geht mit Blutungsneigung einher. Thrombozytenmikropartikel vermitteln Leukozyten-Leukozyten und Leukozyten-Endothel-Interaktionen. Die Mikropartikel haben eine ähnliche Membranzusammensetzung wie aktivierte Thrombozyten und exprimieren auf ihrer Oberfläche z.B. CD40-Ligand, mit dem sie Endothel aktivieren können, sowie P-Selektin, mit dem sie an Monozyten binden.

Ich erhob folgende Befunde: werden Blutplättchen mit, in MKBR positiv oder negativ untersuchte Seren inkubiert, ist eine signifikante Diskrepanz bezüglich der Blutplättchen-Mikropartikel-Bildung festzustellen. Die Blutplättchen, die mit in Komplementbindungs-Test positiv getestete Seren inkubiert wurden, bilden mehr Mikropartikel verglichen mit Seren ohne Komplementbindung.

---

Hinweise auf eine antikörpervermittelte Zytotoxizität finden sich vereinzelt (Nardi, et al., 2001). Die erhobenen Daten weisen darauf hin, dass die Komplementaktivierung eine größere Rolle spielt als bisher angenommen. Weitere sinnvolle Untersuchungen wären an Kollektiven mit Splenektomie-Versagern durchzuführen (finden sich hier häufiger komplementaktivierende Antikörper?). Auch *in vitro* kann im Mausmodell (Bakchoul, et al., 2009) geprüft werden, ob eine Lyse oder Phagozytose nachzuweisen ist. Die Beteiligung beider Mechanismen in der Pathogenese der ITP ist mehrfach beschrieben (Hed, 1998; McMillan, 2007). Eine Blockade der Komplementkaskade durch Eculizumab bietet *in vitro* eine weitere Testmöglichkeit.

Insgesamt legen die Daten den Grundstein für eine Erweiterung des pathophysiologischen Verständnisses der ITP. Die Zerstörung der Plättchen bei der ITP erfolgt durch Bindung des Antikörpers an das Antigen (AG), mit oder ohne Komplementaktivierung, gefolgt von Phagozytose oder Lyse. Mit Antikörper beladene Thrombozyten werden über Makrophagen der Milz und Leber phagozytiert. Die Phagozytose wird entweder durch das Fc-Fragment der gebundenen IgG-Moleküle an den Thrombozyten oder durch eine Komplementaktivierung ausgelöst, indem C3b an die Plättchenoberfläche bindet (Spruce, et al., 1983). Die Komplementaktivierung der opsonierten Blutplättchen führt zu einer intravaskulären Plättchenlyse oder Erleichterung der Phagozytose.

Frühere Studien, die mit der Spezifität der Glykoproteine als Zielscheibe für Thrombozyten-Autoantikörpern berichten, wurden von Van Leeuwen (Van Leeuwen, et al., 1982) durchgeführt. Diese Autoren charakterisierten Thrombozyten-Autoantikörper mit Blutplättchen von normalen Spendern und von Spendern mit Morbus Glanzmann (fehlende Expression des GPIIb/IIIa Komplexes). Sie fanden heraus, dass in der Mehrheit der Fälle die Thrombozyten-Autoantikörper gegen den GPIIb/IIIa-Komplex gerichtet sind. Aber auch diagnostisch ergeben sich Möglichkeiten, nämlich den Einsatz der Komplementbindungsreaktion (Mikrokomplementbindungsreaktion: MKBR) als prädikativer Parameter für die Diagnose der ITP.

## 6 Zusammenfassung

Immunthrombozytopenien gehören heute zu den am besten charakterisierten Immunerkrankungen. Sie werden durch die Bildung spezifischer Antikörper erworben, die an der Thrombozytenoberfläche haften und zu deren Elimination über Fc-Rezeptoren der Makrophagen führen können oder das Komplement-System aktivieren und eine intravasale Thrombozytenlyse verursachen. Die klinische Relevanz einer Immunthrombozytopenie wird durch die damit verbundene Störung der primären Hämostase als häufigste Ursache für eine Blutungsneigung reflektiert. Klinisch und serologisch werden Immunthrombozytopenien in Autoimmunthrombozytopenien (ITP), Alloimmunthrombozytopenien und medikamentinduzierte Immunthrombozytopenien unterteilt. Die Diagnose lässt sich häufig nur durch den Nachweis der ursächlichen Antikörper klären. Der immunhämatologische Nachweis dieser Antikörper ist jedoch durch die morphologische Beschaffenheit der Thrombozyten schwierig und kann daher bislang nur in Speziallabors durchgeführt werden. In der Vergangenheit wurden zahlreiche Testmethoden entwickelt und dennoch ist es bisher nicht gelungen, ein routinefreundliches und gleichzeitig sensitives Testverfahren auf diesem Gebiet zu entwickeln. Die Bestimmung von Antikörpern auf intakten Thrombozyten mit Hilfe von Bindungs- oder Immunfluoreszenztests zeichnet sich zwar durch eine hohe Sensitivität aus, doch die Spezifität dieser Testsysteme ist sehr unbefriedigend, weil die zur Diagnose erforderlichen signifikanten Messwerte nicht erreicht werden. Die letzte praktische Erneuerung auf dem Gebiet der Thrombozytenserologie geht auf die Einführung des MAIPA im Jahre 1987 zurück. Die Ergebnisse dieses Testsystems sind hochspezifisch. Allerdings ist der Einsatz des MAIPA zur Diagnostik der Autoimmunthrombozytopenie auf Grund seiner geringen Sensitivität umstritten. Mit dem Ziel, die Pathomechanismen der Autoimmunthrombozytopenie zu verstehen und eine sinnvolle und zuverlässige Diagnosestellung zu erreichen, wurde einerseits die Bedeutung des Glykoproteins GPV als Zielantigen bei der Entwicklung der ITP näher charakterisiert, andererseits wurde die ITP mit anderen Autoimmunerkrankungen verglichen und ihre möglichen Auslöser näher betrachtet.

In der vorliegenden Dissertation wurden daher diese Aspekte in der Pathogenese der ITP studiert, mit dem Ziel, prädikative Parameter zu evaluieren, welche eine Vorhersage über die Blutungsneigung erlauben. Mit der Kenntnis dieser Parameter sollte einerseits die gegenwärtige Diagnostik optimiert andererseits ein universell einsetzbares Testsystem entwickelt werden, welches es erlaubt, thrombozytäre Antikörper einfach und schnell nachzuweisen. Das Testsystem

soll einfach, schnell durchführbar sein und sich sowohl durch eine hohe Sensitivität als auch eine hohe Spezifität auszeichnen.

Zu diesem Zweck untersuchten wir Antikörper gegen GPV an Patienten mit Verdacht auf ITP. Mein Ziel dabei war, die Bedeutung dieses Glykoproteins als Zielantigen bei der Entwicklung der ITP zu beurteilen. Außerdem wollte ich sicherstellen, ob der Einsatz von GPV zusätzlich zu GPIIb/IIIa und GPIb/IV zu einer Verbesserung der Sensitivität des MAIPA-Tests führen könnte. In dieser Studie wurden Antikörper gegen GPV in 406 (62%) von 657 Patienten gefunden. Verglichen mit der Zahl der Antikörper gegen GPIIb/IIIa 476 von 657 (72%), und gegen GPIb/IV 402 (61%) stellt GPV ein Hauptzielantigen bei vielen ITP-Patienten. Patienten mit anti-GPIV erfüllen alle Kriterien der ITP-Diagnose. Daher gilt GPV als wichtiger diagnostischer Marker bei der Autoimmunthrombozytopenie (Rühl, et al., 2009).

Autoantikörper gegen Blutplättchen können die Aktivierung der klassischen Komplementkaskade induzieren und somit ihre Phagozytose verstärken und beschleunigen. Diese Befunde wurden durch den Nachweis thrombozytenassoziierter IgG, C3, C4 und C9 in Seren von ITP-Patienten bestätigt, was eine Aktivierung des Komplements vermuten lässt (Kurata, et al., 1985; Hed, 1998; McMillan, 2007).

Bei vielen ITP-Patienten sind Autoantikörper in der Lage, die klassische Komplementkaskade zu aktivieren. Bemerkenswert ist, dass die Komplementbindung auch bei Seren nachgewiesen werden konnte, bei denen in MAIPA keine freien Autoantikörper nachweisbar waren. Diese Befunde legen nahe, dass diese Antikörper die Komplementaktivierung in den Blutplättchen induzieren und folglich die Phagozytose und/oder die Lyse der Thrombozyten hervorrufen. Der GPIIb/IIIa-Rezeptor ist das Hauptzielantigen für die autoantikörpervermittelte Komplementbindung. 30% der ITP-Seren ohne nachweisbaren Antikörper waren in der Lage das Komplement auf die Thrombozytenoberfläche zu fixieren. Außerdem konnten 40% aller untersuchten Seren ohne detektierbaren Antikörper das Komplement C1q auf die mit GPIIb/IIIa beschichteten Mikropartikel binden. Diese Ergebnisse liefern den Nachweis, dass der GPIIb/IIIa und/oder GPIb/IX abhängige Komplementbindungstest einen wichtigen Beitrag für die Diagnose der ITP leisten kann.

## 7 Summary

Immuno-thrombocytopenia counts today among the best characterized immune diseases. They are acquired through the formation of specific antibodies. Once produced, an autoantibody may either bind to platelets, causing their destruction by either phagocytosis or possibly complement activation and lysis, or bind to megakaryocytes, resulting in decreased thrombopoiesis. Thus ITP patients with detectable antibody have a significantly higher likelihood for a clinical deterioration than ITP patients without antibody (Fabris, et al., 2004).

The clinical relevance of immune thrombocytopenia is reflected by the consequent disruption of primary homeostasis as the most common cause of bleeding. Clinically and serologically immune thrombocytopenia are divided into autoimmune thrombocytopenia (ITP), alloimmune, and drug-induced thrombocytopenia. The diagnosis can frequently be determined only by the detection of the causative antibodies. The detection of these antibodies, however, because of the morphological characteristics of platelets is difficult, and can therefore to date be carried out only in specialized laboratories. In the last decades many test methods have been developed, nevertheless a routine and sensitive test system in this area is still lacking.

In order to understand the pathomechanisms of ITP and to achieve a sensible and reliable diagnosis evaluation, we first characterized the role of the glycoprotein GP V as an antigen by the development of ITP, secondly, we assessed the ability of antiplatelet antibodies, particularly anti-GPIIb/IIIa, to activate and deposit complement proteins and possibly to cause platelet lysis *in vitro*. Our aim thereby is to develop a universally applicable test system, which is capable of detecting platelet antibodies. This test system should be simple, quickly performed, and characterized by both a high sensitivity and high specificity.

Samples from 4217 patients with suspected ITP were tested in direct MAIPA for antibodies against GP V, GP IIB-IIIa and GP Ib-IX. 657 samples showed positive results. Platelet autoantibodies against GP V were found in 406 (62%) of these patients. In 64 (10%) patients, GP V-specific antibodies were the only antibody entity detected. Clinical data of these patients were in concordance with a diagnosis of ITP. Our findings suggest that GP V is an important target antigen for platelet autoantibodies in ITP. Additional testing for antibodies against GP V in the direct MAIPA has the potential to improve the sensitivity of the MAIPA assay significantly.

A growing body of evidence supports the hypothesis that immune mechanisms, including complement activation, are involved in immune thrombocytopenic purpura. Many chronic ITP patients have increased amounts of platelet-associated IgG, C3, C4 and C9, suggesting *in vivo* complement activation (Kurata, et al., 1985; Hed, 1998; McMillan, 2007). Although activation of the complement system may occur in many disorders, the specific mechanism of complement interaction with human platelets is incompletely understood.

In many ITP patients autoantibodies are able to activate the classical complement cascade. Remarkably the complement fixation could be also proved with sera without detectable free autoantibodies in MAIPA. These findings suggest that these antibodies induce the complement activation in the platelets and cause consequently the phagocytosis and/or the Lysis of the platelets. The GP IIb-IIIa receptor is the principal target antigen for the autoantibody-mediated complement fixation. 30% of the ITP sera without detectable antibodies were able to bind complement on the platelet surface. Moreover, 40% of all examined sera without detectable antibodies could bind the complement C1q on the GP IIb-IIIa coated beads. These results indicate that a GP IIb-IIIa and or GP Ib-IX dependent complement fixation assay could add significantly to the diagnosis of ITP.

Accordingly these *in vitro* results show directly that platelet sensitization with ITP sera known to contain anti-GPIIb-IIIa autoantibodies results in the binding of complement. The demonstration of *in vitro* platelet Lysis by autoantibodies and complement suggests that *in vivo* platelet lysis may occur by activating the classical complement pathway in some chronic ITP patients. In summary, activation of the immune system by platelet autoantigens in ITP may result in platelet destruction and/or inhibition of platelet production. The importance of each mechanism in the individual patient probably varies. It is clear from our study as from the work of others that antibodies could alter human platelet in several ways. The amount of antibodies or complement on the platelet surface is clearly one important factor in determining the nature of the alteration.

---

## Literaturverzeichnis

- Akkermann, JWN, Nieuwenhuis, HK und Sixma, JJ. 1987.** Thrombose und Arteriosklerose-Pathophysiologie. *Thomae Thromboseforschung*. 1987.
- Alas, S, Emmanouilides, C und Bonavida, B. 2001.** Inhibition of interleukin 10 by rituximab results in down-regulation of bcl-2 and sensitization of B-cell non-Hodgkin's lymphoma to apoptosis. *Clin Cancer Res*. 2001, Bd. 7, S. 709-723.
- Aledort, LM, Hayward, CPM und Chen, M-G. 2004.** Prospective screening of 205 patients with ITP, including diagnosis, serological markers, and the relationship between platelet counts, endogenous thrombopoietin, and circulating antithrombopoietin antibodies. *Am J Hematol*. 2004, Bd. 76, S. 205-213.
- Allen, DL, et al. 1994.** Sensitivity of the platelet immunofluorescence test (PIFT) and the MAIPA assay for the detection of platelet-reactive alloantibodies: a report on two U.K. National Platelet Workshop exercises. *Transfus Med*. 1994, Bd. 4(2), S. 157-64.
- Andersen, JC. 1994.** Response of resistant idiopathic thrombocytopenic purpura to pulsed high-dose dexamethasone therapy. *N Engl J Med*. 1994, Bd. 330, S. 1560-1564.
- Andrew, M, Blanchette, VS und Adams, M. 1992.** A multicenter study of the treatment of childhood chronic idiopathic thrombocytopenic purpura with anti-D. *J Pediatr*. 1992, Bd. 120, S. 522-527.
- Atkinson, JP, et al. 1991 oct.** Separation of self from non-self in the complement system: a role for membrane cofactor protein and decay accelerating factor. *Clin Exp Immunol*. 1991 oct, Bd. 86 suppl 1, S. 27-30.
- Ault, KA. 2001.** The Clinical Utility of Flow Cytometry in the Study of Platelets. *Seminars in Hematology*. 2001, Bd. Vol 38, S. 160-168.
- Bakchoul, T, et al. 2009.** Blockade of maternal anti-HPA-1a-mediated platelet clearance by an HPA-1a epitope-specific F(ab')<sub>2</sub> in an in vivo mouse model of alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*. 2009, Bd. 49(2), S. 265-270.
- Bakchoul, T, Meyer, O und Agaylan, A. 2007.** Rapid detection of HPA-1 alloantibodies by platelet antigens immobilized on microbeads. *Transfusion*. 2007, Bd. 47, S. 1363-1368.
- Barnum, SR und Dahlback, B. 1990.** C4-binding protein, a regulatory component of the classical pathway of complement, is an acute-phase protein and is elevated in systemic lupus erythematosus. *Complement Inflamm*. 1990, Bd. 7, S. 71-77.
- Barthels, M und Von Depka, M. 2003.** Das Gerinnungskompendium: Schnellorientierung, Befundinterpretation, klinische Konsequenzen. 2003, Bd. Georg Thieme Verlag.
- Barzilai, O, Ram, M und Shoenfeld, Y. 2007.** Viral infection can induce the production of autoantibodies. *Curr Opin Rheumatol*. 2007, Bd. 19(6), S. 636-643.
- Beardsley, DS und Estem, M. 1998 Sep.** Platelet autoantibodies in immune thrombocytopenic purpura. *Transfus Sci*. 1998 Sep, Bd. 19(3), S. 237-244.

- Beer, JH, Büchi, L und Steiner, B. 1994.** Glycocalicin: a new assay-the normal plasma levels and its potential usefulness in selected diseases. *Blood*. 1994, Bd. 83, S. 691-702.
- Bell WR, Jr. 2000.** Long-term outcome of splenectomy for idiopathic thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol*. 2000. Bd. 37(1 Suppl 1), S. 22-25.
- Benzaquen, LR, Nicholson-Weller, A und Halperin, JA. 1994.** Terminal complement protein C5b-9 release bFGF and PDGF from endothelial cells. *J Exp Med*. 1994, Bd. 179, S. 985-992.
- Berchtold, P und McMillan, R. 1989.** Therapy of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura in adults. *Blood*. 1989, Bd. 74(7), S. 2309-2317.
- Bernard, J und Soulier, JP. 1948.** Bernard-Soulier syndrome from the clinical description (1948) to the molecular era (1977) (author's transl). *Sem Hop*. 1948. Bd. 24, S. 3217-3223.
- Bierling, P, et al. 1994.** Anti-GMP140 (CD62) autoantibody in a patient with autoimmune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. 1994. Bd. 87, S. 631-633.
- Bode, C, Koerholz, D und Janssen, G. 1996.** Poor response to pulsed high-dose dexamethasone therapy in children with resistant immune thrombocytopenic purpura. *Eur J Pediatr*. 1996, Bd. 155, S. 917-923.
- Born, GV. 1962.** Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962, Bd. 194, S. 927-929.
- Borst, F, et al. 2004.** High-dose dexamethasone as a first- and second-line treatment of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults. *Ann Hematol*. 2004. Bd. 83(12), S. 764-768.
- Boylan, B, et al. 2004.** Anti-GPVI-associated ITP: an acquired platelet disorder caused by autoantibody-mediated clearance of the GPVI/FcRgamma-chain complex from the human platelet surface. *Blood*. 2004. Bd. 104, S. 1350-1355.
- Braendstrup P, Bjerrum OW, Nielsen OJ, Jensen BA, Clausen NT, Hansen PB, Andersen I, Schmidt K, Andersen TM, Peterslund NA, Birgens HS, Plesner T, Pedersen BB, Hasselbalch HC. 2005.** Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody treatment for adult refractory idiopathic thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol*. 2005, Bd. 78(4), S. 275-280.
- Brekke, OH, Michaelson, TE und Sandlie, I. 1995.** The structural requirements for complement activation by IgG: does it hinge on the hinge? *Immunol Today*. 1995, Bd. 16(2), S. 85-90.
- Brighton, TA, et al. 1996.** Prospective evaluation of the clinical usefulness of an antigen-specific assay MAIPA in ITP and other immune thrombocytopenias. *Blood*. 1996. Bd. 88, S. 194-201.
- By Alan, B, et al. 1979.** Effect of Anti-PIA1 Antibody on human platelets. II Mechanism of the Complement-Dependent Release Reaction. *Blood*. 1979. Bd. 53(4), S. 578-587.
- Caen, JP und Rosa, JP. 1995.** Platelet-Vessel wall interaction: from the bedside to molecules. *Thromb Haemost*. 1995, Bd. 74, S. 18-24.
- Calcott, MA und Muller-Eberhard, HJ. 1972.** C1q protein of human complement. *Biochemistry*. 1972, Bd. 11, S. 3443-3450.
- Canenagh, JD, et al. 1999.** Predicting the outcome of splenectomy in ITP patients utilising <sup>111</sup>In-labelled platelet studies. *British Journal of Haematology*. 1999. Bd. 105, S. 48.

- Chan, BMC und Hemler, ME. 1993.** Multiple functional forms of the integrin VLA-2 can be derived from a single  $\alpha 2$  cDNA Clone: Interconversion of forms induced by an anti- $\beta 1$  antibody. *J Cell Biol.* 1993, Bd. 120, S. 537-543.
- Chang, M, Nakagawa, PA und Williams, SA. 2003.** Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood.* 2003, Bd. 102, S. 887-895.
- Charo, IF, et al. 1986.** Platelet glycoproteins IIb and IIIa: evidence for a family of immunologically and structurally related glycoproteins in mammalian cells. *Proc. Natl Acad Sci USA.* 1986, Bd. 83, S. 8351-5.
- Chong, BH und Keng, TB. 2000.** Advance in the diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol.* 2000, Bd. 37, S. 249-260.
- Cines, DB und Blanchette, VS. 2002.** Immunthrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 2002, Bd. 346, S. 995-1008.
- Cines, DB und Schreiber, AD. 1979.** Effect of anti-PLA1 antibody on human platelets.I. The role of complement. *Blood.* 1979, Bd. 53, S. 567-577.
- , **1979.** Immune thrombocytopenia. Use of a Coombs antiglobulin test to detect IgG and C3 on platelets. *N Engl J Med.* 1979, Bd. 300(3), S. 106-111.
- Cines, DB, et al. 1985.** Platelet antibodies of the IfM class in immune thrombocytopenic purpura. *J Clin Invest.* 1985, Bd. 75, S. 1183-90.
- Cines, DB, Konkle, BA und Furlan, M. 2000.** Thrombotic thrombocytopenic purpura: a paradigm shift? *Thromb Haemost.* 2000, Bd. 84(4), S. 528-535.
- Clas, F und Loos, M. 1981.** Antibody-independent binding of the first component of complement (C1) and its subcomponent C1q to the S and R forms of salmonella minneosta. *Infect Immun.* 1981, Bd. 31(3), S. 1138-1144.
- Clemetson, KJ. 1995.** Platelet activation: signal transduction via membrane receptors. *Thromb. Haemost.* 1995, Bd. 74, S. 111-6.
- Cole, JL, et al. 1985.** Identification of an additional class of C3-binding membrane proteins of human peripheral blood leukocytes and cell lines. *Proc. Natl.Acad. Sci. U.S.A.* 1985, Bd. 82, S. 859-863.
- Collard, CD, et al. 1999.** Hypoxia-induced expression of complement receptor type 1 (CR1, CD35) in human vascular endothelial cells. *Am J Physiol.* 1999, Bd. 276, S. C459-C458.
- Collins, J und Aster, RH. 1987.** Use of immobilized platelet mermbrane glycoproteins for the detection of platelet-specific alloantibodies in solid-phase ELISA. *Vox Sang.* 1987, Bd. 53, S. 157-161.
- Colombani, J, et al. 1971.** International agreement on a microtechnique of platelet complement fixation (Pl. C fix.). *Transplant Proc.* 1971. Bd. 3(1), S. 121-126.
- Coopamah, MD, et al. 2003.** Cellular immune machanisms in autoimmune thrombocytopenic purpura: An update. *Transf Med Rev.* 2003, Bd. 17, S. 69-80.
- Cooper, MA und Williams, DH. 1999.** Kinetik analysis of antibody-antigen interactions at a supported lipid monolayer. *Anal Biochem.* 1999, Bd. 276, S. 36-47.

- Cooper, NR. 1975.** Enzymatic activity of the second component of complement. *Biochemistry*. 1975, Bd. 14, S. 4245-4251.
- . **1985.** The classical complement pathway: activation and regulation of the first complement component. *Adv Immunol*. 1985, Bd. 37, S. 151-216.
- Cosgrove, LJ, et al. 1987 .** CR3 receptor on platelets and its role in the prostaglandin metabolic pathway. *Immunol Cell Biol*. 1987 , Bd. 65, S. 453-460.
- Cutolo, M und Straub, RH. 2009.** Insights into endocrine-immunological disturbances in autoimmunity and their impact on treatment. *Arthritis Res Ther*. 2009, Bd. 11(2), S. 218-228.
- Davies, A, et al. 1989.** CD59, an LY-6-like protein expressed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex on homologous cells. *J. Exp. Med*. 1989, Bd. 170, S. 637-654.
- De Sauvage, FJ, Hass, PE und Spencer, SD. 1994.** Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature*. 1994, Bd. 369(6481), S. 533-538.
- Dean, PN. 1990.** Flow cytometry and sorting. *Data processing*. 1990, Bd. 2. Auflage, S. 415-444.
- Deters, M, et al. 2001.** Comparative study analyzing effects of sirolimus-cyclosporin and sirolimus-tacrolimus combinations on bile flow in the rat. *Diq Dis Sci*. 2001, Bd. 46(10), S. 2120-2126.
- Deutsche Norm: Serodiagnostik von Infektionskrankheiten, DIN 58969, Teil 10. 1989.** Komplemenbindungsreaktion (KBR). Burggrafenstraße 6, Berlin : Beuth Verlag GmbH, 1989. Ausgabe 1989, S. 104-106.
- Diamandis, EP und Christopoulos, TK. 1991.** The biotin-(strep)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clin Chem*. 1991. Bd. 37(5), S. 625-636.
- Dillman, SL, et al. 1995.** Activation of human complement by totally human monoclonal antibodies. *Mol Immunol*. 1995, Bd. 32(13), S. 957-964.
- Dodds, AW, et al. 1978.** Activation of the first component of human complement (C1) by antibody-antigen aggregation. *Biochem J*. 1978, Bd. 175, S. 383-390.
- Dodds, AW, et al. 1996.** The reaction mechanism of the internal thioester in the human complement component C4. *Nature*. 1996, Bd. 379, S. 177-179.
- Douglas, By, Cines, B und Schreiber, Alan D. 1979.** Effekt of Anti-PLA1 Antibody on human platelets. I The role of complement. *Blood*. 1979, Bd. 53, S. 567-577.
- El Alfy, MS, Mokhtar, GM und El-Laboudy, MA. 2006.** Randomized trial of anti-D immunoglobulin in the treatment of childhood chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Acxta Haematol*. 2006, Bd. 115, S. 46-52.
- Elices, MJ und Hemler, ME. 1989.** The human integrin VLA-2 is a collagen receptor on some cells and a collagen/laminin receptor on others. *Proc Natl Acad Sci*. 1989, Bd. 86, S. 9906-9910.
- Esser, AF. 1991 sep.** Big MAC attack: complement proteins cause leaky patches. *Immunol Today*. 1991 sep, Bd. 12(9), S. 316-318.

- Fabris, F, Scandellari, R und Ruzzon, E. 2004.** Platelets-associated autoantibodies as detected by a solid-phase modified antigen capture ELISA test (MACE) are a useful prognostic factor in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 2004, Bd. 103, S. 4562-4564.
- Faull, RJ, X, Du und Gingsberg, MH. 1994.** Receptors on platelets. *Methods enzymol.* 1994, Bd. 245, S. 183-194.
- Foster, DC, Sprecher, CA und Grant, FJ. 1995.** Human thrombopoietin: gene structure, cDNA sequence, expression, and chromosomal localization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995, Bd. 91(26), S. 13023-13027.
- Friese, MA, et al. 1999.** FHL-1/reconectin and factor H: two human complement regulators which are encoded by the same gene are differently expressed and regulated. *Mol Immunol.* 1999, Bde. 36(13-14), S. 809-818.
- Fritzgerald, LA, et al. 1987.** Protein sequence of endothelial glycoprotein IIIa derived from a cDNA clone. Identity with platelet glycoprotein IIIa and similarity to "integrin". *J Biol Chem.* 1987, Bd. 262, S. 3936-3939.
- Fujimura, K und Phillips, DR. 1983.** Calcium cation regulation of glycoprotein IIb/IIIa complex formation in platelet plasma membranes. *J Biol Chem.* 1983, Bd. 258, S. 10247-52.
- Fujimura, K, et al. 1987.** Cytoskeletal proteins in blood platelets. *Rinsho Byori.* 1987, Bd. 73, S. 1-13. Japanese.
- Fujisawa, K, et al. 1993.** The effect of therapy on platelet-associated autoantibody in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood.* 1993, Bd. 81(11), S. 2872-2877.
- Garcia-Suarez, J, Prieto, A und Reyes, e. 1993.** Severe chronic autoimmune thrombocytopenic purpura is associated with an expansion of CD56+CD3-natural killer cells subset. *Blood.* 1993, Bd. 82, S. 1538-1545.
- Garner, SF, et al. 2002.** Glycoprotein V: the predominant target antigen in gold-induced autoimmune thrombocytopenia. *Blood.* 2002, Bd. 100(1), S. 344-346.
- Gawaz, M. 2001.** Blood platelets - physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet principles, and therapy for atherothrombotic diseases. *Thieme.* 2001, S. 1-56.
- . 1999. Das Blutplättchen. *Das Blutplättchen (ED).* 1999.
- Gawaz, M, Neumann, FJ und Schömig, A. 1999.** Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease. Consequences for diagnosis and therapy. *Circulation.* 1999, S. e1-e11.
- Gawaz, MP, et al. 1991.** Ligand bridging mediates integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIB-IIIa) dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions. *J. Clin. Invest.* 1991, Bd. 88, S. 1128-34.
- Geddis, AE, Linden, HM und Kaushansky, K. 2002.** Thrombopoietin: A pan-hematopoietic cytokine. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002, Bd. 13, S. 61-73.
- Georg, J und Rizvi, M. 2001.** Thrombocytopenia. *Hematology.* 2001, S. 1495-539.
- George, JN. 1990.** Platelet immunoglobulin G: its significance for the evaluation of thrombocytopenia and for understanding the origin of alpha-granule proteins. *Blood.* 1990, Bd. 76, S. 859-70.
- George, JN und Nurden, AT. 1994.** Inherited disorders of the platelet membrane: Glanzmann thrombasthenie, Bernard-Soulier Syndrome, and other disorders. In : *Colman RW, Hirsh J, Marder, VJ,*

- Salzman EW, eds. *Hemostasis and thrombosis: basic principals and clinical practice*. J.B., 1994, Bd. Lippincott Company, S. 652-672.
- George, JN, Caen, JP und Nurden, AT. 1990. Glanzmann's thrombasthenia: The spectrum of clinical disease. *Blood*. 1990, Bd. 75, S. 1383-95.
- George, JN, Woolf, SH und Raskob, GE. 1996. Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practic guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood*. 1996, Bd. 88, S. 3-40.
- Gernsheimer, T. 2002. Pathophysiology and thrombokinetics in autoimmune thrombocytopenia. *Blood Rev*. 2002, Bd. 16, S. 7-8.
- Giard, M. 2005. Autoimmune hazards of hepatitis B vaccine. *Autoimmun Rev*. 2005, Bd. 4(2), S. 96-100.
- Ginsberg, MH, et al. 1995. Platelet integrins. *Thromb Haemost*. 1995, Bd. 74, S. 352-9.
- Gonzalez-Conejero, R, et al. 1996. Comparative study of three methods to detect free plasma antiplatelet antibodies. *Acta Haematol*. 1996, Bd. 96, S. 135-139.
- Graf, C, et al. 1983. Idiopathic thrombocytopenic purpura: diagnosis and therapy in 46 Patients. *Schweiz Med Wochenschr*. 1983, Bd. 113(40), S. 1465-1468.
- Grant, JA, et al. 1975. Complement-mediated release of histamine from human leucocytes. *J Immunol*. 1975, Bd. 114, S. 1101-1114.
- Greinacher, A, et al. 2001. Drug-induced and drug-dependent immune thrombocytopenias. *Rev Clin Exp Hematol*. 2001. Bd. 5(3), S. 166-200.
- Grimaldi, CM, et al. 1998. Glycoprotein IIb Leu214Pro mutation produces glanzmann thrombasthenia with both quantitative and qualitative abnormalities in GPIIb/IIIa. *Blood*. 1998, Bd. 91, S. 1562-71.
- Hagenstöm, H, et al. 2000. Quantification of platelet-associated IgG for differential diagnosis of patients with thrombocytopenia. *Thromb Haemost*. 2000, Bd. 84(5), S. 779-783.
- Halperin, DS und Doyle, JJ. 1988. Is bone marroe examination justified in idiopathic thrombocytopenic purpura ? *Am J Dis Child*. 1988, Bd. 142, S. 508-511.
- Hansch, GM, Gemsa, D und Resch, K. 1985 . Induction of prostanoid synthesis in human platelets by the late complement components C5b-9 and channel forming antibiotic nystatin: inhibition of thereacylation of liberated arachidonic acid. *J.Immunol*. 1985 , Bd. 135(2), S. 1320-1324.
- Hantgan, RR, et al. 19990. Glycoprotein Ib, von Willebrand factor, and glycoprotein IIb/IIIa are all involved in platelet adhesion of fibrin in flowing whole blood. *Blood*. 19990, Bd. 76, S. 345-53.
- Harrison, CR, et al. 2003. Severe neonatal alloimmune thrombocytopenia caused by antibodies to human platelet antigen 3a (Baka) detectable only in whole platelet assays. *Transfusion*. 2003, Bd. 43, S. 1398-1402.
- He, R, et al. 1994. Spectrum of Ig classes, specificities, and titers of serum antiglycoproteins in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 1994, Bd. 83(4), S. 1024-1032.
- He, R, Jones, CE und Shulman, NR. 1994. Spectrum of Ig classe, specificities, and titers of serum antiglycoproteins in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood*. 1994, Bd. 83, S. 1024-32.

- He, S, Sim, RB und Whaley, K. 1997.** A secondary C1s interaction site on c1-inhibitor is essential for formation of a stable enzyme-inhibitor complex. *FEBS Lett.* 1997, Bd. 405, S. 42-46.
- Hed, J. 1998.** Role of complement in immune or idiopathic thrombocytopenic purpura. *Acta Paediatr Suppl.* 1998, Bd. 424, S. 37-40.
- Heidenreich, R, et al. 1990.** Organization of the gene for platelet glycoprotein IIb. *Biochemistry.* 1990, Bd. 29, S. 1232-44.
- Holme, PA, et al. 1997.** Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1997, Bd. 17, S. 646-53.
- Houwerzijl, EJ, Blom, NR und Van der Want, JL. 2004.** Ultrastructural study shows morphologic features of apoptosis and para-apoptosis in megakaryocytes from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2004, Bd. 103, S. 500-506.
- Huisman, JG. 1986.** Immunoblotting: an emerging technique in immunohematology. *Vox Sang.* 1986, Bd. 50, S. 129-136.
- Hynes, RO. 2002.** Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 2002, Bd. 110, S. 673-687.
- Izenman, DE, Podack, ER und Cooper, NR. 1980.** The interaction of C5 with C3b in free solution: a sufficient condition for cleavage by a fluid phase C3/C5 convertase. *J Immunol.* 1980, Bd. 124, S. 326-331.
- Janisiw, M, et al. 1998.** Screening for platelets autoantibodies by flow cytometry and their evaluation by the MAIPA technique. *Wochenschr.* 1998, Bd. 110, S. 531-534.
- Jenkins, JM, Williams, D und Deng, Y. 2007.** Phase I clinical study of eltrombopag, an oral, nonpeptide thrombopoietin receptor agonist. *Blood.* 2007, Bd. 109, S. 4739-4741.
- Jennings, LK und Phillips, DR. 1982.** Purification of glycoprotein IIb and IIIa from human platelet plasma membranes and characterization of a calcium-dependent glycoprotein IIb/IIIa complex. *J Biol Chem.* 1982, Bd. 257, S. 10458-10466.
- Joutsu, L und Kekomaki, R. 1997.** Comparison of the direct platelet immunofluorescence test (direct PIFT) with a modified direct monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (direct MAIPA) in detection of platelet-associated IgG. *Br J Haematol.* 1997, Bd. 96, S. 204-209.
- Joutsu-Korhonen, L, et al. 2001.** Glycoprotein V-specific-platelet-associated antibodies in thrombocytopenic patients. *Clin Lab Haematol.* 2001, Bd. 23, S. 307-312.
- Kanlaya, R, et al. 2009.** Alterations in Actin Cytoskeletal Assembly and Junctional Protein Complexes in Human Endothelial Cells Induced by Dengue Virus Infection and Mimicry of Leukocyte Transendothelial Migration. *J Proteom Res.* 2009, Bd. 8(5), S. 2551-2562.
- Kanz, L. 2002.** Einsatz immunologischer Untersuchungsverfahren. *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz.* 2002, Bd. 45, S. 740-744.
- Kappers-Klunne, MC und Van't Veer, MB. 2001.** Cyclosporin A for the treatment of patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura refractory to corticosteroids or splenectomy. *Br J Haematol.* 2001, Bd. 114(1), S. 121-125.
- Karpatkin, S. 1980.** Autoimmune thrombocytopenic purpura. *Blood.* 1980, Bd. 56(3), S. 329-343.

- Karpatkin, S und Nardi, M. 1992.** Autoimmune anti-HIV-1gp120 antibody with antiidiotype-like activity in sera and immune complexes of HIV-1-related immunologic thrombocytopenia. *J Clin Invest.* 1992, Bd. 89(2), S. 356-364.
- Kato, K, et al. 2004.** Genetic deletion of mouse platelet glycoprotein Ibbeta produces Bernard-Soulier phenotyp with increased alpha-granule size. *Blood.* 2004, Bd. 104, S. 2339-2344.
- Kato, T. 2000.** Protein characteristics of thrombopoietin. *Stem Cells.* 2000, Bd. 14 Suppl 1, S. 139-147.
- Kato, T, Matsumoto, A und Ogami, K. 1999.** Native thrombopoietin: structure and function. *Stem Cell.* 1999, Bd. 16(5), S. 322-328.
- Kaushanky, K und Drachmann, JG. 2002.** The molecular and cellular biology of thrombopoetin: the primary regulator of platelet production. *Oncogene.* 2002, Bd. 21, S. 3359-67.
- Kaushansky, K. 2005.** The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest.* 2005, Bd. 115, S. 3339-3347.
- . **1995.** Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood.* 1995, Bd. 86, S. 419-431.
- Kaushansky, K, Lok, S und Holly, RD. 1994.** Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature.* 1994, Bd. 369(6481), S. 568-571.
- Kelton, JG, Powers, PJ und Carter, CJ. 1982.** A prospective study of the usefulness of the measurement of platelet associated IgG for the diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 1982, Bd. 60, S. 1050-1053.
- Kenney, DM und Davis, AE. 1981 .** Association of alternative complement pathway components with human blood platelets: secretion and localization of factor D and beta 1H Globulin. *Clin Immunol Immunopathol.* 1981 , Bd. 21(3), S. 351-363.
- Kiefel, V. 2001.** Platelet antibodies and diagnosis of immune-mediated thrombocytopenia. *Infusionsther Transfusionsmed.* 2001, Bd. 28, S. 209-217.
- . **1992.** The MAIPA assay and its applications in immunohaematology. *Transfus Med.* 1992, Bd. 2(3), S. 181-188.
- Kiefel, V und Mueller-Eckhardt, C. 1993.** Medikamentös induzierte Immunhämozytopenien. *Deutsche Medizinische Wochenschrift.* 1993, Bd. 118, S. 113-118.
- Kiefel, V, et al. 1987.** Monoclonal antibody--specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood.* 1987, Bd. 70(6), S. 1722-1726.
- Kiefel, V, et al. 2001.** Platelet alloantibodies in transfused patients. *Transfusion.* 2001, Bd. 41(6), S. 766-770.
- Kiefel, V, Freitag, E und Kroll, H. 1996.** Platelet autoantibodies (IgG, IgM, IgA) against glycoproteins IIb/IIIa and Ib/IX in patients with thrombocytopenia. *Ann Hematol.* 1996, Bd. 72, S. 280-285.
- Kiefel, V, Salama, A und Mueller-Eckhardt, C. 1989a.** In vitro fixation of C3d and C5b-9 on platelet by human platelet reactive antibodies. *Blut.* 1989a, Bd. 58, S. 33-37.
- Kiefel, V, Spaeth, P und Müller-Eckhardt, C. 1986.** Immune thrombocytopenic purpura: Autoimmune or immune complex disease? *British Journal of Haematology.* 1986. Bd. 64, S. 57-68.

- Kienast, J und Schmitz, G. 1990.** Flow cytometric analysis of thiazole orange uptake by platelets: a diagnostic aid in the evaluation of thrombocytopenic disorders. *Blood*. 75, 1990, S. 116-121.
- Kinoshita, T, et al. 1985.** Distribution of decay-accelerating factor in the peripheral blood of normal individuals and patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J. Exp. Med.* 1985, Bd. 162, S. 75-92.
- Kitchens, CS und Pendergast, JF. 1986.** Human thrombocytopenia is associated with structural abnormalities of the endothelium that are ameliorated by glucocorticosteroid administration. *Blood*. 1986, Bd. 67(1), S. 203-206.
- Klaassen, RJ, Doyle, JJ und Krahn, MD. 2001.** Initial bone marrow aspiration in childhood idiopathic thrombocytopenia: decision analysis. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2001, Bd. 23, S. 511-518.
- Koksch, M, et al. 1995.** Fluorescence resonance energy transfer as a new method for the epitope-specific characterization of anti-platelet antibodies. *J Immunol Methods*. 1995, Bd. 187(1), S. 53-67.
- Kose, M, Ozdemir, MA und Gumus, H. 2007.** Serum leptin levels in patients with childhood immune thrombocytopenic purpura. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2007, Bd. 29, S. 23-26.
- Kosugi, S, Kurata, Y und Tomiyama, Y. 1996.** Circulating thrombopoietin level in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. 1996, Bd. 93, S. 704-706.
- Kravitz, MS und Schoenfeld, Y. 2005.** Thrombocytopenic conditions-autoimmunity and hypercoagulability: Commonalities and differences in ITP, TTP, HIT and APS. *Am J Hematol*. 2005, Bd. 80, S. 232-242.
- Kroll, H., Penke, G. und Santoso, S. 2005.** Functional heterogeneity of alloantibodies against the human platelet antigen (HPA)-1a. *Thromb Haemost*. 2005, Bd. 94, S. 1224-1229.
- Kunicki, TJ, et al. 1981.** The formation of Ca<sup>++</sup>-dependent complexes of platelet membrane glycoprotein IIb and IIIa in solution as determined by crossed immunoelectrophoresis. *Blood*. 1981, Bd. 58, S. 268-278.
- Kurata, Y, et al. 1985.** Platelet-associated complement in chronic ITP. *Br J Haematol*. 1985, Bd. 60, S. 723-733.
- Kurata, Y, Hayashi, S und Kiyoi, T. 2001.** Diagnostic value of tests for reticulated platelets, plasma glycolocalicin, and thrombopoietin levels for discriminating between hyperdestructive and hypoplastic thrombocytopenia. *Am J Clin Pathol*. 2001, Bd. 115, S. 656-664.
- Kuter, DJ. 2008.** Efficacy of romiplostim in patients with chronic thrombocytopenic purpura: A double-blind randomised controlled trial. *Lancet*. 2008, Bd. 371, S. 395-401.
- . 1996. The physiology of platelet production. *Stem Cells*. 1996, Bd. 14(suppl1), S. 88-101.
- Kuwana, M und Ikeda, Y. 2005.** The role of autoreactive T-Cells in the pathogenesis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Int J Hematol*. 2005, Bd. 81, S. 106-112.
- Kuwana, M, Kurata, Y und Fujimura, K. 2006.** Preliminary laboratory based diagnostic criteria for immune thrombocytopenic purpura: evaluation by multi-center prospective study. *J Thromb Haemost*. 2006, Bd. 4, S. 1936-1943.
- Lachmann, PJ und Thompson, MB. 1970.** The complement-mediated lysis. *J Exp Med*. 1970, Bd. 131, S. 642-655.

- Lages, B und Weiss, PJ. 1994.** Evidence for a role of glycoprotein IIb-IIIa, distinct from its ability to support aggregation, in platelet activation by ionophores in the presence of extracellular divalent cations. *Blood*. 1994, Bd. 83, S. 2549-59.
- Laws, HJ, Janssen, G und Borkhardt, A. 2009.** Reassessment of treatment modalities for paediatric patients with chronic immune thrombocytopenia. *Hamostaseologie*. 2009. Bd. 29(2), S. 171-176.
- Lazarus, AH und Crow, AH. 2003.** Mechanism of action of IVIG and anti-D in ITP. *Transfus Apher Sci*. 2003, Bd. 28, S. 249-255.
- Legler, TJ, et al. 1997.** Flow-cytometric analysis of platelet reactive allo- and autoantibodies. *J Lab Med*. 1997. Bd. 21, S. 676-680.
- Lennette, EH und Schmidt, NJ. 1979.** Diagnostic procedures for viral and rickettsial infections. 5. *Ausgabe*. 1979, S. 35-42.
- Levine, SM, et al. 2007.** Novel conformation of histidyl-transfer RNA synthetase in the lung: the target tissue in Jo-1 autoantibody-associated myositis. *Arthritis Rheum*. 2007, Bd. 56(8), S. 2729-2739.
- Li, S, Wang, L und Zhao, C. 2007.** CD8+Tcells suppress autologous megakaryocyte apoptosis in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br. J Haematol*. 2007, Bd. 139, S. 605-611.
- Li, W, et al. 2001.** The diagnostic value of platelet glycoprotein-specific autoantibody detection in autoimmune thrombocytopenic purpura. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2001. Bd. 22(7), S. 374-376.
- Lim, SH, et al. 2004.** Rituximab administration following autologous stem cell transplantation for multiple myeloma is associated with severe IgM deficiency. *Blood*. 2004, Bd. 103(5), S. 1971-1972.
- Loftus, JC, et al. 1987.** Molecular cloning and chemical synthesis of a region of platelet glycoprotein involved in adhesive function. *Proc natl Acad Sci USA*. 1987, Bd. 84, S. 7114-8.
- Loos, M, et al. 1980.** Immunochemical and functional analysis of complete C1q deficiency in man: evidence that C1r and C1s are in the native form, and that they reassociate with purified C1q to form macromolecular C1. *J Immunol*. 1980, Bd. 124(1), S. 59-63.
- Lopez, JA, et al. 1998.** Bernard Soulier Syndrome. *Blood*. 1998, Bd. 91, 12, S. 4397-4418.
- Lord, GM, Matarese, G und Howard, JK. 1998.** Leptin modulate the T-Cell immune response and reserves starvation-induced immunosuppression. *Nature*. 1998, Bd. 394, S. 897-901.
- Matsumoto, M, et al. 1989.** Probing the C4-binding site on C1s with monoclonal antibodies. Evidence for a C4/C4b-binding site on the gamma-domain. *J Immunol*. 1989, Bd. 142(8), S. 2743-2750.
- Mayer, JL und Beardsley, DS. 1996.** Varicella-associated thrombocytopenia: autoantibodies against platelet surface glycoprotein V. *Pediatr Res*. 1996. Bd. 40, S. 615-619.
- McMillan, R. 2000.** Autoantibodies and autoantigens in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol*. 2000, Bd. 37, S. 239-248.
- . **2007.** The pathogenesis of chronic immune thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol*. 2007, Bd. 44(Suppl 5), S. 3-11.
- . **2005.** The role of antiplatelet autoantibody assays in the diagnosis of immune thrombocytopenic purpura. *Curr Hematol Rep*. 2005, Bd. 4, S. 160-165.

- . 1997. Therapy for adults with refractory chronic immune thrombocytopenic purpura. *Ann Intern Med.* 1997, Bd. 126(4), S. 307-314.
- McMillan, R und Martin, M. 1981.** Fixation of C3 to Platelets in Vitro by Antiplatelet antibody from Patients with Immune Thrombocytopenic Purpura. *British Journal of Haematology.* 1981. Bd. 47, S. 251-256.
- McMillan, R, et al. 1987.** Platelet-associated and plasma anti-glycoprotein autoantibodies in chronic ITP. *Blood.* 1987, Bd. 70, S. 1040-1045.
- McMillan, R, Luiken, GA und Levy, R. 1978.** Antibody against megakaryocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura. *JAMA.* 1978, Bd. 239, S. 2460-2462.
- McMillan, R, Tani, P und Millard, F. 1987.** Platelet-associated and plasma anti-glycoprotein autoantibodies in chronic ITP. *Blood.* 1987, Bd. 70, S. 1040-1045.
- Meri, S., Waldmann, H. und Lachmann, P.J. 1991.** Distribution of protectin (CD59), a complement attack inhibitor, in normal human tissues. *Lab Invest.* 1991, Bd. 65, S. 532-537.
- Meyers, By Thomas J, et al. 1982.** Platelet-associated C3 in Immune Thrombocytopenic Purpura. *Blood.* 1982. Bd. 59, S. 1023-1028.
- Miller, E. 1997.** The use of danazol in the therapy of immune-mediated disease of dogs. *Semin Vet Med Surg.* 1997, Bd. 12(3), S. 167-169.
- Moog, S, et al. 2001.** Platelet glycoprotein V binds to collagen and participates in platelet adhesion and aggregation. *Blood.* 2001. Bd. 98, S. 1038-1046.
- Morel-Kopp, M., et al. 1996.** Drawbacks of the MAIPA technique in characterising human antiplatelet antibodies. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1996, Bd. 7, S. 144-146.
- Morel-Kopp, MC, et al. 1997.** A three amino acid deletion in glycoprotein IIIa is responsible for type I Glanzmann's thrombasthenia: importance of residues Ile 325 Pro 326 Gly 327 for beta3-integrin subunit association. *Blood.* 1997, Bd. 90, S. 669-77.
- Morgan, BP. 1992.** Effects of the membrane attack complex on nucleated cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1992, Bd. 178, S. 115-140.
- Mueller-Eckhardt, C, et al. 1978.** Studies on the platelet radioactive anti-immunglobulin test. *J Immunol Methods.* 1978, Bd. 19, S. 1-11.
- Münz, C, et al. 2009.** Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nat Rev Immunol.* 2009, Bd. 9(4), S. 246-158.
- Nakamura, T, Miyakawa, Y und Miyamura, A. 2006.** A novel nonpeptidyl human c-Mpl activator stimulates human megakaryopoiesis and thrombopoiesis. *Blood.* 2006, Bd. 107(11), S. 4300-4307.
- Nardi, M, et al. 2001.** Complement-independent, peroxide-induced antibody lysis of platelets in HIV-1-related immune thrombocytopenia. *Cell.* 2001. Bd. 106(5), S. 551-561.
- Neri, D, Montigiani, S und Kirkham, PM. 1996.** Biophysical methods for the determination of. *Trends Biotechnol.* 1996, Bd. 14, S. 465-470.

- Nguyen, XD, et al. 2004.** A novel method for simultaneous analysis of specific platelet antibodies: SASPA. *Br J Haematol.* 2004, Bd. 127, S. 552-560.
- Nicholson-Weller, A, et al. 1982.** Isolation of a human erythrocyte membrane glycoprotein with decay-accelerating activity for C3 convertases of the complement system. *J Immunol.* 1982, Bd. 129, S. 184-189.
- Niculescu, F, Badea, T und Rus, H. 1999.** Sulytic C5b-9 induces proliferation of human aortic smooth muscle cells: role of mitogen activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Atherosclerosis.* 1999, Bd. 142, S. 47-56.
- Nieuwland, R, Berckmans, RJ und Rotteveel-Eijkman, RC. 1997.** Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. *Circulation.* 1997, Bd. 96, S. 3534-3541.
- Nurden, AT und Caen, JP. 1974.** An abnormal platelet glycoprotein pattern in three cases of Glanzmann's thrombasthenia. *Br J Hamatol.* 1974, Bd. 28, S. 253-60.
- Nurden, AT und Nurden, P. 2001.** Inherited defects of platelet function. *Rev Clin Exp Hematol.* 2001, Bd. 5, 4, S. 314-334. quiz foolowing 431.
- O'Conell, BA und Schiffer, CA. 1990.** Donor selection for alloimmunized patients by platelet crossmatching of random-donor platelet concentrates. *Transfusion.* 1990, Bd. 30, S. 314-317.
- Olsson, B, Andersson, PO und Jernas, M. 2003.** T-Cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Nat Med.* 2003, Bd. 9, S. 1123-1124.
- O'Toole, TE, et al. 1989.** Efficient surface expression of platelet GPIIb/IIIa requires both subunits. *Blood.* 1989, Bd. 74, S. 14-9.
- Packman, C. 2001.** Acquired hemolytic anemia due to warm-reacting autoantibodies. *Heamatology.* 2001, S. 639-48.
- Parodi, E, Rivetti, E und Amendola, G. 2009.** Long-term follow-up analysis after rituximab therapy in children with refractpry symptomatic ITP: identification of factors predictive of a sustained response. *Br J Haematol.* 2009, Bd. 144, S. 552-558.
- Petit pierre, S, et al. 2009.** Use of autoantibodies in clinical practice. *Rev Med Suisse.* 2009, Bd. 5(199), S. 823-831.
- Pfueller, SL und Lüscher, EF. 1974.** Studies of the mechanisms of the human platelet release reaction induced by immunologic stimuli. *J Immunol.* 1974, Bd. 112, S. 1201-1210.
- Phillips, DR, et al. 1988.** The platelet membrane glycoprotein. *Blood.* 1988, Bd. 71, S. 831-843.
- Plow, EF, D'Souza, SE und Ginberg, MH. 1992.** Ligand binding to GPIIb-IIIa: a status report. *Sem Thromb Hemost.* 1992, Bd. 18, S. 324-332.
- Podack, ER, Biesecker, G und Muller-Eberhard, HJ. 1979.** Membran attack complex of complement: generation of high-affinity phospholipid binding sites by fusion of five hydrophilic plasma proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979, Bd. 76, S. 897-901.
- Podack, ER, Tschoop, J und Muller-Eberhard, HJ. 1982.** Molecular organisation of C9 within the membrana attack complex of complement. Induction of circular C9 polymerisation by the C5b-8 assembly. *J Exp Med.* 1982, Bd. 156, S. 268-282.

- Polley, MJ und Nachman, RL. 1979** . Human complement in thrombin-mediated platelet function. *J Exp Med.* 1979 , Bd. 150(3), S. 633-645.
- . **1983** . Human platelet activation by C3a and C3a des-arg. *J.Exp.Med.* 1983 , Bd. 158(2), S. 603-615.
- Poncz, M, et al. 1987**. Structure of the platelet membrane glycoprotein IIb. Homology to the alpha subunits of the vitronectin and fibronectin membrane receptors. *J Biol Chem.* 1987, Bd. 262, S. 8476-82.
- Ramakrishnan, V, et al. 2001**. A thrombin receptor function for platelet glycoprotein Ib-IX unmapped by cleavage of glycoprotein V. *Proc Natl Acad Sci. USA* : s.n., 2001. Bd. 98, S. 1823-1828.
- Roark, JH, Bussel, JB und Cines, DB. 2002**. Genetic analysis of autoantibodies in idiopathic thrombocytopenic purpura reveals evidence of clonal expansion and somatic mutation. *Blood.* 2002, Bd. 100, S. 1388-1398.
- Rosenfeld, SI und Anderson, CL. 1989**. Fc receptors of human platelets. *Platelet Immunology.* 1989. Bd. 17, S. 337-353.
- Ross, GD, et al. 1987**. Specificity of membrane complement receptor type three (CR3) for beta-glucans. *Complement.* 1987, Bd. 4, S. 61-74.
- Rühl, H, et al. 2009**. Autoantibodies against glycoprotein V in patients with immune thrombocytopenic purpura (ITP). 2009.
- Sachs, UJ. 2008**. Diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Hamostaseologie.* 2008. Bde. 28(1-2), S. 72-76.
- Sachs, UJ, et al. 2003**. Bernard-Soulier syndrome due to the homozygous Asn-45Ser mutation in GPIX: an unexpected, frequent finding in Germany. *Br J Haematol.* 2003. Bd. 123(1), S. 127-131.
- Saelmann, EUM, et al. 1994**. Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa ( $\alpha 2\beta 1$ -integrin). *Blood.* 1994, Bd. 83, S. 1244-1250.
- Saleh, MN, et al. 1989**. Monocyte-platelet interaction in immune and nonimmune thrombocytopenia. *Blood.* 1989, Bd. 74(4), S. 1328-1331.
- Santoso, S und Zutter, MM. 1995**. The Alpha2Beta1 integrin: a collagen receptor on platelets and other cells. *Thromb Haemost.* 1995, Bd. 74, S. 813-821.
- Santoso, S, et al. 2002**. The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1. *J Exp Med.* 2002. Bd. 196, S. 679-691.
- Santoso, S, Kiefel, V und Mueller-Eckhardt, C. 1989**. Immunochemical characterization of the new platelet alloantigen system Bra/Brb. *Br J Haematol.* 1989, Bd. 72, S. 191-198.
- Schatill, SJ und Newman, PJ. 2004**. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood.* 2004, Bd. 104, S. 1606-1615.
- Schifferli, JA, Ng, YC und Peters, DK. 1986**. The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes. *N Engl J Med.* 1986, Bd. 315, S. 488-495.
- Schneider, W und Schnaidt, M. 1981**. The platelet adhesion immunofluorescence test: a modification of the platelet suspension immunofluorescence test. *Blut.* 1981, Bd. 43, S. 389-392.

- Schnittler, HJ, et al. 2001.** Role of actin filaments in endothelial cell-cell adhesion and membrane stability under fluid shear stress. *Pflugers Arch.* 2001, Bd. 442(5), S. 675-687.
- Schreiber, AD, et al. 1979.** Effect on Anti-PLA 1 antibody on human platelets. *Blood.* 1979. Bd. 53.
- Schulman, I, et al. 1965.** STUDIES ON THROMBOPOIESIS. II. ASSAY OF HUMAN PLASMA THROMBOPOIETIC ACTIVITY. *J Pediatr.* 1965, Bd. 66, S. 604.612.
- Seifert, PS, et al. 1992.** CD 59 (homologous restriction factor 20), a plasma membrane protein that protect against complement C5b-9 attack in human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis.* 1992, Bd. 96, S. 135-145.
- Semple, JW, Milev, Y und Cosgrave, D. 1996.** Differences in serum cytokine levels in acute and chronic autoimmune thrombocytopenic purpura: relationship to platelet phenotype and antiplatelet T-cell reactivity. *Blood.* 1996, Bd. 87, S. 4245-4254.
- Seya, T und Atkinson, JP. 1989.** Functional properties of membrane cofactor protein of complement. *Biochem.* 1989, Bd. 264, S. 581-588.
- Shattil, SJ. 1995.** Function and regulation of the beta3 integrins in hemostasis and vascular biology. *Thromb Haemost.* 1995, Bd. 74, S. 149-55.
- Shattil, SJ und Ginsberg, MH. 1997.** Integrin signaling in vascular biology. *J Clin Invest.* 1997, Bd. 100, S. 91-95.
- Shattil, SJ, Kashiwagi, H und Pampori, N. 1998.** Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood.* 1998, Bd. 91, S. 2645-2657.
- Shibata, Y, et al. 1981.** Detection of platelet antibodies by a newly developed mixed agglutination with platelets. *Vox sang.* 1981, Bd. 41, S. 25-31.
- Shihabi, ZK und Dyer, RD. 1988.** 2.1 Protein analysis with bicinchoninic acid. *Ann Clin Lab Sci.* 1988. Bd. 18(3), S. 235-239.
- Shulman, NR, et al. 1973.** Antibodies and platelet membranes. *Thromb Diath Haemorrh.* 1973, Bd. 54, S. 261-270.
- Siess, W. 1989.** Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev.* 1989, Bd. 69, S. 50-178.
- . 1997. Platelet receptors: the thrombin receptor. In: Bruchhausen Fv., Walter U (edits.) Platelets and their factors. *Handbook of experimental pharmacology.* 1997, Bd. Springer Verlag, S. 101-116.
- Sims, PJ und Wiedmer, T. 1991.** The response of human platelets to activated components of the complement system. *Immunol Today.* 1991, Bd. 12, S. 338-42.
- Sims, PJ, Rollin, SA und Wiedmer, T. 1989.** Regulatory control of complement on blood platelets. Modulation of platelet procoagulant responses by a membrane inhibitor of the C5b-9 complex. *J Biol Chem.* 1989, Bd. 264(32), S. 19228-19235.
- Sims, PJ, Wiedmer, T und Esmon, CT. 1989.** Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane. Studies in Scott syndrome: An isolated defect in platelet procoagulant activity. *J Biol Chem.* 1989, Bd. 264, S. 17049-17057.
- Sinha, PK und Kelton, JG. 1990.** Current controversies concerning the measurement of platelet-associated IgG. *Transfus Med Rev.* 1990, Bd. 4, S. 121-135.

- Sitzmann, FC. 2002.** Pädiatrie. 2. *vollständig überarbeitete Auflage*. 2002, Bd. Georg Thieme Verlag.
- Smith, PK, et al. 1985.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985. Bd. 150(1), S. 76-85.
- Sobocka, MB, et al. 2000.** Cloning of the human platelet F11 receptor: a cell adhesion molecule member of the immunoglobulin superfamily involved in platelet aggregation. *Blood*. 2000. Bd. 95, S. 2600-2609.
- Socher, I., Bakchoul, T. und Santoso, T. 2007.** human platelet alloantigens heterogeneity of platelet alloantibodies. *Haematologica journal*. in press, 2007.
- Sosnoski, DM, et al. 1988.** Chromosomal localization of the genes for the vitronectin and fibronectin receptors alpha subunits and for platelet glycoproteins IIb and IIIa. *J Clin Invest*. 1988, Bd. 81, S. 1993-1998.
- Spruce, W, et al. 1983.** Idiopathic thrombocytopenic purpura following bone marrow transplantation. *Acta Haematol*. 1983, Bd. 69(1), S. 47-51.
- Statz, W, et al. 1989.** The membrane glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) complex mediates the Mg<sup>++</sup> dependant adhesion of platelets to collagen. *J Cell Biol*. 1989, Bd. 108, S. 1917-1924.
- Stanton, ME und Legendre, AM. 1986.** Effects of cyclophosphamide in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc*. 1986, Bd. 188(11), S. 1319-1322.
- Stasi, R, Cooper, N und Del Poeta, G. 2008.** Analysis of regulatory T-cell changes in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura receiving B-cell depleting therapy with rituximab. *Blood*. 2008, Bd. 112, S. 1147-1150.
- Steinber, MI, Kelton, JG und Coller, B. 1987.** Plasma glycolocalicin, an aid in the classification of thrombocytopenic disorders. *New Engl J Med*. 1987, Bd. 317, S. 1037-42.
- Taaning, E. 1985.** Microplate enzyme immuno-assay for detection of platelet antibodies. *Tisste Antigens*. 1985, Bd. 25, S. 19-27.
- Takagi, J, et al. 2002.** global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell*. 2002, Bd. 110, S. 599-511.
- Takata, Y, et al. 1987.** Covalent association of C3b with C4b within C5 convertase of the classical complement pathway. *J Exp Med*. 1987, Bd. 165, S. 1494-1507.
- Tarantino, MD, et al. 1999.** Treatment of childhood acute immune thrombocytopenic purpura with anti-D immune globulin or pooled immune globulin. *J Pediatr*. 1999. Bd. 134(1), S. 21-6.
- Taube, T, Schmid, H und Reinhard, H. 2005.** Effect of a single dose of rituximab in chronic immune thrombocytopenic purpura in childhood. *Haematologica*. 2005, Bd. 90, S. 281-283.
- Tazzari, PL, et al. 1995.** Detection of platelet-associated antibodies by flow cytometry in hematological autoimmune disorders. *Ann Hematol*. 1995, Bd. 70, S. 531-544.
- Tedder, TF, et al. 1986.** The role of receptors for complement in the induction of polyclonal B-cell proliferation and differentiation. *J Clin Immunol*. 1986, Bd. 6, S. 65-73.
- Towbin, H. 1979.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci. USA* : s.n., 1979. Bd. 76, S. 4350-4354.

- Tsubakio, T, et al. 1986.** Complement activation in vitro by antiplatelet antibodies in chronic immune thrombocytopenic purpura. *British Journal of Haematology*. 1986. Bd. 63, S. 293-300.
- Van Leeuwen, EF, Van der Ven, JT und Engelfriet, CP. 1982.** Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia. *Blood*. 1982, Bd. 59, S. 23-26.
- Vijayan, KV, et al. 2000.** The PI(A2) polymorphism of integrin beta(3) enhances outside-in signaling and adhesive functions. *J Clin Invest*. 2000, Bd. 105, S. 793-802.
- Von dem Borne, AE, et al. 1978.** A simple immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies. *Br J Haematol*. 1978, Bd. 39, S. 195-207.
- Vorchheimer, DA, Badimon, JJ und Fuster, V. 1999.** Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists in cardiovascular disease. *Jama*. 1999, Bd. 281, S. 1407-1414.
- Wadenvik, H, Stockelberg, D und Hou, M. 1998.** Platelet proteins as autoantibody targets in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Acta Paediatr Suppl*. 1998, Bd. 424, S. 26-36.
- Wagner, CL, et al. 1996.** Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood*. 1996, Bd. 88, S. 907-14.
- Warner, M und Kelton, JG. 1997.** Laboratory investigation of immune thrombocytopenia. *J Clin Pathol*. 1997, Bd. 50(1), S. 5-12.
- Warner, MN, et al. 1999.** A prospective study of protein-specific assays used to investigate idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. 1999. Bd. 104, S. 442-447.
- Watts, RG. 2004.** Idiopathic thrombocytopenic purpura: a 10-year natural history study at the childrens hospital of Alabama. *Clin Pediatr*. 2004, Bd. 43, S. 691-702.
- Webster, ML, Sayeh, E und Crow, M. 2006.** Relative efficacy of intravenous immunoglobulin G in ameliorating thrombocytopenia induced by antiplatelet GPIIb. IIIa versus GPIbAlpha antibodies. *Blood*. 2006, Bd. 108, S. 943-946.
- Weis, JJ, Tedder, TF und Rearon, DT. 1984.** Identification of a 145,000 Mr membrane protein as the C3d receptor (CR2) of human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984, Bd. 81, S. 881-885.
- Wheeler, JM, Knittle, JD und Miller, JD. 1992.** Depot leuprolide versus danazol in treatment of women with symptomatic endometriosis. I. Efficacy results. *Am J Obstet Gynecol*. 1992, Bd. 167(5), S. 1367-1371.
- Wiener, E, et al. 2003 Feb.** Anti-HPA-1a-mediated platelet phagocytosis by monocytes in vitro and its inhibition by Fc gamma receptor (FcgammaR) reactive reagents. *Eur J Haematol*. 2003 Feb, Bd. 70(2), S. 67-74.
- Wilhide, CC, et al. 1997.** The human integrin beta3 gene is 63 kb and contains a 5'-UTR sequence regulating expression. *Blood*. 1997, Bd. 90, S. 3951-61.
- Willerson, JT, et al. 1989.** Specific platelet mediators and unstable coronary artery lesions. Experimental evidence and potential clinical implications. *Circulation*. 1989, Bd. 80, S. 198-205.
- Wilson, K, Livingstone, M und Longbottom, D. 2009.** Comparative evaluation of eight serological assays for diagnosing *Chlamydia abortus* infection in sheep. *Vet Microbiol*. 2009, Bde. 135(1-2), S. 38-45.

- Winkelmann, M, Scharf, RE und Schneider, W. 1987.** Therapy of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Dtsch Med Wochenschr.* 1987, Bd. 112(6), S. 221-224.
- Winkler, U, Schneller, R und Engert, A. 1999.** Einsatz monoklonaler und bispezifischer Antikörper in der Tumorthherapie. *Der Onkologe.* 1999, Bd. 5, S. 679-687.
- Wu, KK und Hoak, LC. 1975.** Increased platelet aggregates in patients with transient ischemic attacks. *Stroke.* 1975, Bd. 6, S. 521.
- Xiao, TJ, et al. 2004.** Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature.* 2004, Bd. 432, S. 59-67.
- Xiong, JP, et al. 2004.** A novel adaptation of the integrin PSI domain revealed from its crystal structure. *J Biol Chem.* 2004, Bd. 279, S. 40252-4.
- Xiong, JP, et al. 2001.** Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha V beta 3. *Science.* 2001, Bd. 294, S. 339-345.
- Xiong, JP, et al. 2003.** New insights into the structural basis of integrin activation. *Blood.* 2003, Bd. 102, S. 1155-1159.
- Yanabu, M, et al. 1993.** Platelet activation induced by an antiplatelet antibody against CD9 antigen and its inhibition by another autoantibody in immune thrombocytopenic purpura. *Br. J Haematol.* 1993, Bd. 84, S. 694-701.
- Zaja, F, et al. 2003.** Anti-CD20 therapy for chronic lymphocytic leukemia-associated autoimmune diseases. *Leuk Lymphoma.* 2003, Bd. 44(11), S. 1951-1955.
- Zeile, G. 1978.** Vincristin-therapy of chronic refractory idiopathic thrombocytopenic purpura (author's transl). *Blut.* 1978, Bd. 36(4), S. 217-223.
- Zhang, F, Chu, X und Wang, L. 2006.** Cell-mediated lysis of autologous platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol.* 2006, Bd. 76, S. 427-31.
- Zimmerman, TS und Kolb, WP. 1976 .** Human platelet-initiated formation and uptake of the C5-9 complex of human complement. *J Clin Invest.* 1976 , Bd. 57(1), S. 203-211.
- Zimrin, AB, et al. 1990.** The genomic organization of platelet glycoprotein IIIa. *J Biol Chem.* 1990, Bd. 265, S. 8590-5.
- Zipfel, PF, et al. 1999.** The factor H protein family. *Immunopharmacology.* 1999, Bd. 42, S. 53-60.

## Veröffentlichungen zum Thema

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden vollständig auf folgenden Kongressen präsentiert und als Abstract veröffentlicht:

1. 41th annual meeting of German society Transfusion Medicine and Immune Haematology, 2008, Düsseldorf, Germany  
Najaoui A , Giptner A , bakchoul T , Santoso S , Sachs UJH (2008)  
Complement-fixation by autoantibodies from patients with immune thrombocytopenic purpura (ITP)
2. 14th Symposium on Platelet and Granulocyte Immunobiology, 2009, Berlin, Germany  
Najaoui A , Giptner A , Bakchoul T , Santoso S , Sachs UJH (2009)  
Prospective evaluation of PF4/heparin immunoassays for the diagnostic of heparin-induced thrombocytopenia (HIT) Human Immunology
3. 53rd annual meeting of German society of Transfusion Medicine and Immune Haematology, 2009, Wien / Schloß Schönbrunn (Österreich)  
Najaoui A , Giptner A , bakchoul T , Santoso S , Sachs UJH (2009)  
Complement-fixation by autoantibodies from patients with immune thrombocytopenic purpura (ITP)
4. 14th Symposium on Platelet and Granulocyte Immunobiology, 2009, Berlin, Germany  
Heiko Rühl, Abderrahim Najaoui, Johanna Stoy, Tamam Bakchoul, Gregor Bein, Sentot Santoso, and Ulrich J.H.Sachs (2009)  
Autoantibodies against platelet glycoprotein V in patients with immune thrombocytopenic purpura (ITP)
5. European Symposium on Platelet and Granulocyte. Immunobiology in Thun, Canton Berne. 2008  
Najaoui A , Giptner A , bakchoul T , Santoso S , Sachs UJH (2008)  
Prospective evaluation of PF4/heparin immunoassays for the diagnostic of heparin-induced thrombocytopenia (HIT) Human Immunology

Die vorliegende Arbeit wurde in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht bzw. steht zur Publikation an:

1. Bakchoul T, Giptner A, **Najaoui A**, Bein G, Santoso S, Sachs UJ. Prospective evaluation of PF4/heparin immunoassays for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. **Fehler! Hyperlink-Referenz ungültig.** 2009; 7:1260-5.
2. **Najaoui A**, Bakchoul T, Rummel MJ, Bein G, Santoso S, Sachs UJ. GP IIb/IIIa-Dependent Complement Activation Is Common In Patients with Immune Thrombocytopenic Purpura. *Blood* 2010;116:614 (abstract)
3. **Najaoui A**, Bakchoul T, Stoy J, Bein G, Rummel MJ, Santoso S, Sachs UJ. Autoantibody-mediated complement activation on platelets is a common finding in patients with immune thrombocytopenic purpura (ITP). *J Thromb Haemost* (submitted)

## Anhang

Verwendeter Durchflußzytometer: Cytometer Typ: FACScan

Tab. Anhang 1 Parametereinstellung des Durchflußzytometers

Parameter	Detector	Voltage	Amplification Gain
P1	FSC	E00	1,00 log
P2	SSC	261	1,00 log
P3	FL1	670	1,00 log
P4	FL2	565	1,00 log
P5	FL3	150	1,00 log
Threshold	Parameter FSC Value 200		
Compensation	FL1 0,0% FL2		
	FL2 45,0% FL1		
	FL2 0,0% FL3		
	FL3 0,0% FL2		
Log Data Units	Channel Values		

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

„Ich erkläre: ich habe die vorgelegte Dissertation selbst selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.“

Frankfurt, den 20.12.2010

---

## Danksagung

Als erstes möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Gregor Bein bedanken, der mir durch die Überlassung des hier in dieser wissenschaftlichen Arbeit behandelten, interessanten Themas meine Dissertation ermöglichte und durch die Bereitstellung der idealen Voraussetzungen zu deren Durchführung beitrug. Außerdem bedanke ich mich für die fachkundige Durchsicht meiner Arbeit.

Sehr wichtig ist es mir, meinem persönlichen Betreuer Herrn PD Dr. Ulrich J.H. Sachs für seine wissenschaftliche Betreuung, die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie die wertvollen Diskussionen meinen herzlichen Dank auszusprechen. Ohne seine ständige Bereitschaft, produktive Vorschläge und Ideen mit einzubringen und meine Arbeit fachkundig zu unterstützen, würde dieser Arbeit bestimmt einiges fehlen. Für seine freundliche und angenehme Art bei der Zusammenarbeit bin ich ihm sehr dankbar.

Herrn PD Dr. Sentot Santoso danke ich dafür, dass er mir in einzelnen Diskussionen zahlreiche Anregungen und Ratschläge geben konnte.

Auch danken möchte ich allen Mitarbeitern/innen des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin für deren Hilfsbereitschaft in praktischen und theoretischen Fragen. Mein Dank gilt insbesondere den Mitgliedern des Thrombozytenlabors: Astrid Giptner, Sabine Kreiling, Petra Ziegler, der AG Immunregulation: Angelika Nockher, des HLA-Labors & Stammzellen: Katja Müller für ihre erwiesene Hilfsbereitschaft, ihre konstruktive Kritik und ihren Erfahrungen, mit denen sie mir immer tatkräftig zur Seite standen.

Nicht vergessen möchte ich alle Institutsangehörige, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und nicht namentlich erwähnt wurden.

Mein Dank gilt nicht zuletzt meinen Freunden, die mich bei der Erstellung dieser Dissertation durch Korrekturlesen und Formulierungsvorschlägen unterstützten.

Meinen Eltern bin ich dankbar für die Unterstützung, ihre Kraft und ihre Liebe, die mich all die Jahre durch mein Studium begleitet haben.