

Aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin am
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Direktor Prof. Dr. G. Bein

unter externer Betreuung durch Prof. Dr. M. U. Martin,

Professur für Immunologie an der Justus-Liebig Universität Gießen

**Transport- und Bindungsmechanismen von thrombozytären
Alloantikörpern und deren Assoziation zur
fetalen und neonatalen Blutungsneigung**



INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig Universität Gießen vorgelegt von

Ines Socher

aus Rostock

Gießen, 2007

Angenommen vom Fachbereich Biologie und Chemie der Justus-Liebig Universität Gießen
am

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. P. R. Schreiner

Referent: Prof. Dr. M. U. Martin

1. Korreferent: Prof. Dr. G. Bein

2. Korreferent: Prof. Dr. A. Pingoud

MEINEN ELTERN UND GROBELTERN

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Funktion humaner Blutplättchen	1
1.2 Humane plättchenspezifische Alloantigene.....	2
1.3 Klinische Bedeutung von plättchenspezifischen Alloantigenen	5
1.3.1 Refraktärzustand gegen Thrombozytentransfusionen	5
1.3.2 Posttransfusionelle Purpura.....	5
1.3.3 Fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie	7
1.4 Pathogenese der fetalen und neonatalen Alloimmunthrombozytopenie	9
1.4.1 Humorale Immunantwort in der FNAIT	9
1.4.2 Zelluläre Immunantwort in der FNAIT	10
1.4.3 Diaplazentarer IgG Transport in der FNAIT	11
1.4.3.1 Struktur und Funktion plazentarer Fc γ Rezeptoren und IgG bindender Proteine	13
1.4.3.2 Struktur und Funktion des neonatalen Fc Rezeptors.....	14
1.5 Diagnostik von Alloimmunthrombozytopenien	16
1.5.1 Genotypisierung von plättchenspezifischen Alloantigenen	17
1.5.2 Testverfahren zum Nachweis plättchenspezifischer Alloantikörper.....	18
1.6 Integrin α IIb β 3 und humane Plättchenalloantigene	19
1.7 Heterogenität von plättchenspezifischen alloantigenen Determinanten auf dem α IIb β 3 Integrin	23
1.7.1 Heterogenität von HPA-1 Alloantikörpern	23
1.7.2 Heterogenität von HPA-3 Alloantikörpern	25
1.8 Funktionelle Heterogenität von plättchenspezifischen Alloantikörpern	26
1.9 Zielsetzung.....	29
2 Material.....	32
2.1 Geräte.....	32
2.2 Verbrauchsmaterial.....	34

2.3	Chemikalien.....	35
2.4	Gebrauchsfertige Reagenzien, Lösungen, Puffer und Kits.....	37
2.5	Antikörper.....	39
2.6	Nukleinsäuren und Nukleotide	40
2.7	Marker.....	41
2.8	Enzyme und Proteine	41
2.9	Zelllinien und Bakterien	41
2.10	Humane Antiseren	42
2.11	Fetale DNA-Proben	42
3	Methoden.....	43
3.1	Molekularbiologische Methoden	43
3.1.1	Transformation kompetenter Escherichia coli-Zellen.....	43
3.1.2	Isolierung von Plasmiden aus Escherichia coli-Zellen	43
3.1.3	DNA Isolierung aus EDTA-Vollblut/Buffy Coat	44
3.1.4	Isolierung von Thrombozyten-RNA aus Vollblut.....	44
3.1.5	RNA Isolierung aus mononukleären Zellen.....	44
3.1.6	In vitro Transkription.....	45
3.1.7	Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren	45
3.1.8	Amplifikation von DNA-Sequenzen mittels Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)	45
3.1.9	Quantifizierung von FcRn-spezifischen Transkripten mittels TaqMan® Echtzeit PCR (Real-time PCR) 47	
3.1.10	Site-directed Mutagenesis	47
3.1.11	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarosegel.....	48
3.1.12	DNA-Sequenzierung.....	48
3.2	Zellbiologische Methoden	49
3.2.1	Isolierung von Monozyten	49
3.2.2	Kultivierung von eukaryontischen Zelllinien.....	50
3.2.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen	51
3.2.4	Transiente Expression von allelspezifischen α Iib β 3 Isoformen.....	51
3.2.5	Stabile Expression von allelspezifischen α Iib β 3 Isoformen in CHO-K1	52
3.2.6	Zellselektion.....	52
3.2.7	Renilla-Luciferase Reporter-gen-Assay	53
3.3	Immunologische und biochemische Methoden	54

3.3.1	Monoclonal antibody immobilization of platelet antigens (MAIPA) Assay	54
3.3.2	Plättchen-Adhäsions-Immunfluoreszenz-Test (PAIFT)	56
3.3.3	Adhäsionstest mit mononucleären Zellen.....	56
3.3.4	Reinigung von monoklonalen Antikörpern über eine Protein G-Säule	57
3.3.5	Isolierung von α Ib β 3- Plättchenprotein aus Plättchenkonzentraten.....	58
3.3.5.1	Kopplung des Liganden an Trägermatrix	58
3.3.5.2	Herstellung des Thrombozytenlysates	59
3.3.5.3	Adsorption und Elution des Glykoproteins α Ib β 3	59
3.3.6	IgG Aufreinigung aus Humansenen/-plasmen.....	60
3.3.7	Proteinmengenbestimmung.....	61
3.3.8	Sodiumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	61
3.3.9	Nachweis und Quantifizierung von getrennten Proteinen mit Silberfärbung	61
3.3.10	Westernblot.....	62
3.3.11	Immunpräzipitation.....	64
3.3.12	Strippen von Membranen.....	65
3.3.13	Detektion von Komplementbindung.....	65
3.3.13.1	Mikrokomplementbindungstest (MKBR)	65
3.3.13.2	Durchflusszytometrischer Komplementbindungstest	66
3.3.14	Durchflusszytometrie	67
3.3.15	Oberflächenplasmonresonanz-Messung (Surface Plasmon Resonance, SPR).....	68
3.3.15.1	Immobilisierung von α Ib β 3-Protein.....	69
3.3.15.2	Messung der Antigen-Antikörper Interaktion mit SPR	70
3.4	Statistische Methoden.....	71
4	Ergebnisse	72

I Heterogenität diaplazentarer Transportmechanismen in der FNAIT: der neonatale Fc Rezeptor als IgG Transporter **72**

4.1	Phänotypische Relevanz eines Polymorphismus in der Promotorregion des FcRn Rezeptors und seine Rolle in der Pathogenese der FNAIT	72
4.1.1	Ein VNTR Polymorphismus beeinflusst die Transkriptionsaktivität des neonatalen Fc Rezeptor α -chain Promotors.....	73
4.1.2	Eine variable Oberflächenexpression von FcRn beeinflusst die pH-abhängige IgG Bindung an Monozyten.....	75
4.1.3	Einfluss der variablen Expression des neonatalen Fc Rezeptors auf die klinische Ausprägung der fetalen und neonatalen Alloimmunthrombozytopenie	77

II Heterogenität von plättchenspezifischen Alloantikörpern gegen das Integrin α IIb β 3 und deren Auswirkung auf die klinische Ausprägung und Diagnostik der FNAIT 81

4.2 Eine natürliche Leu33Val Mutation im β 3-Integrin definiert einen Split des HPA-1a Epitops: Bedeutung für die klinische Ausprägung der Alloimmunthrombozytopenie 81

4.2.1 Die Leu33Val Mutation verändert nicht die Oberflächenexpression des Integrins α IIb β 3 83

4.2.2 Die Leu33Val Mutation beeinflusst die Struktur des HPA-1a Epitops..... 84

4.2.3 Die Affinität der rhu mAK ist nicht Ursache der HPA-1a Alloantikörperreaktivität mit der β 3-Val33Isoform 85

4.2.4 Der Ursprung der HPA-1 Alloantikörper bedingt ein heterogenes Bindungsverhalten mit der β 3-Val33 Isoform 88

4.2.5 Die Leu33Val Mutation beeinflusst die Ausprägung der Thrombozytopenie, aber nicht die Blutungsneigung in der FNAIT 90

4.3 Charakterisierung der HPA-1a Alloantikörperaffinität und der alloantikörpervermittelten Komplementbindung als prädiktive Parameter in der Pathogenese der FNAIT 92

4.3.1 Etablierung der Oberflächenplasmonresonanz Technologie zur Echtzeitanalyse der HPA-1 Alloantikörperbindung 92

4.3.2 HPA-1a FNAIT Alloantikörper zeigen eine heterogene HPA-1a Bindung 96

4.3.3 Zusammenhang zwischen Affinität von HPA-1a Alloantikörpern und der Ausprägung der FNAIT 99

4.3.4 Antikörperreifung während FNAIT ist begleitet von Affinitätsreifung 101

4.3.5 HPA-1a Alloantikörper von FNAIT Patienten können nicht Komplement C1q binden..... 104

4.3.6 NOD/SCID Mausmodell zur Analyse der HPA-1a alloantikörpervermittelten Elimination humaner Plättchen: in vivo Modell der FNAIT 108

4.3.7 Immunisierung während PTP führt zur Bildung HPA-1a spezifischer Alloantikörper mit hoher Antikörperaffinität..... 110

4.4 Heterogenität von HPA-3 Alloantikörpern und deren Auswirkungen auf die Diagnostik von Alloimmunthrombozytopenien 115

4.4.1 Die Reaktivität von HPA-3 Alloantikörpern ist abhängig von der HPA-3 Gendosis und der komplexspezifischen α IIb β 3 Präsentation 116

4.4.2 Sequenzanalyse bestätigt den HPA-3 Dimorphismus 118

4.4.3 HPA-3 Alloantikörper unterscheiden sich in ihrem Bindungsverhalten mit gelagerten Plättchen 119

4.4.4 Rekombinante Proteine aus CHO Zellen exprimieren keine HPA-3 Epitope..... 123

4.4.5 Sialinsäuren beeinflussen die Konformation von HPA-3 Epitopen 124

4.4.6 HPA-3a Alloantikörper erkennen α IIb β 3-komplexspezifische Epitope 127

4.4.7 Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff kann die Integrität von HPA-3 Epitopen bewahren 128	128
4.4.8 Der Einsatz von frischen Spenderzellen ermöglicht eine verbesserte Diagnostik in FNAIT Verdachtsfällen mit fetomaternaler HPA-3 Inkompatibilität	129
4.4.9 SPR-Analyse der HPA-3 Alloantikörperbindung	131
5 Diskussion	132
5.1 Der Einfluss eines FcRn Polymorphismus als prädiktiver Parameter für FNAIT	133
5.2 Der Einfluss von Epitopen als prädiktiver Parameter in der FNAIT	135
5.3 Der Einfluss der Antikörperaffinität auf den Schweregrad der FNAIT	139
5.4 Die Aktivierung der klassischen Komplementkaskade bei der Elimination von Thrombozyten in der FNAIT	144
5.5 Die Analyse von plättchenreaktiven HPA-1a Alloantikörpern in vivo	145
5.6 Die Relevanz der HPA-3 Alloantikörperheterogenität in der serologischen Diagnostik der FNAIT	147
5.7 Die posttransfusionelle Purpura.....	150
6 Zusammenfassung.....	153
7 Summary	156
8 Literatur.....	159
9 Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme	177
10 Anhang	181
LEBENS LAUF	185
DANKSAGUNG.....	186
EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....	187

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1.1: Schematische Darstellung thrombozytärer Glykoproteine mit Relevanz in immunologisch bedingten Thrombozytopenien.	1
Abb. 1.2: Komponenten und Aktivierungswege des Komplementsystems.	10
Abb. 1.3: Schematische Darstellung der IgG bindenden Proteine und Rezeptoren in einer reifen Plazenta.	12
Abb. 1.4: FcRn Rezeptor.	15
Abb. 1.5: Struktur des α IIb β 3 Integrins.	21
Abb. 1.6: Schemendiagramm natürlich vorkommender Polymorphismen auf dem Integrin α IIb β 3, welche als immunogene HPAs für die Entstehung einer Alloimmunthrombozytopenie verantwortlich sind.	22
Abb. 1.7: Calf-2 Domäne des α IIb Integrins.	25
Abb. 3.1: Prinzip der Oberflächenplasmonresonanz Technologie.	69
Abb. 3.2: Darstellung der Immobilisierungsprozedur.	70
Abb. 3.3: Phasen der Antigen-Antikörperinteraktion im SPR Sensorgramm.	71
Abb. 4.1: Darstellung der PCR-Produkte von Individuen mit verschiedenen VNTR Genotypen.	72
Abb. 4.2: Die Transkriptionsaktivität des FcRn Promoter Allels VNTR3 ist signifikant höher als die von VNTR3.	74
Abb. 4.3: Humane Monozyten von VNTR3/3 Individuen zeigen eine signifikant höhere IgG Bindung als die von VNTR2/3 Individuen.	76
Abb. 4.4: Aus den Patientenakten dokumentierte klinische Daten der FNAIT Patienten.	78
Abb. 4.5: Der VNTR Genotyp zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die fetale und neonatale Plättchenzahl.	80
Abb. 4.6: Identifizierung einer neuen β 3-Val33 Punktmutation mittels Lightcycler-Technik und Sequenzanalyse.	82
Abb. 4.7: Oberflächenexpression des Integrins α IIb β 3 auf CHO-Transfektanten zeigt keine Unterschiede zwischen der β 3-Leu33, -Pro33 und -Val33 Isoform	83
Abb. 4.8: Rekombinante humane mAK aus den B-Zellen von PTP Patienten erkennen die β 3-Val33 Mutation, von FNAIT Patienten hingegen nicht.	85
Abb. 4.9: Surface Plasmon Resonance Analyse ermittelt ähnliche Interaktion zwischen rekombinantem α IIb β 3 und rhu mAK CamTran007 (A) und 19-7 (B).	87

Abb. 4.10: Die β 3-Val33 Mutation beeinträchtigt das HPA-1a Epitop von polyklonalen anti-HPA-1a Alloantikörpern aus FNAIT Patienten, aus PTP Patienten hingegen nicht.	88
Abb. 4.11: Analyse von zwei unterschiedlichen anti-HPA-1a Seren (PTP #1; FNAIT #2) im MAIPA Assay mit CHO-Transfektanten (β 3- Leu33 und β 3-Val33) bestätigt Split der anti-HPA-1a Reaktivität.	89
Abb. 4.12: Assoziation der Schwere der Thrombozytopenie (neonatale Plättchenzahl) mit der HPA-1a Alloantikörperreaktivität mit β 3-Val33 für 40 FNAIT Patienten.	91
Abb. 4.13: Immunchemische Analyse bestätigt die Reinheit und Aktivität der isolierten α IIB β 3-Protein Fraktionen.	93
Abb. 4.14: Vortest (Scouting) zur Bestimmung der erforderlichen pH-Bedingungen und Proteinmenge (α IIB β 3) für die Immobilisierung.	94
Abb. 4.15: Aminokopplung des α IIB β 3-Proteines an die Sensoroberfläche eines CM5-Chips.	94
Abb. 4.16: Surface Plasmon Resonance Analyse von verschiedenen monoklonalen Antikörpern bestätigt die Aktivität und Spezifität des immobilisierten α IIB β 3 Proteins.	95
Abb. 4.17: Silberfärbung bestätigt die Reinheit von isoliertem IgG maternaler anti-HPA-1 Seren (#1, 2 und 3).	96
Abb. 4.18: Surface Plasmon Resonance Analyse verschiedener HPA-1 Alloantikörper von FNAIT Fällen mit immobilisiertem α IIB β 3 Plättchenprotein zeigt, dass die Antikörperbindung spezifisch, aber mit unterschiedlicher Affinität erfolgt.	97
Abb. 4.19: Korrelation der SPR Daten zur Blutungskomplikation der FNAIT Patienten.	100
Abb. 4.20: Surface Plasmon Resonance Analyse detektiert Zunahme der HPA-1a Alloantikörperaffinität während einer Sekundärimmunisierung in der FNAIT.	103
Abb. 4.21: Funktionelle Analyse im Mikrokomplementbindungstest (MKBR) zeigt, dass HPA-1a Alloantikörper von PTP Patienten Komplement C1q binden, von FNAIT Patienten hingegen nicht.	105
Abb. 4.22: Durchflusszytometrische Analyse detektiert Komplement C1q Bindung durch HPA-1 Alloantikörper von PTP Patienten, von FNAIT Patienten hingegen nicht.	107
Abb. 4.23: Injektion der IgG Fraktion von anti-HPA-1a Seren führt zu spezifischer Elimination von HPA-1a positiven Plättchen in <i>NOD/SCID</i> Mäusen.	110
Abb. 4.24: MAIPA Ergebnisse einer Patientin mit posttransfusioneller Purpura aus Rostock.	112
Abb. 4.25: Surface Plasmon Resonance (SPR) Analyse von anti-HPA-1a Alloantikörpern aus Patienten mit posttransfusioneller Purpura (PTP) und anti- α IIB β 3 Autoantikörpern.	113

Abb. 4.26: Reaktivität von HPA-3 Alloantikörpern in Abhängigkeit vom Phänotyp der Plättchen und der Spezifität mAK gegen α IIB β 3 im MAIPA Assay.	117
Abb. 4.27: Sequenzierung einer 1457 pb großen Region auf der α IIB cDNA von typisierten HPA-3 Spendern detektiert keine zusätzlichen Mutationen.	118
Abb. 4.28: Analyse der HPA-3 Alloantikörperreaktivität während einer Lagerungsperiode von 14 Tagen (d) im MAIPA enthüllt bestimmte HPA-3 Alloantikörper mit einer Spezifität gegen „lagerungsinstabile“ HPA-3 Epitope.	120
Abb. 4.29: Anti-HPA-3 lassen sich mit frischen intakten Plättchen durchflusszytometrisch detektieren.	121
Abb. 4.30: Rekombinante Proteine aus CHO-Zellen (α IIB-Ile843, -Ser843) exprimieren nur bestimmte HPA-3 Epitope.	123
Abb. 4.31: Bestimmte HPA-3a Alloantikörper erkennen Neuraminidase-empfindliche HPA-3 Epitope, die instabil während einer Plättchenlagerung bei 4°C sind.	125
Abb. 4.32: Immunchemische Analyse zeigt eine Empfindlichkeit von bestimmten HPA-3 Alloantikörpern gegenüber desialyliertem α IIB.	126
Abb. 4.33: Immunchemische Analyse von monoklonalen Antikörpern und HPA-3a Alloantikörpern demonstriert Antikörperspezifität gegen die α IIB-Untereinheit oder den α IIB β 3-Komplex.	128
Abb. 4.34: HPA-3 Alloantikörper können mit kryokonservierten Plättchen besser nachgewiesen werden.	129
Abb. 4.35: HPA-3a Alloantikörper lassen sich mit gereinigtem α IIB β 3 (HPA-3aa) Protein in der Surface Plasmon Resonance (SPR) Technologie nicht detektieren.	131
Abb. 5.1: Evolutionäre Verwandtschaft der HPA-1 Allele	136
Tab. 1.1: Überblick über Alloantigene nach HPA-Nomenklatur.	4
Tab. 1.2: Antikörperspezifitäten in serologisch verifizierten FNAIT Fällen (Gießen, 1987 to 2002, n = 569).	9
Tab. 2.1: Primer	40
Tab. 4.1: Relative Expression der FcRn messenger RNA aus Monozyten von VNTR3/3 homozygoten Individuen ist signifikant 1.66 fach höher als die von VNTR2/3 Individuen.	74
Tab. 4.2: Frequenzen der VNTR2 und VNTR3 Allele in einer Normalpopulation und der FNAIT sind ähnlich.	79
Tab. 4.3: Bindungsparameter von rhu mAK CamTran007 und 19-7 gegen HPA-1a aus Insektenzellen sind ähnlich.	86

Tab. 4.4: Darstellung der β 3-Val33 Reaktivität der HPA-1a Alloantikörper von 40 FNAIT Patienten und ihrer klinischen Blutungsneigung.	90
Tab. 4.5: Reaktionen von FNAIT HPA-1 Alloantikörpern im PAIFT, MAIPA Assay und SPR.	98
Tab. 4.6: Klinische Daten von Patienten mit anti-HPA-1a und anti-HPA-1b induzierter FNAIT.	99
Tab. 4.7: Serologischer Nachweis von HPA-1 Alloantikörpern in FNAIT Verdachtsfällen durch anti-HPA-1a.	101
Tab. 4.8: Minimale Thrombozytenzahl von FNAIT und PTP Patienten mit Darstellung der Antikörperreaktivität im MAIPA Assay, SPR-Verfahren und alloantikörpervermittelten Wirkung auf die Elimination humaner Plättchen in <i>NOD/SCID</i> Mäusen.	109
Tab. 4.9: Reaktionen von PTP HPA-1a Alloantikörpern im MAIPA, PAIFT und SPR.	112
Tab. 4.10: Klinische Daten der FNAIT und PTP Fälle durch anti-HPA-3a und -3b Antikörper.	115
Tab. 4.11: Serologische Beobachtungen mit anti-HPA-3a und anti-HPA-3b Alloantikörpern.	122
Tab. 4.12: Serologische Verifizierung von HPA-3 Alloantikörpern in 2 FNAIT Fällen mit frischen Plättchen.	130
Tab. 10.1: Seren von FNAIT und PTP Patienten mit anti-HPA-1a, -1b, -3a, -3b und AITP Patienten mit anti- α IIb β 3.	181-82
Tab. 10.2: Identifikationsnummern der DNA Proben von Feten und Neugeborenen.	183

1 Einleitung

1.1 Funktion humaner Blutplättchen

Humane Blutplättchen (Thrombozyten) sind kernlose Plasmafragmente von Knochenmarksriesenzellen (Megakaryozyten), die eine wichtige Rolle in der primären Hämöstatose spielen. Ihre wesentliche Funktion besteht in der schnellen Adhäsion an endotheliale und subendotheliale Strukturdefekte der Gefäßwand. Durch die nachfolgende Aggregation weiterer Blutplättchen kommt es zur primären Blutstillung (Shattil et al., 1998). Die Interaktion der Blutplättchen mit dem Gefäßendothel und untereinander wird über Mediator-Substanzen, z.B. Thrombin (Detwiler and McGowan, 1985), von Willebrand-Faktor (De Marco et al., 1986; Ruggeri and Zimmerman, 1987), Fibrinogen (Ruoslahti and Pierschbacher, 1987), Fibronectin (Ruoslahti and Pierschbacher, 1987) und Adhäsivproteine, aus dem Blutplasma oder anderen beteiligten Zellen, vermittelt. Diese entfalten ihre Wirkung bevorzugt an Rezeptormolekülen auf der Oberfläche der Thrombozyten. Hierbei handelt es sich um verschiedene, zu Komplexen zusammengelagerte Glykoproteine (GP) (Kunicki, 1989; Nurden, 2007; Shattil and Newman, 2004). Für die Adhäsion und Aggregation sind insbesondere die GP-Komplexe Ib/IX (Ruggeri and Zimmerman, 1987), IIb/IIIa (α IIb β 3 Integrin) (Pytela et al., 1986), Ia/IIa (α 2 β 1 Integrin) (Nieuwenhuis et al., 1985) und VI (Patil et al., 2001) von Bedeutung. Einige dieser Glykoproteine tragen antigene Determinanten, welche von anti-thrombozytären Antikörpern als immunogen erkannt werden (s. Abb. 1.1).

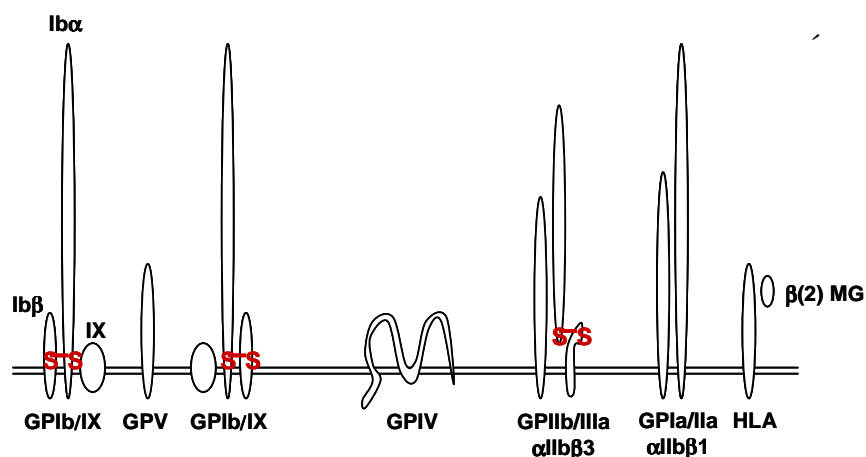


Abb. 1.1: Schematische Darstellung thrombozytärer Glykoproteine mit Relevanz in immunologisch bedingten Thrombozytopenien.

Abb. modifiziert aus <http://www-tmed.med.uni-rostock.de/bielit04.html>

Eine Immunreaktion gegen thrombozytäre Strukturen setzt voraus, dass diese als „fremd“ erkannt und mit einer Immunantwort beantwortet werden. Die Immunantwort besteht in einer Aktivierung des humoralen und des zellulären Arms des Immunsystems. Als Folge der Aktivierung der humoralen Immunantwort werden plättchenreaktive Antikörper gebildet. Ihre Rolle in der Pathogenese von Immunthrombozytopenien ist unbestritten (Santoso and Kiefel, 2001). Die Bedeutung der zellulären Immunantwort ist bisher weitgehend unklar.

Thrombozyten unterliegen nach Bindung von plättchenreaktiven Alloantikörper einem vermehrten und beschleunigten Abbau durch das retikuloendoplasmatische System (RES). Eine in Folge auftretende Verminderung der Thrombozytenzahl (Thrombozytopenie) verursacht eine gesteigerte Blutungsneigung, die sich klinisch individuell verschieden, in Hautblutungen (Petechien, Hämatome, Sugillationen), aber auch Blutungen der inneren Organe manifestieren kann (Shulman et al., 1964).

Neben einer Immunthrombozytopenie können plättchenreaktive Antikörper möglicherweise auch die Funktion (qualitativ) und/oder die Oberflächenexpression (quantitativ) von Plättchenglykoproteinen verändern und damit die Thrombozytenfunktion beeinträchtigen (Thrombozytopathie) (Bithell et al., 1972; van Leeuwen et al., 1981).

1.2 Humane plättchenspezifische Alloantigene

Als Plättchenalloantigene werden polymorphe, erbliche Strukturen auf normalen Blutplättchen bezeichnet, die nach ihrer Übertragung auf ein genetisch verschiedenes Individuum derselben Spezies zur Bildung von spezifischen Antikörpern (Alloantikörpern) führen können. Diese Immunisierung kann während einer Schwangerschaft oder nach Thrombozytentransfusionen, selten auch nach Transplantationen erfolgen (Warkentin and Smith, 1997). Daher sind thrombozytäre Alloantigene von großer transfusionsmedizinischer Bedeutung.

Einige Alloantigene haben die Thrombozyten mit den Erythrozyten und den Leukozyten gemeinsam.

Die ABH Blutgruppenantigene sind mittlerweile zweifelsfrei auf den Glykoproteinen Ib, IIIa, IIb, IV, V, dem thrombozytären Zelladhäsionsmolekül PECAM-1 und dem Phosphoinositol (PI)-verankertem CD109 nachgewiesen (Hou et al., 1996; Kelton et al., 1998; Mollicone et al., 1988; Ogasawara et al., 1993; Santoso et al., 1991; Santoso et al., 1993c; Stockelberg et al., 1996). ABH-Antigene sind im Allgemeinen nur in geringer Dichte auf den Thrombozyten

exprimiert, obwohl einige Individuen als Hochexprimierer von Antigen A und B, insbesondere auf GPIIb und PECAM-1, identifiziert wurden (Curtis et al., 2000). Solche interindividuellen Schwankungen in der ABH Expression können in seltenen Fällen Ursache für das Ausbleiben eines postransfusionellen Thrombozytenanstiegs sein (Cooling et al., 2005; Curtis and Aster, 2006).

Neben den Erythrozytenantigenen sind die HLA- (Human Leukocyte Antigen-) Merkmale des A- und B-Locus („HLA Klasse I-Antigene“) integraler Bestandteil der Thrombozytenmembran (Santoso et al., 1993a; Santoso et al., 1986). Diese HLA-Antigene sind in sehr hoher Dichte exprimiert, unterliegen jedoch einer auffällig hohen interindividuellen Schwankungsbreite. Die Genprodukte des HLA-C Locus („HLA Klasse II-Antigene“) sind nur in geringer Dichte nachweisbar (Duquesnoy et al., 1977; Mueller-Eckhardt et al., 1980). HLA-A- und B-Merkmale besitzen eine große klinische Bedeutung im Rahmen der Thrombozytentransfusion.

Als „plättchenspezifische“ Antigene werden immunogene Varianten (Polymorphismen) der Membranglykoproteine (GPs) GPIa/IIa ($\alpha 2\beta 1$ Integrin), GPIIb/IIIa ($\alpha \text{IIb}\beta 3$ Integrin), GPIb/IX und CD109 bezeichnet (Santoso and Kiefel, 2001). Von diesen Antigenen wurde ursprünglich angenommen, dass sie ausschließlich auf Thrombozyten bzw. Megakaryozyten exprimiert werden. Mittlerweile ist bekannt, dass einige dieser Antigene auch auf Rezeptormolekülen vorkommen, die bei der Interaktion von zellulären Membranstrukturen mit ihrer Matrix eine Rolle spielen und die unter dem Begriff Integrine zusammengefasst werden. So wurden auf der Integrin $\beta 3$ (GPIIIa) Untereinheit lokalisierte Plättchenalloantigene auch auf Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten entdeckt (Giltay et al., 1989). Ebenso werden Antigene der $\alpha 2$ Integrin (GPIa) Untereinheit auch auf langzeitaktivierten T-Lymphozyten und Endothelzellen exprimiert (Giltay et al., 1990; Santoso et al., 1989). Lediglich die auf der αIIb Integrin (GPIIb) Untereinheit (Giltay et al., 1988) und auf der GPIb Untereinheit vorhandenen Antigene scheinen für Thrombozyten spezifisch zu sein. Trotz dieser Einschränkung wurde die Bezeichnung plättchenspezifische Antigene jedoch beibehalten.

Historisch erhielten die plättchenspezifischen Antigene ihre Bezeichnung anhand der Namen von Patienten, von denen die Antiseren erstmals gewonnen wurden. Da die zunehmende Mehrfachbenennung identischer Antigene (z.B. Zw und Pl; s. Tab. 1.1) einige Schwierigkeiten verursachte, wurde eine neue Nomenklatur, das HPA (Humane Plättchenalloantigene) System, eingeführt (von dem Borne and Decary, 1990).

Im HPA-System sind alle bekannten Antigenensysteme chronologisch nach ihrer Erstentdeckung beziffert worden. Die allelischen Antigene eines Systems werden alphabetisch, dabei zuerst das hochfrequente Allel (= a), danach das weniger frequente Allel (= b), benannt. Der gegenwärtigen Nomenklatur wird die Molekulargenetik der Plättchenalloantigene zugrundegelegt (Metcalf et al., 2003).

Tab. 1.1: Überblick über Alloantigene nach HPA-Nomenklatur. (Metcalf et al., 2003)

Antigen	Synonym	Glykoprotein	HGNC	Nukleotid-Substitution	Aminosäure-Substitution
HPA-1a	Zw ^a , Pl ^{A1}	GPIIIa	ITGB3	T176	Leu33
HPA-1b	Zw ^b , Pl ^{A2}			C176	Pro33
HPA-2a	Ko ^b	GPIb α	GP1BA	C482	Thr145
HPA-2b	Ko ^a , Sib ^a			T482	Met145
HPA-3a	Bak ^a , Lek ^a	GPIIb	ITGA2B	T2621	Ile843
HPA-3b	Bak ^b			G2621	Ser843
HPA-4a	Yuk ^b , Pen ^a	GPIIIa	ITGB3	G506	Arg143
HPA-4b	Yuk ^a , Pen ^b			A506	Gln143
HPA-5a	Br ^b , Zav ^b	GPIa	ITGA2	G1600	Glu505
HPA-5b	Br ^a , Zav ^a , Hc ^a			A1600	Lys505
HPA-6w	Ca ^a , Tu ^a	GPIIIa	ITGB3	1544G > A	Arg489Gln
HPA-7w	Mo ^a	GPIIIa	ITGB3	1297C > G	Pro407Ala
HPA-8w	Sr ^a	GPIIIa	ITGB3	1984C > T	Arg636Cys
HPA-9w	Max ^a	GPIIb	ITGA2B	2602G > A	Val837Met
HPA-10w	La ^a	GPIIIa	ITGB3	263G > A	Arg62Gln
HPA-11w	Gro ^a	GPIIIa	ITGB3	1976G > A	Arg633His
HPA-12w	Iy ^a	GPIb β	GP1BB	119G > A	Gly15Glu
HPA-13w	Sit ^a	GPIa	ITGA2	2483C > T	Thr799Met
HPA-14w	Oe ^a	GPIIIa	ITGB3	1909_1911delAAG	Lys611del
HPA-15a	Gov ^b	CD109	CD109	C2108	Ser682
HPA-15b	Gov ^a			A2108	Tyr2108
HPA-16w	Duv ^a	GPIIIa	ITGB3	497C > T	Thr140Ile

HGNC = Human Gene Nomenclature Committee

Bisher wurden sechs diallelische Alloantigen-Systeme (HPA 1 - 5, und -15) und zehn selten frequente Alloantigene („private antigens“), die nur in einzelnen Fällen klinisch in Erscheinung traten, beschrieben. Die meisten dieser Polymorphismen kommen durch Punktmutationen (Einzelnukleotidpolymorphismen, Single Nucleotid Polymorphism HSNP) auf DNA-Ebene zustande, welche durch einen entsprechenden Aminosäureaustausch in den

betroffenen Glykoproteinen deren tertiäre Strukturen verändern und somit neue immunogene Strukturen bilden. Nur HPA-14w wird durch eine Aminosäuredeletion (Lys611) des β 3-Integrins gebildet (Santoso et al., 2002). Alle bisher bekannten Systeme zeigen große Frequenzunterschiede zwischen den einzelnen ethnischen Gruppen (Castro et al., 2007; Randen et al., 2003). Zwei Systeme zeichnen sich dadurch aus, dass sie jeweils nur bei Kaukasiern (HPA-1) oder Asiaten (HPA-4) polymorph sind (Shih et al., 2003). Alle plättchenspezifischen Alloantigene werden wie auch die ABH- und HLA-Klasse I Antigene autosomal-kodominant vererbt.

1.3 Klinische Bedeutung von plättchenspezifischen Alloantigenen

Plättchenspezifische Antigene und gegen sie gerichtete Antikörper spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese von drei immunologisch bedingten Alloimmunthrombozytopenien:

i) Refraktärzustand gegen Thrombozytentransfusionen (PTR) ii) posttransfusionelle Purpura (PTP) und iii) fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT).

1.3.1 Refraktärzustand gegen Thrombozytentransfusionen

Für den immunologisch bedingten Refraktärzustand gegenüber unausgewählten Thrombozytentransfusionen (PTR), d.h. das fehlende Ansteigen der Thrombozytenzahl nach erfolgter Transfusion, sind vor allem Alloantikörper gegen HLA-Klasse I-Antikörper klinisch relevant (Warkentin and Smith, 1997). Plättchenspezifische Alloantikörper, die mit HLA-Antikörpern oder auch alleine auftreten können, werden in lediglich 8 - 10 % der Fälle mit Refraktärzustand beobachtet (Kiefel et al., 2001). In der Mehrheit der Fälle sind die Antigene HPA-1a (Pappalardo et al., 2001), HPA-1b und HPA-5b involviert (Kiefel et al., 2001; Novotny et al., 1995). In der therapeutischen Konsequenz werden HLA-kompatible Thrombozyten substituiert (Rebulla, 2005).

1.3.2 Posttransfusionelle Purpura

Die PTP ist eine sehr seltene, aber schwere Transfusionsreaktion, welche 7 – 10 Tage nach erfolgter Transfusion von Thrombozytenkonzentraten zu einem plötzlichen Abfall der Thrombozytenzahl führen kann. Diese Erkrankung tritt in über 95 % aller Fälle bei Frauen mittlerem bis höherem Lebensalters auf, die sich zuvor durch eine Schwangerschaft

immunisiert haben (Kroll et al., 1993; Mueller-Eckhardt, 1986). Bei Männern sind Bluttransfusionen vorangegangen. Die Dauer dieser immunologisch vermittelten Thrombozytopenie ist normalerweise auf 5 bis 60 Tage beschränkt. Obwohl die autologen Plättchen der Patienten das korrespondierende Antigen nicht tragen, unterliegen sie einem beschleunigten Abbau.

Das Risiko einer PTP besteht bei einer von 50.000 Transfusionen, ist aber heutzutage durch die Gabe von nahezu leukozytenfreien Blutprodukten sehr gering (Williamson et al., 2000). Eine PTP ist nahezu immer mit sehr schweren Blutungskomplikationen assoziiert (Mueller-Eckhardt, 1986). Als Therapie der Wahl gilt die intravenöse (IV) Gabe von hohen Dosen Immunglobulin (Ig) (2 x 1 g/kg Körpergewicht oder 5 x 0.4 g/kg Körpergewicht). Damit lässt sich in etwa 70 - 80 % der Fälle die Thrombozytenzahl innerhalb weniger Tage normalisieren (Mueller-Eckhardt and Kiefel, 1988).

Die plättchenreaktiven Alloantikörper richten sich in der Mehrzahl der Fälle gegen das Alloantigen HPA-1a (90 %) (Mueller-Eckhardt, 1986; Shulman et al., 1961), Spezifitäten gegen HPA-1b (Chapman et al., 1987; Taaning et al., 1985), -2b (Lucas et al., 1997), -3a (Keimowitz et al., 1986; Wautier et al., 1984), -3b (Kickler et al., 1986), 4b (Kiefel et al., 1989b) und 5b (Anolik et al., 2001; Christie et al., 1991) werden jedoch auch beobachtet.

Die posttransfusionelle Purpura wurde zwar bereits 1961 erstmals beschrieben (Shulman et al., 1961), jedoch ist ihre Pathogenese bis heute umstritten (Warkentin and Smith, 1997).

Es wurde von einigen Autoren die Annahme geäußert, dass zirkulierendes HPA-1a Antigen aus den Thrombozyten des immunisierenden Blutproduktes persistieren und Antigen-Antikörper Komplexe an die autologen Thrombozyten adsorbiert werden (Shulman et al., 1961). Die Alloimmunreaktion ist krankheitsauslösend, da bei nahezu allen Patienten mit PTP eine dokumentierte Exposition gegenüber dem thrombozytären Alloantigen während Bluttransfusionen bei früheren Schwangerschaften vorliegt.

In einer anderen Hypothese wird davon ausgegangen, dass lösliches transfundiertes Alloantigen im Plasma oder Thrombozytenfragmente nach der Transfusion an autologe Plättchen adsorbiert werden und nachfolgend eine Alloantikörperbildung induzieren (Kickler et al., 1986).

Mueller-Eckhardt und Kollegen haben postuliert, dass während der sekundären, anamnestischen Immunisierung, die eine PTP verursacht, ein zweiter autoreaktiver Antikörper gebildet wird, welcher für die Immunthrombozytopenie des Patienten verantwortlich ist (Mueller-Eckhardt, 1986). In Übereinstimmung mit dieser letzten These ist die Beobachtung,

dass in der Mehrzahl der untersuchten Fälle aus den autologen (und alloantigennegativen) Plättchen autoreaktive Alloantikörper eluiert werden können (Kiefel et al., 2005). Es ist daher denkbar, dass dieser pseudospezifische Alloantikörper über einen begrenzten Zeitraum mit einem strukturell verwandten Epitop auf den autologen Thrombozyten der Patienten reagiert.

1.3.3 Fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie

Bei der FNAIT handelt es sich um eine fetomaternale Inkompatibilität zwischen Mutter und Kind (Kaplan, 2002, 2007; Warkentin and Smith, 1997). Mütter, die ein bestimmtes erbliches Plättchenantigen nicht besitzen, können während der Schwangerschaft durch Thrombozyten ihres Kindes, welche das der Mutter fehlende Antigen vom Vater geerbt haben, immunisiert werden. Die maternalen IgG Antikörper werden über die Plazenta übertragen und führen in der fetalen Zirkulation zur beschleunigten Elimination von Thrombozyten. Daraus resultiert eine Thrombozytopenie des Feten und Neugeborenen, die sich in einer individuell ausgeprägten Blutungsneigung manifestieren kann. Die Pathogenese der FNAIT entspricht der durch Rhesusantikörper ausgelösten hämolytischen Neugeborenenenerkrankung (HNK), jedoch sind bei der FNAIT schon in über 50 % der Fälle die Erstgeborenen von der Erkrankung betroffen (Durand-Zaleski et al., 1996; Murphy and Williamson, 2000). Die FNAIT hat eine Inzidenz von ca. 1 auf 1000 bis 2000 Neugeborenen (Kjeldsen-Kragh et al., 2007; Williamson et al., 1998).

Das klinische Bild einer FNAIT ist typisch. Eine gesunde Mutter bringt ein thrombozytopenisches Kind zur Welt, das Zeichen einer verstärkten Blutungsneigung mit Petechien, Hautblutungen, gelegentlich auch Blutungen aus Körperöffnungen und inneren Organen aufweist. Als schwerste Komplikation können beim Neugeborenen Hirnblutungen auftreten, deren Folge Blindheit, geistige und körperliche Behinderung und der Tod sein können (Mueller-Eckhardt et al., 1989; Reznikoff-Etievant et al., 1988).

Die optimale Therapie besteht in der Substitution von kompatiblen Thrombozyten (Murphy and Bussel, 2007). Diese können von der Mutter durch Thrombozytenapherese oder von Fremdspendern gewonnen werden. Falls ein kompatibler Thrombozytenersatz jedoch nicht sofort möglich ist, können nach den Daten einer neuen Studie auch inkompatible Thrombozytenpräparate eingesetzt werden (Kiefel et al., 2006). Über die therapeutische Dosis von IV Ig besteht Uneinigkeit (Berkowitz et al., 2006; Murphy and Bussel, 2007).

Eine Alloimmunisierung gegen HPA-1a ist am häufigsten an der Pathogenese einer FNAIT in der kaukasischen Bevölkerung beteiligt und für ca. 75 % aller serologisch verifizierten Fälle

verantwortlich (Kroll et al., 2005b). In 7 – 26 % aller Fälle werden Hirnblutungen beobachtet (Muller et al., 1985; Spencer and Burrows, 2001), von denen die Hälfte schon intrauterin auftritt (Mueller-Eckhardt et al., 1989). Diese enden in einem Drittel der Fälle letal (Spencer and Burrows, 2001). Bisher sind die Faktoren, die das Entstehen einer schweren Blutungskomplikation begünstigen, umstritten. Einige Autoren haben eine Korrelation zwischen der maternalen Antikörperkonzentration und der Schwere der Thrombozytopenie gefunden (Bertrand et al., 2006; Jaegtvik et al., 2000; Killie et al., 2007; Williamson et al., 1998). Jedoch gibt die Thrombozytenzahl des Kindes allein nur unzureichende Hinweise auf das zu erwartende Blutungsrisiko. Sie ist zudem nur mit invasiven Maßnahmen zu bestimmen (Birchall et al., 2003). Jüngst publizierte Daten der bislang größten prospektiven Studie mit 100.448 unselektierten Schwangeren indizieren, dass der Schweregrad eines vorangegangenen Kindes keinen Rückschluss auf die Schwere der Thrombozytopenie in Folgeschwangerschaften zulässt (Kjeldsen-Kragh et al., 2007). Entgegen der bisherigen Annahme (Birchall et al., 2003) treten schwere Blutungskomplikationen in der ersten Schwangerschaft mit derselben Häufigkeit auf wie in der Folgeschwangerschaft. Daher sind sensitive maternale Parameter für die Pränataldiagnostik unerlässlich.

Das Plättchenalloantigen HPA-5b ist in ca. 15 % aller FNAIT Fälle involviert und meistens mit einer sehr milden Blutungsneigung assoziiert (Kaplan et al., 1991). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Epitop- und/oder Antigenspezifität der Alloantikörper in engem Zusammenhang zur Blutungsneigung stehen.

Eine durch HPA-3a Inkompatibilität induzierte FNAIT, welche für 1 – 2 % aller Fälle verantwortlich ist, verursacht in der Mehrheit der Fälle eine sehr schwere Thrombozytopenie (Glade-Bender et al., 2001). Die Frequenz aller anderen Alloantikörper ist zu gering, um ihre Relevanz auf den klinischen Verlauf der FNAIT zu beurteilen (Ertel et al., 2005; Kroll et al., 2005b). Neuen Erkenntnissen zufolge könnte das Antigen HPA-9w von Bedeutung in der FNAIT sein (Kaplan et al., 2005; Peterson et al., 2005).

Häufig werden während einer Schwangerschaft auch HLA-Antikörper gebildet, deren pathologische Relevanz unklar ist (Taaning, 2000).

In der Tabelle 1.2 sind alle Antikörperspezifitäten, die während der vergangenen Jahre im Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin/Gießen nachgewiesen wurden, zusammengefasst (Kroll et al., 2005b).

Tab. 1.2: Antikörperspezifitäten in serologisch verifizierten FNAIT Fällen (Gießen, 1987 to 2002, n = 569). (Kroll et al., 2005b)

HPA-	N	Prozent	HPA-	Anzahl
1a	428	75.1	5a	2
5b	101	17.7	8w	1 (+1*)
1a+5b	13	2.3	11w	1
3a	10	1.8	12w	1
1b	3		13w	2
2b	3		14w	1
4b	1		15b	2

* Ein zusätzlicher Fall durch anti-HPA-8w ohne klinische FNAIT wurde beobachtet

1.4 Pathogenese der fetalen und neonatalen Alloimmunthrombozytopenie

1.4.1 Humorale Immunantwort in der FNAIT

Eine Neugeborenthrombozytopenie bei der FNAIT ist die Folge einer raschen Elimination von fetalen Thrombozyten, an welche maternale Alloantikörper gebunden sind.

Der wichtigste Mechanismus besteht darin, dass Alloantikörper mit ihren Bindungsstellen für Antigene direkt an ihre korrespondierenden Plättchenalloantigene binden. Tritt keine oder nur eine unvollständige Komplementaktivierung ein, werden die sensibilisierten Thrombozyten über Fc-Rezeptoren des retikuloendothelialen Systems (RES) aus der Blutbahn eliminiert (Harrington et al., 1953; Shulman et al., 1964).

Wird durch die Bindung von Antikörpern an ihre Epitope die Aktivierung der klassischen Komplementkaskade ausgelöst (Loos, 1982; Roos and Daha, 2002), können Blutplättchen bereits intravasal durch den Membranangriffskomplex C5b-9 zerstört werden. Die Kaskade wird durch Interaktion von C1 mit dem zellgebundenen Antigen-Antikörper-Komplex ausgelöst. C1 besteht strukturell und funktionell aus zwei Bausteinen, dem C1q Protein und einem Tetramer aus je 2 C1r- und C1s-Molekülen. Über die Bindung der C1q Untereinheit an den Antikörper kommt es zu einer Konformationsänderung des C1-Komplexes und nachfolgend zur katalytischen Aktivität der Proteasen C1s und C1r, die den weiteren Reaktionsweg der Komplementaktivierung über den klassischen Weg einleitet (Kishore and Reid, 2000) (s. Abb. 1.2.)

In vitro führt Komplementaktivierung zur Phagozytose (McMillan et al., 1974), Veränderungen der Plättchenmorphologie (Clancy et al., 1972; Zahavi and Marder, 1974), Plättchenlyse (Aster and Enright, 1969) und Serotoninfreisetzung (Cines and Schreiber, 1979).

Gesicherte Befunde für einen solchen Pathomechanismus bei einer Alloimmunthrombozytopenie gibt es bis heute nicht. Einige Studien konnten *in vitro* eine Komplementbindung durch plättchenreaktive Antikörper nachweisen, in der Mehrheit der Fälle für Medikament-abhängige Antikörper (Kiefel et al., 1989a) und für plättchenreaktive Autoantikörper (Kiefel et al., 1989a; Kurata et al., 1985). Eine Komplementfixierung durch plättchenreaktive Alloantikörper ist dagegen sehr selten und wurde bisher nur für HPA-1a Alloantikörper, die eine PTP verursacht haben, beobachtet (Cines and Schreiber, 1979; Schreiber et al., 1979; Tsubakio et al., 1986).

Komplementsystem

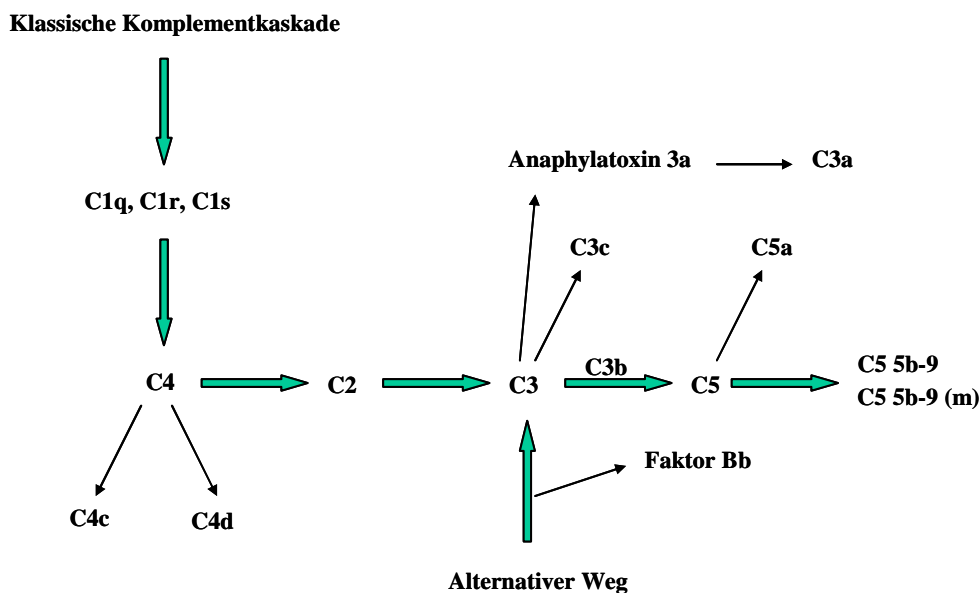


Abb. 1.2: Komponenten und Aktivierungswege des Komplementsystems. Die grünen Pfeile charakterisieren die Bildung nachfolgender Komponenten, während die schmalen Pfeile den Zerfall einer Komponente in seine Spaltprodukte verdeutlichen. C5b-9 ist der terminale Komplex, der nach Bildung an Zielzellen als membrangebundener Komplex C5b-9(m) diese direkt durch Zellyse zerstören kann. Der Faktor Bb ist eine Serinprotease und das aktive Enzym der C3 und C5 Konvertase.

1.4.2 Zelluläre Immunantwort in der FNAIT

Während die humorale Immunantwort bei einer fetomaternalen Inkompatibilität gut charakterisiert ist, ist die Bedeutung des zellulären Immunsystems bis heute unklar.

Die HPA-1a Immunisierung zeigt eine sehr starke Assoziation zum HLA-DR52a (DRB3*0101) Allel (Braud et al., 1994; Maslanka et al., 1996; Williamson et al., 1998). Neueste Daten einer norwegischen Studie mit 100.448 unselektierten Schwangeren zeigen,

dass die HLA-DR52a Typisierung die Identifizierung von Risikoschwangerschaften in der Pränataldiagnostik erleichtert (Kjeldsen-Kragh et al., 2007).

Im Fall einer HPA-1b homozygoten (β 3-Pro33) Mutter, deren Kind in vorangegangener Schwangerschaft von einer FNAIT betroffen war, wurde eine T-Zellaktivierung durch GPIIIa Peptide der β 3-Leu33 Isoform nachgewiesen (Maslanka et al., 1996). Diese Beobachtung deutet auf eine Rolle von T-Lymphozyten in der Pathogenese von Alloimmunthrombozytopenien hin.

Wu und Mitarbeiter konnten zeigen (Wu et al., 1997), dass ein β 3-Leu33 Peptid (As Rest 24-45) an lösliches, rekombinantes HLA-DRB3*0101 bindet, ein β 3-Pro33 Peptid hingegen nicht. Dendritische Zellen (DCs) sind potente antigenpräsentierende Zellen (APC), die vermutlich während einer HPA-1a Immunisierung das β 3-Leu33 Antigen prozessieren und zur Präsentation CD4 positiver T-Helferzellen exprimieren. Eine Aktivierung von T-Helferzellen initiiert dann die Induktion der Differenzierung von B-Lymphozyten in Plasmazellen, sowie die Stimulation der Proliferation von naiven B-Lymphozyten und B-Gedächtniszellen mit nachfolgender Antikörpersekretion.

Die Immunantwort bei einer HPA-1b Immunisierung ist hingegen nicht mit einem HLA-Phänotyp assoziiert (Kuijpers et al., 1992).

1.4.3 Diaplazentarer IgG Transport in der FNAIT

Bereits 1892 wurde von Paul Ehrlich überzeugend dargelegt, dass die spezifische Immunität von der Mutter auf das Kind übertragbar ist (Ehrlich, 1892). Neben einem protektivem Effekt kann der maternale IgG Transport auch negative Auswirkungen auf das Neugeborene haben, insbesondere durch die Übertragung von Alloantikörpern gegen Blutzellen (Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten) mit der Folge einer Alloimmunhämolytopenie.

Der IgG-Transport erfolgt während der gesamten Schwangerschaft direkt über die Plazenta (Dancis et al., 1961), besonders ausgeprägt aber erst ab der 26. Schwangerschaftswoche (Gitlin and Biasucci, 1969). Die Ursachen dafür sind unklar. Vermutlich wird der IgG Transfer durch den Zytotrophoblasten, welcher in der frühen Schwangerschaft eine undurchlässige Schicht zwischen dem Synzytiotrophoblasten und dem Stroma bildet, gehemmt (Bright and Ockleford, 1995). Im dritten Trimester der Schwangerschaft wird dieser brüchig, so dass der Synzytiotrophoblast und das Gefäßendothel innerhalb der Plazenta die einzigen Barrieren zwischen dem maternalen Blut und der fetalen Zirkulation darstellen (s. Abb. 1.3).

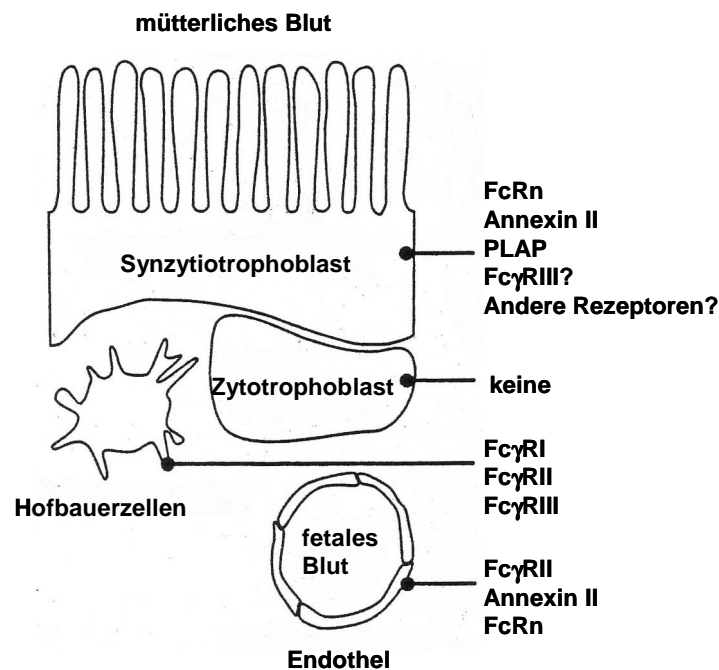


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der IgG bindenden Proteine und Rezeptoren in einer reifen Plazenta. (modifiziert aus (Simister and Story, 1997))

Die Eigensynthese an IgG durch den Feten ist gering (Gitlin and Biasucci, 1969), der Hauptanteil wird von der Mutter auf das Kind übertragen (Linnet-Jepsen et al., 1958).

Über die bevorzugt transportierten IgG Klassen besteht Uneinigkeit. Vermutlich wird IgG1 mit höherer Effizienz als IgG3 und IgG4, und IgG2 übertragen ($\text{IgG1} > \text{IgG3} = \text{IgG4} > \text{IgG2}$) (McNabb et al., 1976; van der Meulen et al., 1980). Der maternale IgG Transfer ist Ig-Subklassen- und Fc-Fragment-spezifisch (Dancis et al., 1961; Gitlin et al., 1964).

Die Bindungsaffinität plazentarer IgG Rezeptoren variiert stark, von geringer ($4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$) (McNabb et al., 1976) bis zu hoher Affinität (bis $4 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$) (Lubega, 1990). Eine maximale IgG Bindung erfolgt bei sauren pH-Werten < 6.5 (Balfour and Jones, 1977; Watabe et al., 1980), obwohl eine Bindung auch bei neutralem pH 7.4 nachgewiesen wurde (Brown and Johnson, 1981; McNabb et al., 1976; Niezgodka et al., 1981).

Bei der fetalen und neonatalen Alloimmunthrombozytopenie werden in seltenen Fällen auch maternale IgM Antikörper gebildet (Mueller-Eckhardt, 1990), für die aber keine plazentaren Transportrezeptoren bekannt sind.

1.4.3.1 Struktur und Funktion plazentarer Fc γ Rezeptoren und IgG bindender Proteine

IgG bindende Proteine und Fc-Rezeptoren der Immunglobulin- (Ig-) Superfamilie befinden sich in nahezu allen Kompartimenten der Plazenta (Kristoffersen, 1996) (s. Abb. 1.3).

Ihre Funktion innerhalb des diaplazentaren IgG Transportes ist jedoch weitgehend unklar. Keines der im Synzytiotrophoblasten exprimierten IgG bindenden Proteine scheint für die maternale IgG Aufnahme geeignet zu sein. Zudem kann IgG aus dem neutralen pH-Milieu des maternalen Blutes nicht gebunden werden.

Simister und Kollegen haben zuerst postuliert, dass das IgG wahrscheinlich durch rezeptorvermittelte Endozytose in den Synzytiotrophoblasten importiert wird (Simister and Story, 1997; Simister et al., 1996).

Dabei konzentriert sich das IgG zunächst in Einstülpungen der Membran, die man *Coated Pits* (umhüllte Grübchen) nennt. Diese schnüren sich als Vesikel von der apikalen Plasmamembran ab und wandern in den Synzytiotrophoblasten. Dort verschmelzen sie mit turbovesikulären Körperchen, den frühen Endosomen. Ihr niedriger pH-Wert (6.0) erleichtert die Freisetzung des IgG. Membrangebundenes IgG wird in basalen Vesikeln zur basolateralen Membran transportiert und in das Stroma abgegeben. Nicht-gebundene Proteine werden in multivesikuläre Vesikel (späte Endosomen) aufgenommen und lysosomal abgebaut.

Auf der apikalen Zellmembran des Synzytiotrophoblasten ist u.a. das plazentare Annexin II (40 KDa) als Heterotetramer exprimiert (Kristoffersen and Matre, 1996b; Matre et al., 1981; Matre et al., 1989). Dieses niedrig-affine IgG Bindeprotein (Matre et al., 1989) ist jedoch mangels transmembranärer und zytoplasmatischer Regionen nicht endozytosefähig (Kristoffersen et al., 1994).

Ebenso besitzt die auf dem Synzytiotrophoblasten lokalisierte alkalische Phosphatase (PLAP) (Sakiyama et al., 1979), ein Glycophosphatidylinositol-(GPI-) verankertes Protein (Makiya et al., 1992), eine sehr geringe Affinität für IgG ($2 \cdot 10^5 - 3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$) (Makiya and Stigbrand, 1992). Die Tatsache, dass die PLAP auch in der trophoblastischen Schicht des Amniochorion gefunden wird (Johnson and Molloy, 1983), welche nachweislich kein IgG aufnimmt (Bright and Ockleford, 1994), spricht gegen eine Funktion im diaplazentaren Transport.

Die Expression von Fc γ RIII (CD16) im Synzytiotrophoblasten ist umstritten (Wainwright and Holmes, 1993). Nur Fc γ RIIIa (Vance et al., 1993) und nicht Fc γ RIIIb (Kurlander and Batker, 1982) kann monomeres IgG mit geringer Affinität ($3 \cdot 10^6 - 1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$) binden. Beide

Fc γ RIII Rezeptorvarianten können IgG2 und IgG4 nicht transportieren (Huizinga et al., 1989; Vance et al., 1993).

Auf dem Endothel der fetalen Blutgefäße exprimiertes Fc γ RII (Kameda et al., 1991; Kristoffersen et al., 1990) führt wahrscheinlich auch zum Abbau von IgG1 und IgG3 Immunkomplexen (Firth and Leach, 1996; Warmerdam et al., 1993). Seine Kapazität reicht jedoch nicht aus, um einen IgG-Transport in die fetale Zirkulation zu verhindern. Parazellulär besteht keine Übergangsmöglichkeit (Bright and Ockleford, 1994; King, 1982; Leach et al., 1991), so dass das IgG auch an dieser Barriere vermutlich über rezeptorvermittelte Endozytose importiert wird.

Eine Transportfunktion für Fc γ RII durch das fetale Endothel wurde gemutmaßt, jedoch spricht seine geringe Affinität für IgG ($2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$) (Karas et al., 1982) gegen eine entscheidende Transportfunktion.

1.4.3.2 Struktur und Funktion des neonatalen Fc Rezeptors

Mittlerweile ist bekannt, dass der diaplazentare IgG Transport hauptsächlich durch den neonatalen Fc Rezeptor (FcRn) vermittelt wird (Antohe et al., 2001; Ellinger et al., 2005; Simister et al., 1996).

Die Erstbeschreibung von FcRn stammt von Jones und Kollegen (Jones and Waldmann, 1972). Sie identifizierten FcRn als das Protein, welches bei Ratten den Transport von maternalen IgG in der Milch durch das Darmepithel zum Neugeborenen vermittelt.

FcRn ist als Rezeptordimer aus zwei verschiedenen Polypeptiden (Rodewald et al., 1983; Simister and Rees, 1985) aufgebaut. Die kleinere Untereinheit (15 KDa) besteht aus β 2-Microglobulin mit den 3 extrazellulären Domänen (α 1 - 3), welche identisch mit der β -Untereinheit der MHC-Klasse I Moleküle sind (Simister and Mostov, 1989). Die größere Untereinheit (50 KDa) ist ein integrales Membranglykoprotein, dessen Sequenz und Domainorganisation ähnlich zur MHC-Klasse I α -Kette ist (Simister and Mostov, 1989). Die Aufklärung der Kristallstruktur bestätigte die Strukturverwandtschaft zu MHC-Klasse I Molekülen (Burmeister et al., 1994b) (s. Abb. 1.4).

Die α -Kette von FcRn ist beim Menschen nicht in einem Cluster mit MHC-Klasse I Genen, sondern auf dem Chromosom 19, im Locus 19q13.3 lokalisiert (Kandil et al., 1996). FcRn gehört in die wachsende Familie von MHC-Klasse I verwandten Proteine, zu denen auch CD1

(Calabi et al., 1987), Zink α 2-Glykoprotein (Ueyama et al., 1991) und MR1 (Riegert et al., 1998; Yamaguchi et al., 1997) zählt.

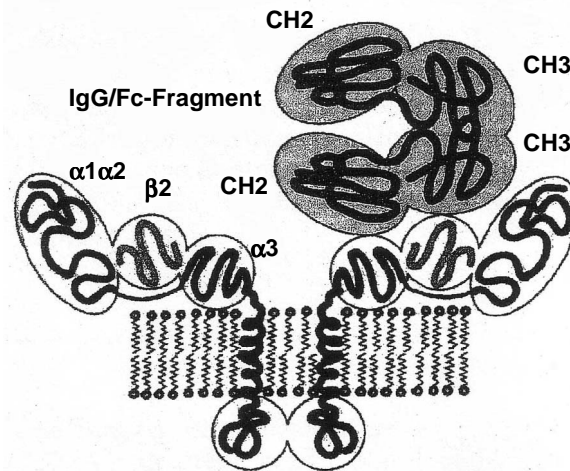


Abb. 1.4: FcRn Rezeptor. (modifiziert aus (Kristoffersen, 1996))

Der MHC-Klasse I ähnliche Rezeptor besteht aus einer schweren Kette, welche mit β 2-Mikroglobulin assoziiert ist. Die schwere Kette setzt sich aus einem cytoplasmatischen, einem transmembranären und drei extrazellulären α -Domänen zusammen. Die Immunglobulinbindung erfolgt nicht in der α 1 α 2 Furche (Burmeister et al., 1994a), sondern an die α 3- und β 2-Mikroglobulin Domäne. FcRn bindet IgG Fc-spezifisch in einer 2:1 Stöchiometrie (Burmeister et al., 1994b).

Die α -Kette des humanen FcRn umfasst sieben Exons und sechs Introns (FCGRT Gen). Die Nukleotidsequenz von humanem FCGRT ist zu dem der Maus 63 % homolog, es wurde keine bedeutende Intronkonservierung vorgefunden (Mikulska et al., 2000). Das FCGRT Gen ist in seiner Anordnung ähnlich zu klassischen und nicht-klassischen MHC-Klasse I Genen, sowie zu MHC-Klasse I verwandten Genen.

FcRn ist ein hoch affiner IgG Rezeptor ($2 \cdot 10^7 - 1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$) (Wallace and Rees, 1980)}(Mackenzie et al., 1983; Rodewald et al., 1983), welcher die *hinge* Region (Interphase zwischen der Fc-CH₂ und -CH₃ Domäne) von Immunglobulinen (Burmeister et al., 1994b) vermutlich als Dimer in einer 2:1 Stöchiometrie (Huber et al., 1993) bei niedrigem pH (pH 6.0) bindet und bei neutralem pH (7.0) wieder freisetzt (Raghavan et al., 1995). Die IgG Bindung erfolgt vermutlich subklassenunabhängig (Burmeister et al., 1994b; Peppard et al., 1985).

Diese Forschungsergebnisse unterstützen die bereits 1966 von Brambell verfasste Hypothese (Brambell, 1966), dass ein gemeinsamer Rezeptor den perinatalen IgG Transport und die IgG Homöostase vermittelt. Tatsächlich, werden dem neonatalen Fc Rezeptor beide Funktionen zugeschrieben (Borvak et al., 1998; Simister et al., 1996).

Mittlerweile wurde FcRn an der Plazentaschranke im Menschen (Kristoffersen and Matre, 1996a; Leach et al., 1996) und einer Vielzahl von adulten Geweben, z.B. Endothelzellen (Borvak et al., 1998) (Cianga et al., 2003; Haymann et al., 2000; Spiekermann et al., 2002), Hepatozyten (Blumberg et al., 1995), Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen (Zhu et al., 2001) nachgewiesen.

In Endothelzellen bindet FcRn das IgG, verhindert dessen Abbau und transportiert es zurück zur Zelloberfläche (Ober et al., 2004; Ward et al., 2003). Diese *in vitro* Beobachtungen wurden eindrucksvoll am Knockout Modell mit Mäusen, denen entweder die β 2-Mikroglobulinkette oder die α -Kette des FcRn Heterodimers fehlt, gezeigt (Junghans and Anderson, 1996; Roopenian et al., 2003). In den Mutanten war der IgG Katabolismus 10-fach schneller mit entsprechend geringeren IgG Spiegeln im Vergleich zum Wild-Typ. Eine weitere Bestätigung für die Relevanz von FcRn in der IgG Homöostase ist darin zu sehen, dass Antikörper anderer Immunglobulin-Klassen (Nicht-IgG), die nicht an FcRn gebunden werden, einer zu IgG-Antikörpern vergleichsweise sehr kurzen Halbwertszeit ($t_{1/2}$) unterliegen (IgG ~ 22 - 23 Tage vs. 1 - 2 Tage) (Spiegelberg and Fishkin, 1972).

FcRn wird auch an der feto-maternalen Plazentaschranke exprimiert (Simister et al., 1996). *In vitro* Studien beweisen seine Relevanz als perinataler IgG Transporter am Beispiel von Trophoblasten-stämmigen BeWo Zellen (Ellinger et al., 2005) und humanen plazentaren Endothelzellen (Antohe et al., 2001). Darüber hinaus wurde die FcRn-Abhängigkeit des plazentaren IgG Transport elegant in einem *ex vivo* Plazentamodell gezeigt (Firan et al., 2001). In diesem wurde durch eine Histidin435Alanin Mutation der FcRn-Bindungsstelle von rekombinanten humanen (rhu) IgG Antikörpern eine vollständige Hemmung des diaplazentaren IgG Transfers beobachtet.

1.5 Diagnostik von Alloimmunthrombozytopenien

Die serologische Diagnose von Alloimmunthrombozytopenien basiert im Wesentlichen auf dem Nachweis der alloantigenspezifischen Antikörper gegen Plättchen im Serum des Patienten. Entsprechend ihrer Pathogenese ist bei der neonatalen Alloimmunthrombozytopenie vor allem eine Untersuchung der Mutter erforderlich. Ein negativer Antikörperbefund im fetalen Serum schließt eine Alloimmunthrombozytopenie nicht aus, da diese an Plättchen adsorbiert und somit aus dem Serum entfernt werden können.

Zur Bestätigung der Diagnose FNAIT muss zudem die fetomaternale Inkompatibilität überprüft werden.

1.5.1 Genotypisierung von plättchenspezifischen Alloantigenen

Heutzutage sind die molekularen Grundlagen aller HPA-Polymorphismen bekannt (Metcalf et al., 2003). Bei Verdacht auf eine alloimmune Zerstörung der fetalen Plättchen werden routinemäßig Genotypisierungen der paternalen und fetalen Plättchen durchgeführt.

In den vergangenen Jahren sind verschiedene PCR-Techniken zur HPA-Typisierung entwickelt worden (Review(Reid, 2003), u.a. die Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)-Analyse (Simsek et al., 1993), die allelspezifische Oligonukleotid-Hybridisierung (ASO) (McFarland et al., 1991), die reverse Dotblot-Hybridisierung (Bray et al., 1994), die Oligonukleotid-Ligation (OLA) (Legler et al., 1996), die Single-Strand Conformation Polymorphismus (SSCP)-Analyse (Peyruchaud et al., 1995), der *preferred* Homoduplex Formation Assay (PHFA) (Fujiwara et al., 1995) und die sequenzspezifische PCR (SSP-PCR) (Kluter et al., 1996; Skogen et al., 1994; Tanaka et al., 1995).

Die SSP-PCR ist die am häufigsten angewandte PCR-Technik (Panzer, 2001). Mittlerweile hat sich in vielen Laboren die TaqMan® Echtzeit-PCR gegenüber einer Standard-SSP-PCR durchgesetzt, da diese eine schnellere und zuverlässigere Genotypisierung ermöglicht (Ficko et al., 2004).

In PCR-basierten Genotypisierungsverfahren können nur bekannte HPA-Polymorphismen nachgewiesen werden. Die auf dem Fluoreszenzresonanz-Energietransfer beruhende Lightcyclertechnik (Kretzschmar et al., 2001; Nauck et al., 1999) ermöglicht auch eine Identifizierung bisher unentdeckter Mutationen.

Gegenwärtige Bemühungen konzentrieren sich auf die Entwicklung von DNA-Mikroarrays (TaqMan basierter allelspezifischer Hybridisierungsassay) (Beiboer et al., 2005; Bugert et al., 2005), um in der Zukunft eine Automatisierung der HPA-Typisierung vornehmen zu können. Referenz-DNA zur Evaluation und Qualitätssicherung dieser Methode ist heutzutage aus lymphoblastoiden Zelllinien von HPA-typisierten Spendern verfügbar (Carl et al., 2000; Kroll et al., 2001). Eine Hochdurchsatz-Genotypisierung wird ein routinemäßiges Pränatalscreening von Schwangeren auf fetomaternale HPA-1 Inkompatibilität erleichtern (Flug et al., 1994). Zudem können größere Spenderkollektive typisiert werden, um bei Transfusionsbedarf betroffenen Neugeborenen HPA-kompatible Thrombozyten bereit zu stellen.

1.5.2 Testverfahren zum Nachweis plättchenspezifischer Alloantikörper

Eine spezifische und sensitive Detektion von plättchenspezifischen Alloantikörpern ist unerlässlich für eine sichere klinische Diagnose und eine adäquate Therapie von Alloimmunthrombozytopenien.

Während der letzten fünf Jahrzehnte wurde eine Vielzahl von Methoden zur Antikörperdetektion entwickelt.

Die ältesten in der Plättchenserologie angewandten Testverfahren (Phase I) beruhen auf der Analyse der Plättchenfunktion nach Inkubation mit Antiseren der Patienten. So werden z.B. in dem Thrombozytenagglutinationstest Plättchenaggregationen untersucht (Dausset and Malinvaud, 1954). Spätere Entwicklungen – die Komplementbindungstests – basieren auf dem Nachweis komplementabhängiger Reaktionen (Colombani et al., 1971; Shulman et al., 1964). Aufgrund ihrer geringen Sensitivität und Spezifität sind diese Testverfahren für die Diagnostik heute praktisch bedeutungslos.

Da sich der spezifische Nachweis von freien Antikörpern im Serum bzw. Plasma als schwierig erwies, wurde zunächst eine Reihe von Testverfahren zum Nachweis von Plättchen-assoziierten IgG (PaIgG) entwickelt. In diesen Phase II Bindungstests können sowohl patienteneigene (Nachweis von plättchenassoziierten Antikörpern), als auch HPA-typisierte Thrombozyten nach Inkubation mit Antiseren (maternal bei FNAIT) über markierte Sekundärantikörper untersucht werden. Die heute gebräuchlichsten Methoden verwenden Sekundärantikörper, die entweder mit Fluoreszenzfarbstoffen (Immunfluoreszenztest) oder Enzymen (Enzymimmuntest) konjugiert sind. Insbesondere der PAIFT (Plättchen-Adhäsions-Immunfluoreszenztest) (Schneider and Schnaidt, 1981; von dem Borne et al., 1978) und der ELISA (Enzym-linked Immunosorbent Assay) (Leporrier et al., 1979) werden als Antikörpersuchmethoden eingesetzt. Der große Nachteil dieser Testverfahren besteht in ihrer geringen Spezifität. Die Diagnose einer FNAIT ist häufig dadurch erschwert, dass im Serum plättchenreaktive Alloantikörper gegen HLA-Klasse I Antigene vorliegen (Taaning, 2000). Ebenso werden von Patienten mit posttransfusioneller Purpura oft hochtitrige HLA-Antikörper gebildet (Mueller-Eckhardt, 1986). Diese können von den plättchenspezifischen Alloantikörpern in diesen Tests nicht diskriminiert werden.

Heutzutage haben sich antigenspezifische Testverfahren (Phase III), z.B. MAIPA (Monoclonal Antibody immobilisation of Platelet Antigens) Assay (Kiefel, 1992; Kiefel et al.,

1987), ACE (Antigen Capture ELISA) (Furihata et al., 1987), MACE (Modified Antigen Capture ELISA) (Menitove et al., 1989), aufgrund ihrer hohen Spezifität und Reproduzierbarkeit zu Referenztechniken in der Plättchenserologie entwickelt. Mittlerweile ermöglicht die Verfügbarkeit rekombinanter CHO-Zelllinien, welche seltene Plättchenalloantigene exprimieren, auch eine Alloantikörperdetektion, wenn korrespondierende Testplättchen fehlen (Kroll et al., 2005b).

In einer hohen Fallzahl von Patienten mit dringendem Verdacht auf eine Alloimmunthrombozytopenie lassen sich jedoch plättchenreaktive Alloantikörper nicht nachweisen. Ein negativer Antikörperbefund im maternalen Serum wird bei einer FNAIT durch HPA-1a Inkompatibilität in schätzungsweise 15 – 25 % aller Fälle beobachtet (Bussel et al., 2005; Mueller-Eckhardt et al., 1989).

Ein großer Nachteil des MAIPA Assay besteht in der Anwendung von selektierten monoklonalen Antikörpern (mAK). Diese können durch kompetitive Hemmung von Humanantikörpern um das gleiche oder benachbarte Epitope falsch negative Testergebnisse hervorrufen (Morel-Kopp et al., 1996).

In den vergangenen Jahren wurden viele neue Applikationen entwickelt, mit dem Ziel die Antikörperdetektion zu optimieren. Einige dieser Testverfahren basieren auf antikörperbeschichteten Partikeln, z.B. BPA (Bead-mediated Assay) (Helmsberg et al., 1997), SASPA (Simultaneous Analysis of Specific Platelet Antibodies) (Nguyen et al., 2004), ASPA (Antigen-specific Particle Assay) (Meyer et al., 2006b), ASCA (Antigen-specific Capture Assay) (Meyer et al., 2006a), welche die plättchenspezifischen Antikörper durchflusszytometrisch (BPA, SASPA) oder in einer Gel-basierten Agglutinationsreaktion (ID-Mikrotypisierungssystem, Zitat) (ASPA, ASCA) nachweisen. Diese bringen jedoch für die Verbesserung der Patientendiagnostik keinen wesentlichen Fortschritt, da auch hier mAK erforderlich sind.

1.6 Integrin α IIb β und humane Plättchenalloantigene

Die Mehrheit der klinisch relevanten humanen Plättchenalloantigene ist auf dem Integrin α IIb β lokalisiert, welches als Fibrinogenrezeptor eine wesentliche Rolle in Zell-Matrix und Zell-Zell Interaktionen spielt (Hynes, 2002). Durch die Bindung von Mediator-Substanzen, welche die RGD-Sequenz beinhalten (Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin, Kollegen, von

Willebrand Faktor) vermittelt $\alpha\text{IIb}\beta_3$ die Plättchenaggregation und -anhaftung an Gefäßwände während der Hämostase und der arteriellen Thrombose.

Das $\alpha\text{IIb}\beta_3$ Integrin (M_r 235 KDa) ist mit 40. - 80.000 Molekülen das Hauptintegrin auf der Plättchenoberfläche, dessen Expressionsdichte sich nach aktivierungsabhängiger Freisetzung des intrazellulären $\alpha\text{IIb}\beta_3$ aus den alpha-Granula noch erhöht (Faull et al., 1994; Vorchheimer et al., 1999).

Die αIIb -Untereinheit (M_r 130 KDa) unterliegt einer postrationalen proteolytischen Spaltung, aus welcher zwei Polypeptidketten hervorgehen, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die schwere αIIbH Kette (M_r 105 KDa) bildet eine extrazelluläre Domäne aus 871 Aminosäuren. Die leichte αIIbL Kette (M_r 23 KDa) beinhaltet ein 111 Aminosäure(AS)-langes transmembranäres Segment und eine 26 AS-lange zytoplasmatische Domäne (Poncz et al., 1987).

Die β_3 -Untereinheit (M_r 95 KDa) ist ein Disulfidbrücken-reiches Einzelpeptid aus 762 AS mit einem transmembranären Segment und einer 45 AS-langen zytoplasmatischen Domäne (Fitzgerald et al., 1987).

Mittlerweile ist die Kristallstruktur von $\alpha\text{IIb}\beta_3$ aufgeklärt worden (Xiao et al., 2004; Xiong et al., 2001; Xiong et al., 2004).

Die αIIb Untereinheit besteht aus 4 Domänen: einer aminoterminalen Domäne mit einem 7-fach-gefalteten (7-bladed) Propeller, einer Immunglobulin (Ig)-ähnlichen „*Thigh*“ Domäne und 2 co-linearen β -*Sandwich* Domänen (Calf-1 und Calf-2).

Die β_3 Untereinheit beinhaltet 8 Domänen: eine aminoterminal PSI (Plexine, Semaphorine, Integrine) Domäne, eine Ig-ähnliche Hybriddomäne, in deren oberen *Loops* die Ligandenbindende αA -ähnliche Domäne (βA) integriert ist. Die Hybriddomäne ist mit 4 dem epidermalen Wachstumsfaktor (EWF) ähnlichen EGF-Domänen verbunden und einer β -zytoplasmatischen Domäne (β -TD) (s. Abb. 1.5A). Ein wesentliches Strukturmerkmal der PSI-Domäne (s. Abb. 1.5B) 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 $\alpha\text{IIb}\beta_3$ Integrin fungiert primär als bidirektionales *Konduit* (Leitung) für *inside-out* und *outside-in* Signaltransduktionsprozesse innerhalb der Plasmamembran (Shattil and Newman,

2004). Die *inside-out* Signalübertragung verändert die α Ib β 3 Konformation und transformiert das Integrin in seinen Liganden-bindenden 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* (Knie) Region erfordert. Dadurch richtet sich das α Ib β 3 Integrin auf und wechselt von seiner gebeugten (inaktive Form) in seine gestreckte Konformation (aktive Form) (s. Abb. 1.5C).

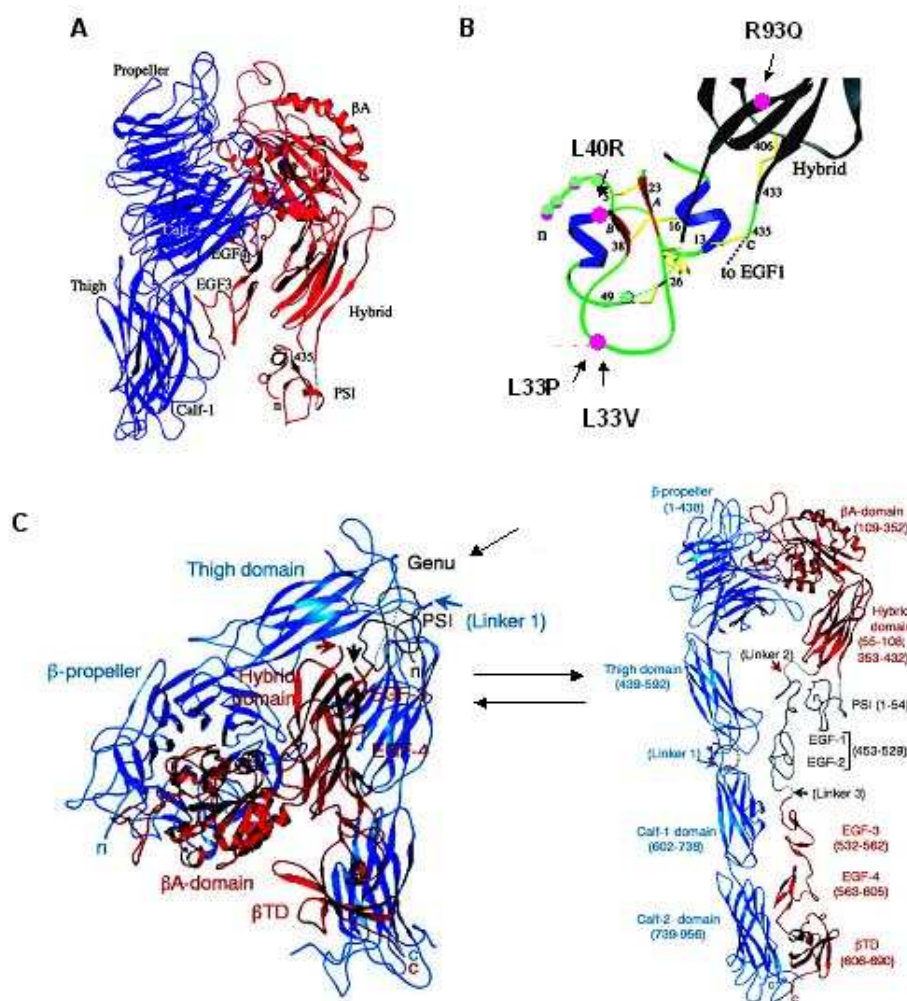


Abb. 1.5: Struktur des α Ib β 3 Integrins.

A. Kristallstruktur der α Ib (blau) und β 3 (rot) Untereinheit mit den einzelnen Domänen.

B. Struktur der PSI-Domäne mit einer zweisträngigen β -Faltblattstruktur (rot), flankiert durch 2 Helices (blau). Die Hybriddomäne ist in der letzten Schleife der PSI-Domäne lokalisiert. Die Position der Leu33Pro Mutation (HPA-1) im AB-Loop der PSI-Domäne und der Arg93Gln Mutation im A'B-Loop der Hybriddomäne sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Disulfidbrücke zwischen Cys₁₃-Cys₄₃₅ bildet die große AB-Schleife zwischen den Strängen der PSI-Domäne (modifiziert von Xiong et al. J Biol Chem 2004).

C. „Switchblade“ Modell der α Ib β 3 Integrinstruktur. In ihrer inaktiven Form bilden die Integrine eine hoch bewegliche Region, das „Genu“ (gekennzeichnet durch Pfeil), welche das Integrin um 135° in seine kompakte, V-förmige Struktur („gebeugte“ Form) beugt. In seiner aktiven Form ist das Integrin am Knie gestreckt und bildet eine mehr lineare Struktur („gestreckte“ 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 β -TD Domäne des $\beta 3$ Integrins auslöst.

Die Identifizierung der einzelnen Domänen der $\alpha IIb\beta 3$ Integrinstruktur ermöglicht die präzise Lokalisierung der humanen Plättchenalloantigene (s. Abb. 1.6).

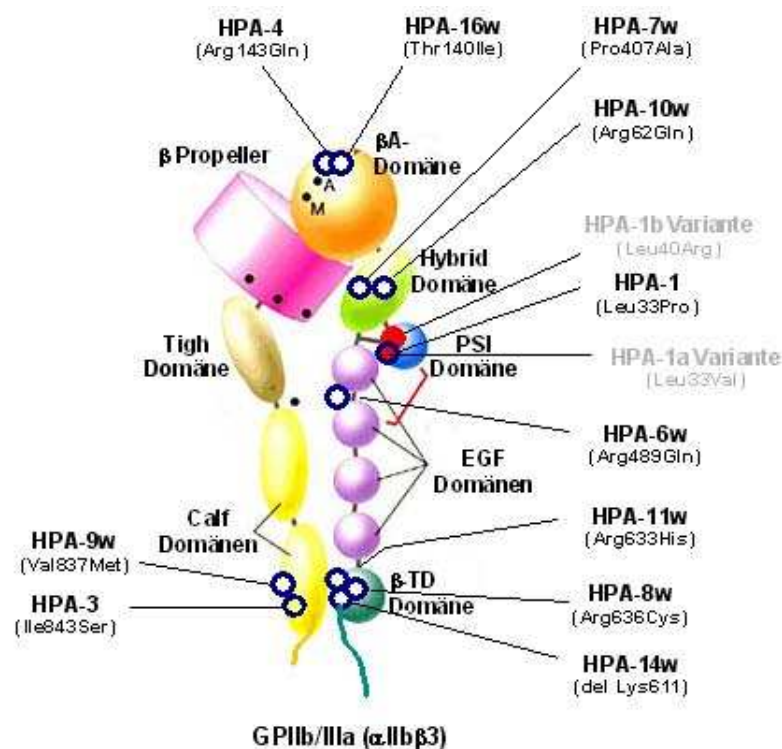


Abb. 1.6: Schemendiagramm natürlich vorkommender Polymorphismen auf dem Integrin $\alpha IIb\beta 3$, welche als immunogene HPAs für die Entstehung einer Alloimmunthrombozytopenie verantwortlich sind.

Grau unterlegt sind zwei neu identifizierte Polymorphismen, die HPA-1b Variante Leu40Arg und die HPA-1a Variante Leu33Val, deren klinische Relevanz bisher unklar ist (modifiziert von Humphries et al. Science 2001).

Die beiden Punktmutationen Ile843Ser (HPA-3) und Val837Met (HPA-9w) der αIIb Untereinheit liegen innerhalb der Calf-2 Domäne.

Für auf der $\beta 3$ Untereinheit befindliche HPAs existiert keine bevorzugte Domäne. Die Plättchenalloantigene HPA-4 und HPA-16w sind in der Liganden-bindenden βA -Domäne lokalisiert. Andere seltene Plättchenalloantigene sind auf der Hybrid-Domäne (HPA-7w, HPA-10w), der EGF-Domäne (HPA-6w) und der β -TD Domäne (HPA-8w, HPA-11w und HPA-14w) zu finden. Die PSI-Domäne beherbergt die Punktmutation Pro33Leu, welche als

HPA-1a und HPA-1b Antigene von hoher klinischer Relevanz sind. Darüber hinaus wurden in dieser Domäne eine neue HPA-1b Variante (Leu40Arg) (Sirotkina et al., 2005) und HPA-1a Variante (Leu33Val) (Santoso et al., 2006) entdeckt. 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 α Ib β 3 Rezeptoraktivität, d.h. die Ligandenbindung, verändern.

Eine funktionelle Studie deutet darauf hin, dass die Punktmutation Pro33 zur erhöhten Affinität des α Ib β 3 Rezeptors an Fibrinogen führt (Vijayan et al., 2000).

Vergangene Untersuchungen zeigten, dass das HPA-1b Allel einen genetischen Risikofaktor für die arterielle Thrombose darstellen kann (Weiss et al., 1996). Eine erhöhte Häufigkeit von HPA-1b Individuen wurde bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) entdeckt. Klinisch epidemiologische Studien ergaben widersprüchliche Befunde (Bray, 1999). Neue Daten einer Metaanalyse mit 3400 Patienten (KHK) fanden nur eine geringfügig erhöhte Inzidenz von HPA-1b Individuen im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv (n = 3500) (Santoso, 2001; Santoso and Kunicki, 2001).

1.7 Heterogenität von plättchenspezifischen alloantigenen Determinanten auf dem α Ib β 3 Integrin

Mittlerweile sind die den HPAs zugrunde liegenden Polymorphismen auf dem Integrin α Ib β 3 gut charakterisiert, dennoch ist sehr wenig über die antigenen Determinanten (Epitope) der Alloantikörper bekannt. Sowohl die dreidimensionale Struktur der Glykoproteine, als auch deren Glykosylierung scheinen für die Expression einiger Alloantikörperepitope bedeutsam zu sein.

1.7.1 Heterogenität von HPA-1 Alloantikörpern

Eine Immunisierung gegen HPA-1a (β -Leu33) ist die häufigste Ursache für das Entstehen einer Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT, PTP). Definiert wird der HPA-1 Dimorphismus (Leu33Pro) durch die Nukleotidsubstitution T176C im ITGB3 Gen, welche in einem Austausch der Aminosäure Leucin (Leu) gegen Prolin (Pro) an der Position 33 des β 3-

Integrins resultiert (Newman et al., 1989). Diese Mutation ist an der Spitze eines langen AB-Loops, welcher von den Cysteinresten Cys26 und Cys38 formiert wird, in der PSI-Domäne lokalisiert (Xiong et al., 2001; Xiong et al., 2004) (s. Abb. 1.5B). Ein Austausch des aliphatischen Leu33 durch das ringförmige Pro33 führt durch Konformationsänderungen zur Bildung der immunogenen HPA-1 Epitope (Goldberger et al., 1991).

In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Versuche unternommen, das HPA-1a Epitop durch synthetische oder rekombinante Peptide darzustellen.

Jedoch blieben alle Bemühungen das HPA-1a Epitop durch kurze lineare oder cyclische Peptide (13-mer Peptid), welche die epitopbildende Sequenz Leu33Pro enthalten, nachzubilden, erfolglos (Flug et al., 1991; Newman et al., 1985).

Einige HPA-1a Alloantikörper erkennen ein aus 66 Aminosäureresten bestehendes rekombinantes allelisches β 3-Protein (Barron-Casella et al., 1994; Bowditch et al., 1992), während andere HPA-1a Antikörper mit diesem Protein nicht reagieren.

Die Daten einiger Studien zeigen, dass für die strukturelle Integrität von HPA-1 Epitopen die Ausbildung einer Disulfidbrücke über einen großen Proteinbereich zwischen den Cysteinresten 13 und 435 erforderlich ist (Beer and Coller, 1989; Honda et al., 1995; Kunicki et al., 1995).

Kürzlich wurde von der Arbeitsgruppe Watkins (Watkins et al., 2002a) eine weitere natürliche Mutation im β 3-Integrin, die an der Position 93 Glutamin (Gln) anstelle von Arginin (Arg) trägt, identifiziert. Diese Mutation ist im A'B Loop der Hybriddomäne lokalisiert, welche die Rigidität der Interphase zwischen der Hybriddomäne und der PSI Domäne aufrechterhält. Die Substitution von Gln durch ein positiv geladenes Arg führt zu weit reichenden strukturellen Veränderungen in dieser Interphase, so dass die Epitoperkennungsstelle der HPA-1a Alloantikörper zerstört wird.

Die Beobachtungen der letzten Jahre deuten darauf hin, dass sich HPA-1a Alloantikörper in ihren Epitoperkennungsstellen unterscheiden.

Einige HPA-1a Alloantikörper binden an eine aminoternale β 3-Domäne unabhängig von der Ausbildung der Cys13-Cys435 Disulfidbrücke, während für die Epitopkonformation anderer anti-HPA-1a diese ein wichtiges Strukturmerkmal darstellt (Valentin et al., 1995).

Eine Heterogenität von HPA-1a Alloantikörpern demonstriert sich auch eindrucksvoll in Inhibitionsstudien mit dem β 3-spezifischen monoklonalen Antikörper LK4 (Liu et al., 1996a). Ein Split der Alloantikörperreaktivität zeigte sich in zwei unterschiedlichen

Reaktionsmustern, 1) LK4-sensitiven HPA-1a Alloantikörpern, welche ein rekombinantes 66 AS langes β 3-Fragment erkennen und 2) LK-4 unsensitiven Alloantikörpern, welche zusätzlich zu den auf diesem rekombinanten Fragment gelegenen Epitopen auch solche anderer β 3 Regionen erkennen.

Aus bisherigen Erkenntnissen spielen Kohlenhydratstrukturen für die Expression von HPA-1a Epitopen keine Rolle (Newman et al., 1985).

1.7.2 Heterogenität von HPA-3 Alloantikörpern

Das HPA-3 System (Ile 843Ser) wird durch den Nukleotidaustausch T2621G im ITGA2B Gen definiert, die zu einem Austausch der AS Isoleucin (Ile) gegen ein Serin (Ser) an der Position 843 im α IIb Integrin führt (Lyman et al., 1990). Lokalisiert ist diese Mutation in der Calf-2 Domäne von α IIb (Xiong et al., 2001) (s. Abb. 1.7).

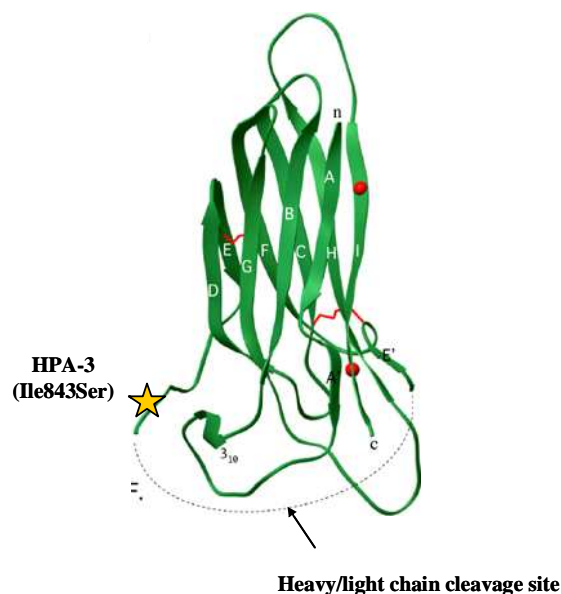


Abb. 1.7: Calf-2 Domäne des α IIb Integrins. (aus (Shattil and Newman, 2004))
Der HPA-3 Polymorphismus ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Entgegen den HPA-1 Epitopen sind für die Expression von HPA-3 Epitopen vermutlich Kohlenhydratstrukturen erforderlich (Goldberger et al., 1991; Santoso et al., 1993b; Take et al., 1990). Die Beobachtungen von Djaffar und Mitarbeitern zeigen, dass die HPA-3 Epitopintegrität von einer O- und nicht einer N-Glykosylierung abhängig ist (Djaffar et al. Thromb Haemost 1993). Beweisend konnte massenspektrometrisch eine O-Glykosylierung

des Aminosäurerestes Ser847, welches sich in unmittelbarer Nachbarschaft zum Ser843 befindet (HPA-3 Dimorphismus), detektiert werden (Calvete and Muniz-Diaz, 1993).

Darüber hinaus belegen Studien mit monoklonalen Antikörpern eine Heterogenität der Alloantikörperbindung an HPA-3 (Harrison et al., 2003) und HPA-9w (Kaplan et al., 2005; Peterson et al., 2005)

Eine weitere Charakterisierung von epitopbildenden Minidomänen ist erforderlich, um die Interaktionen zwischen dem α IIb β 3 Integrin und korrespondierenden Alloantikörpern weiter aufzuklären. Darüber hinaus ist unklar, in wieweit sich Konformationsänderungen während der Plättchenaktivierung auf die Alloantikörperbindung auswirken.

1.8 Funktionelle Heterogenität von plättchenspezifischen Alloantikörpern

Plättchenspezifische Alloantikörper können sich nicht nur in ihren Epitoperkennungsstellen, sondern auch in ihren funktionellen Eigenschaften unterscheiden. Die Alloantikörperbindung kann eine Aktivierung oder eine Inhibition der α IIb β 3 Integrinaktivität verursachen (Deckmyn et al., 1998).

Eine durch anti- α IIb β 3 Antikörper induzierte Inhibition der Plättchenfunktion kann bei Patienten einen Thrombasthenie Glanzmann Effekt bewirken. Dieser führt analog zu der angeborenen Thrombasthenie Glanzmann (van Leeuwen et al., 1981), welche durch das Fehlen oder eine abartige Bildung von α IIb β 3 bedingt ist, zu einer ausgeprägten Blutungsneigung beim Patienten (Deckmyn and De Reys, 1995; Niessner et al., 1986; Tholouli et al., 2004).

Darüber hinaus kann eine Alloantikörperbindung über einen Fc-abhängigen Mechanismus, Komplementaktivierung oder eine direkte Interaktion mit plättchenspezifischen Rezeptoren eine Stimulation der Plättchenfunktion auslösen (Deckmyn et al., 1998).

Nardi und Kollegen haben einen neuen Mechanismus aufgeklärt, welcher komplementunabhängig eine Elimination von Plättchen bei Patienten mit HIV-1 induzierter Immunthrombozytopenie hervorruft (Nardi et al., 2004; Nardi et al., 2001). In diesem sind Autoantikörper gegen den Aminosäurerest 49-66 auf dem β 3-Integrin für eine Generierung von sauerstoffreaktiven Spezies (Peroxide) mit nachfolgender Plättchenfragmentierung („Apoptose“) verantwortlich. Diese Peroxid-induzierte Immunthrombozytopenie wurde

spezifisch nur durch anti- $\beta 3$ Autoantikörper gegen das Fragment $\beta 3$ (49-66) und nicht durch Antikörper anderer $\beta 3$ -oder GPIIb α Spezifitäten aktiviert.

Seit der Entdeckung, dass einige HPA-1a Alloantikörper die Fibrinogenbindung und Plättchenaggregation nach Stimulation durch spezifische Agonisten wie ADP und Kollagen inhibieren können (van Leeuwen et al., 1984), sind nur wenige neue Daten publiziert worden (Beadling et al., 1995; Duncan and Rosse, 1986).

Eine Untersuchung der Plättchenaktivierung wird durch verschiedene Faktoren erschwert, u.a. durch die Koexistenz von Alloantikörpern gegen HLA-Klasse I Antigene. Diese werden häufig während einer Schwangerschaft gebildet und können aktivierende Effekte auf die Plättchenfunktion ausüben (Christie et al., 1993; Christie and Swinehart, 1992; Rubinstein et al., 1992).

Eine Heterogenität der Epitoperkennungsstellen von HPA-1a Alloantikörpern kann möglicherweise auch unterschiedliche funktionelle Eigenschaften bedingen.

In einer neuen Studie haben Santos und Kollegen den Einfluss von verschiedenen HPA-1a Alloantikörpern auf die α IIB $\beta 3$ Integrin-vermittelte Fibrinogenbindung analysiert (Kroll et al., 2005a). Es wurde die Wirkung von HPA-1a Alloantikörpern auf die Adhäsion von CHO-Transfektanten, welche die $\beta 3$ -Leu33 (HPA-1a) oder $\beta 3$ -Pro33 (HPA-1b) Isoform exprimieren, an immobilisiertes Fibrinogen untersucht. Hinsichtlich ihrer α IIB $\beta 3$ Inhibition wurden drei Reaktionstypen von HPA-1 Alloantikörpern beobachtet mit 1) keiner Inhibition der Zelladhäsion, 2) Allotyp-spezifischer Inhibition und 3) keiner Allotyp-spezifischen Inhibition. Die Fähigkeit zur Hemmung der Fibrinogenbindung war fast ausschließlich bei PTP HPA-1a Antiseren (75 %) und in nur 9.3 % aller FNAIT Fälle zu beobachten. Bei einigen PTP Fällen waren die inhibierenden Effekte von HPA-1a Alloantikörpern auf die Plättchenfunktion mit einer schweren Thrombozytopenie der Patienten assoziiert.

Diese Daten deuten darauf hin, dass die Heterogenität von HPA-1a Antikörpern gelegentlich Ursache einer schweren Blutungskomplikation in Alloimmunthrombozytopenien sein kann.

HPA-1a Alloantikörper können möglicherweise durch eine Blockade des Fibrinogenrezeptors zur Entstehung einer „thrombopathischen Thrombozytopenie“ mit dem Krankheitsbild eines erworbenen „Thrombasthenie Glanzmann“ führen (Kroll et al., 2005a).

Weitere Studien sind jedoch erforderlich, um die pathogene Relevanz der funktionalen Heterogenität von Alloantikörpern zu verstehen.

Alloantikörper gegen klinisch relevante Plättchenalloantigene unterscheiden sich sowohl in ihren Epitoperkennungsstellen, als auch in ihren funktionellen Eigenschaften. Aus den beschriebenen Beobachtungen ergibt sich, dass die Natur des Antikörpers eine Ursache für die Variabilität des Krankheitsbildes darstellen kann (Socher et al., 2006).

Mit Hilfe gegenwärtiger *in vitro* Testverfahren kann nur die Spezifität und die Konzentration der maternalen Antikörper bestimmt werden.

Zukunftsweisende Methoden zur Charakterisierung plättchenreaktiver Antikörper eröffnen sich mit der Verfügbarkeit neuer Technologien, wie z.B. der Oberflächenplasmonresonanz (SPR – surface plasmon resonance) Technologie (Jonsson et al., 1991). Diese ermöglicht eine biomolekulare Interaktionsanalyse in Echtzeit ohne Markierungs- oder Waschschriffe (Malmqvist, 1993; Myszka, 1997). Breite Untersuchungsfelder bestehen mittlerweile in der Charakterisierung von Proteinen (Kim et al., 2006), Nukleinsäuren (Vaisocherova et al., 2006), Lipiden (Abdiche and Myszka, 2004), Kohlenhydraten (Beccati et al., 2005) und Antigen-Antikörper Interaktionen (Kimura et al., 2005; Yurugi et al., 2007). Mit der SPR Technik wird nicht nur die Spezifität einer biomolekularen Interaktion, sondern auch deren Kinetik (Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeiten) und Affinität ermittelt. Diese Parameter ermöglichen vielleicht eine Aussage über den Schweregrad der Erkrankung.

Vor kurzem wurde ein neues *in vivo* Modell der FNAIT entwickelt (Ni et al., 2005), in welchem Mäuse mit einem Defekt im $\beta 3$ -Integrin eingesetzt werden. In diesem Modell wurde durch plättchenreaktive Antikörper gegen das $\beta 3$ -Integrin eine der FNAIT ähnliche hämatologische Erkrankung verursacht.

Die Etablierung einer neuen Generation von Testverfahren (Phase IV), welche plättchenreaktive Antikörper hinsichtlich ihrer funktionellen Eigenschaften und Antigeninteraktion charakterisieren, wird helfen, die den Erkrankungen zugrunde liegenden Pathomechanismen und die Heterogenität von plättchenreaktiven Alloantikörpern im Zusammenhang zu ihrer klinischen Bedeutung aufzuklären.

1.9 Zielsetzung

Bei einer fetalen und neonatalen Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT) bildet die Mutter Alloantikörper gegen fetale Plättchenantigene, die vom Vater vererbt wurden. Gelangen diese Alloantikörper über die Plazenta in die fetale Zirkulation kann eine Thrombozytopenie des Feten mit einer individuell verschieden ausgeprägten Blutungsneigung auftreten. Hirnblutungen sind gefürchtete Blutungskomplikationen, deren prädisponierende Faktoren bislang unklar sind. Die FNAIT hat eine Inzidenz von 1 auf 1000 bis 2000 Neugeborene. Im Gegensatz zur hämolytischen Neugeborenenenerkrankung, welche erst in der zweiten Schwangerschaft auftritt, sind bei diesem Krankheitsbild bereits in über 50 % aller Fälle die Erstgeborenen betroffen.

Genetische Variationen von plazentaren IgG Rezeptoren könnten direkte Auswirkungen auf die Effektivität des maternalen IgG Transfers und damit die Schwere der fetalen und neonatalen Thrombozytopenie haben. Der diaplazentare IgG Transport wird durch den neonatalen Fc Rezeptor vermittelt. **Das erste Projekt** untersucht die phänotypische Auswirkung eines VNTR (variabel number of tandem repeats) Polymorphismus in der Promotorregion der FcRn alpha Kette. Wir haben die Hypothese aufgestellt, dass die beiden häufigsten Promotor-Varianten VNTR2 und VNTR3 mit einer unterschiedlichen Aktivität des Promotors assoziiert sind. Die Hypothese soll durch Ermittlung der allelspezifischen Transkriptionsaktivität des Promotors, der Quantifizierung der mRNA, sowie des Rezeptorproteins am Monozytenmodell überprüft werden. Weitergehend soll der VNTR-Genotyp einer Patientenpopulation mit der klinischen Ausprägung ihrer FNAIT assoziiert werden.

Die Punktmutation Leu33Pro auf dem β 3-Integrin führt zur Bildung von immunogenen Strukturen, die als HPA-1a und HPA-1b Allel bekannt sind. Eine Alloimmunisierung gegen HPA-1a ist die häufigste Ursache für das Entstehen einer FNAIT. Eine Heterogenität von HPA-1a Alloantikörpern wurde in Untersuchungen mit strukturell veränderten rekombinanten Thrombozytenproteinen gezeigt (Valentin et al., 1995). **Im zweiten Projekt** wird untersucht, ob eine neu identifizierte β 3-Val33 Isoform ein Ziel von HPA-1a Alloantikörpern in der FNAIT ist. Es wird die These geprüft, ob die Epitopspezifität von HPA-1a Alloantikörpern im Zusammenhang mit der Blutungskomplikation des Feten bzw. Neugeborenenen steht.

Neue Studien beobachten einen Zusammenhang mit der maternalen Antikörperkonzentration (Bertrand et al., 2006; Killie et al., 2007; Williamson et al., 1998). Jedoch wird in ca. 15 % aller Fälle mit fetomaternaler HPA-1a Inkompatibilität klinisch eine FNAIT bei nachweislich geringen Antikörperkonzentrationen oder sogar einem serologisch negativen Antikörperbefund (anti-HPA-1a) beobachtet (Bussel et al., 2005; Harrison et al., 2003). Daraus ergibt sich, dass die Affinität des Antikörpers eine Ursache für die Variabilität des Krankheitsbildes darstellen könnte. **Im dritten Projekt** soll überprüft werden, ob die Affinität des Antikörpers eine Ursache für die Variabilität des Krankheitsbildes darstellen könnte. Diese Messung soll durch die Anwendung der Oberflächenplasmonresonanz (surface plasmon resonance, SPR)-Technologie ermöglicht werden, zur Bestimmung von Antigen-Antikörper Reaktionen im Zeitverlauf. Es wird die Hypothese überprüft, ob die Antikörperaffinität für eine schwere Thrombozytopenie verantwortlich ist. Thrombozytäre Antikörper mit niedriger Affinität könnten die klassische Komplementkaskade aktivieren, die zur verstärkten intravasalen Eliminierung der Thrombozyten führt. Daher werden die Komplementbindungseigenschaften von HPA-1 Alloantikörpern untersucht und mit dem Blutungsrisiko des Feten assoziiert.

Die Chance einer fetomaternalen Inkompatibilität ist im HPA-3 System (Ile843Ser) aufgrund der ausgewogenen Allelfrequenzen wesentlich höher als im HPA-1 System. HPA-3a Alloantikörper werden jedoch nur in 2 % aller Fälle detektiert, die fast immer mit einem schweren klinischen Verlauf assoziiert sind (Glade-Bender et al., 2001). Die Detektion von HPA-3 Alloantikörpern bereitet erhebliche Schwierigkeiten (Harrison et al., 2003). **Im vierten Projekt** wird geprüft, ob unterschiedliche Faktoren: tertiäre Struktur, Glykosylierung, sowie Thrombozytenlagerung die Stabilität des HPA-3 Epitopes verändern und dadurch die Bindung der Antikörper beeinflussen. Vor dem Hintergrund dieser Erkenntnisse soll die Antikörperdetektion optimiert werden.

Bisher etablierte *in vitro* Testverfahren erlauben keine Aussage über die pathogene Relevanz von Alloantikörpern. Daher wird **im fünften Projekt** die Eignung von NOD/SCID (nonobese diabetic/immune-deficient) Mäusen (Boylan et al., 2006) als *in vivo* Modell der FNAIT in Zusammenarbeit mit dem Blood Research Institut (Milwaukee/USA) geprüft. Es werden die Effekte von HPA-1 Alloantikörpern auf humane Plättchen untersucht, insbesondere die Rolle der Alloantikörperaffinität auf die Stärke der Thrombozytenelimination.

Die Charakterisierung prädikativer Parameter soll eine bessere Vorhersage über den Verlauf der FNAIT ermöglichen und durch eine optimierte Pränataldiagnostik die Entscheidung zu risikobehafteten pränatalen Maßnahmen besser steuern.

2 Material

2.1 Geräte

AutoMACS™ Separator	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
BIAcore 2000	BIAcore AB, Uppsala, Schweden
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
Gelkammer, vertikal	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 SM- Lux, 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
PCR System	GeneAmp PCRsystem 9600, Perkin Elmer, Boston, USA
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
Real-Time PCR System	ABI PRISM® 7000, Sequence Detection System, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Rhesusschaukel	DiaMed AG, Cressier sur Morat, Schweiz
Säulen zur Affinitätschromatographie	C Columns; Hi Performance Columns, Amersham, Buckinghamshire, UK
Schüttelinkubator	GFL-3032, Hilab Labortechnik, Düsseldorf
Sequenziergerät	ABI PRISM® 3100, Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
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, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA
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 ² /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

2.2 Verbrauchsmaterial

96-Loch Rundbodenplatten	Cellstar® TC Plate, Greiner bio-one, Frickenhausen
24/-6-Loch Flachbodenplatten	Cellstar® TC Plate, Greiner bio-one, Frickenhausen
Dialysekartuschen	Slide-A-Lyzer® Dialysis, 10.000 MWCO (0.1 - 0.5 ml, 0.5 – 3 ml), Pierce, München
Dialyseschläuche	Spectra/Por (6. - 8.000 MWCO), SpektrumLabs, Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Einmalspritzen	B. Braun Melsungen AG, (10 ml, 20 ml), Melsungen
Elisaplaten	Immunoplates F96 Maxisorb, Nunc™ Wiesbaden
Glasfläschen Ø 9 mm	BIAcore AB, Uppsala, Schweden
Glasfläschen Ø 16 mm	BIAcore AB, Uppsala, Schweden
Hamaxplatten	Hamax As, Norwegen
Kryo-Röhrchen	Nunc™, Wiesbaden
Mikrotestplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen
Multi-Screen®-PCR Plates	Millipore, Billerica, MA, USA
Nitrozellulose-Membran (Hybond™-C extra)	Amersham, Buckinghamshire, UK
Objektträger	SuperFrost® Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig
Parafilm	American National Can., Greenwich, CT, USA
Pasteurpipetten	Falcon®, Transferpipette (3 ml), BD Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
Pipettenspitzen	Filter Tips (FT1000E, FT100E, FT10E), Greiner bio-one, Frickenhausen; TipOne® (20 – 300 µl), Natural Tips, Starlab, Ahrensburg; Biosphere® Sarstedt, Tips (10, 100, 1000 µl), Nürnberg
Plastikfläschen Ø 7mm	BIAcore AB, Uppsala, Schweden
Plastikfläschen Ø 7mm	BIAcore AB, Uppsala, Schweden
PP-Röhrchen	Cellstar®, sterile (14, 25, 50 ml), Greiner bio-one, Frickenhausen

PS-Röhrchen	Falcon® (5 ml), BD Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
Reaktionsgefäße	Safe Lock (1.5 ml, 2 ml), Eppendorf, Hamburg; 2. Sarstedt
Research-Grade CM5 Sensor Chip	BIAcore AB, Uppsala, Schweden
Röntgenfilme Kodak X-OMAT AR	Kodak, England
Sephadex-Platte	Sephadex™ 50 Superfine, Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden
Sensorchip	CM5, BIAcore AB, Uppsala, Schweden
Serologische Pipetten	Falcon® (1, 2, 5, 10, 25 ml), BD Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
Skalpell	Feather Safety, Razor Co., Osaka, Japan
Steritop	Millipore, Billerica, MA, USA
Sterilfilter	Millex®GP (0.22 µm, 0.45 µm), Millipore,
Ultrafiltrationsmembransäulchen	YM-Säulchen (10.-50.000 MWCO), Millipore, Billerica, MA, USA
Zellkulturflaschen	Cellstar® (75 cm ² , 182 cm ²), Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellkulturschale	Cellstar® (100 mm), Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellsiebe	BD Falcon™ Nylon cell strainer, 70 µm, BD Discovery Labware, Heidelberg

2.3 Chemikalien

ACD-A Formula A (Na-Citrat/Glukosemonohydrat)	Biotrans, Dreieich
Aceton (C ₃ H ₆ O)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS) (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	Roth, Karlsruhe
Aqua ad injectabilia	Baxter Deutschland, Unterschleißheim
Bovines Serumalbumin (BSA), cell culture grade	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Calciumazetat (Ca(H ₃ C ₂ O ₂) ₃)	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich, München
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, München

1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid	EDC, 4M, BIAcore AB, Uppsala, Schweden
Epsilon-Aminocaprinsäure	Sigma-Aldrich, München
Essigsäure (HAc)	Riedel-de-Häen, Seelze
Ethanol (EtOH), absolut, puriss.	Riedel-de-Häen, Seelze
Ethanolamin	1 M, BIAcore AB, Uppsala, Schweden
Ethidiumbromid	Roche, Mannheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Titriplex® III, Riedel-de-Häen, Seelze
Formaldehyd (CH ₂ O)	Merck, Darmstadt
Glutaraldehyd (C ₅ H ₈ O ₂)	Sigma-Aldrich, München
Glycerol [C ₃ H ₅ (OH) ₃], 87.5 %	Merck, Darmstadt
Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂)	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Manganchlorid (MnCl ₂)	Sigma-Aldrich, München
Methanol (CH ₃ OH)	Riedel-de-Häen, Seelze
2-Merceptoethanol	Sigma-Aldrich, München
β-Merceptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Natriumazetat (CH ₃ COONa)	Roth, Karlsruhe
Natriumazid (NaN ₃)	J.T. Baker B.V., Deventer, Holland
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS) (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Eurolab, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Eurolab, Darmstadt
Natrumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Eurolab, Darmstadt
Natriumthiolsulfat (Na ₂ S ₂ O ₃)	Roth, Karlsruhe
N-Ethylmaleimide	Sigma-Aldrich, München
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	0.1 M, BIAcore AB, Uppsala, Schweden
Nonidet Polyethylenglycol (NP-40)	Sigma-Aldrich, München
Paraformaldehyd ([HO(CH ₂ O) _n H]	Merck, Karlsruhe
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	AppliChem, Göttingen
Salzsäure (HCl)	Riedel-de-Häen, Seelze
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt
Silbernitrat (AgNO ₃)	Merck, Darmstadt
Surfactant P20	BIAcore AB, Uppsala, Schweden

Tetramethylethyldiamin (TEMED)	AppliChem, Göttingen
Triphenylformazan (Na ₂ -EDTA)	Merck, Darmstadt
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth, Karlsruhe
Triton® X-100	Sigma-Aldrich, München
Tween 20	Serva, Heidelberg
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich, München

2.4 Gebrauchsfertige Reagenzien, Lösungen, Puffer und Kits

Reagenzien, Lösungen und Puffer

Ampicillin	Sigma-Aldrich, München
Bacto-Trypton	Merck, Darmstadt
Calciumchloridlösung (CaCl ₂ , 25 mM)	Dade Behring, Marburg
CNBr-activated Sepharose 4B	Pharmacia Biotech, Wikströms, Schweden
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Gibco BRL, Karlsruhe
Dyna M-280 Streptavidin-Beads	Dynal Biotech, Hamburg
Effectene® Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
FACSClean™	BD Bioscience, Heidelberg
FACSRinse™	BD Bioscience, Heidelberg
FACSFlow™	BD Bioscience, Heidelberg
Ficoll-Paque™ PLUS, endotoxin tested	Amersham, Buckinghamshire, UK
Fötales Kälberserum (FKS) Gold, hitzeinaktiviert	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Gentamycin	Gibco BRL, Karlsruhe
Glucose 10	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
Immobilisationspuffer (10 mM Natriumazetat, pH 4.0)	BIAcore AB, Uppsala, Schweden
L-Glutamin 200 mM (100x)	Gibco BRL, Karlsruhe
Lipofectamine™ 2000	Gibco BRL, Karlsruhe
MACS Microbeads (anti-CD14)	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
α-MEM	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
MEM Non-Essential Amino Acids (100x)	Riedel-de-Häen, Seelze
OptiMEM	Gibco BRL, Karlsruhe
Orthophenylendiamin-Dihydrochlorid (OPD)	Tabletten, DAKO, Glostrup, Dänemark
Penicillin/Streptomycin 5000 IU/ml	Gibco BRL, Karlsruhe
Phosphate buffer saline (PBS) (1x)	Gibco BRL, Karlsruhe

Protein A Sepharose CL-4B	Amersham, Buckinghamshire, UK
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Pierce, München
Rinderserumalbumin 22 %	Immucor, Rödermark Rotipherese
Rotipherese Gel 30	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 mit L-Glutamin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
SDS-PAGE 30	Roth, Karlsruhe
Tris-Borat EDTA Puffer	Gibco BRL, Karlsruhe
Zeocin	Invitrogen, Karlsruhe

Kits

ABI Prism® Big Dye™ Cycle Terminator	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Amine Coupling Kit	BIAcore AB, Uppsala, Schweden
BCA Protein Assay Kit	Pierce, München
BIA Maintenance Kit	BIAcore AB, Uppsala, Schweden
CELLlection™ Pan Mouse IgG Kit	Dynal Biotech, Hamburg
Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Dual-Luciferase® Reporter Assay	Promega, Mannheim
ECL + plus Reagenz	Amersham, Buckinghamshire, UK
E.Z.N.A. Gel Extraction Kit	PEQLAB, Erlangen
GC-RICH PCR System	Roche, Penzberg
Melon™ Gel IgG Spin Purification Kit	Pierce, München
Puregene™ DNA Isolation Kit	Genra Systems, Minneapolis, MN, USA
QIAamp® Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Spin Purification Procedure	Qiagen, Hilden
QIAGEN Hi Speed Midi-Prep	Qiagen, Hilden
Quick-Change Mutagenese Kit	Stratagene, Heidelberg
Ready-To-Go™ Kit	Amersham, Buckinghamshire, UK
Real-Time PCR Primer und TaqMan® MGB	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Roti®-Quick-Kit	Roth, Karlsruhe
Sonden-Kit:	
1. GAPDH (ID: Hs99999905_m1)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
2. FCGRT (ID: Hs00175415_m1)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
TaqMan® 2x PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Zusatzreagenzien für die Komplementbindungsreaktion	Dade Behring, Marburg

2.5 Antikörper

Rekombinante humane (*rhu*) und Maus monoklonale Antikörper (*mAK*)

rhu IgG1/L anti-HPA-1a Klon CamTran007	International Blood Group Reference Laboratories, Bristol, UK (Garner et al., 2000; Griffin and Ouwehand, 1995)
rhu IgG/k anti-HPA-1a Klon 19-7 et al., 1997)	R. Lemieux, Hema-Quebec, Kanada (Proulx et al., 1997)
rhu IgG/k anti-HPA-1a Klon 23-15 et al., 1997)	R. Lemieux, Hema-Quebec, Kanada (Proulx et al., 1997)
mAk Maus anti-human α IIb β 3 (CD41), Klon Gi5	Transfusionsmedizin, Gießen (Santoso et al., 1984)
mAk Maus anti-human α IIb β 3 (CD41), Klon P2	Immunotech, Marseille, France
mAk Maus anti-human α IIb (CD61), Klon Gi16 1993b)	Transfusionsmedizin, Gießen (Santoso et al., 1993b)
mAk Maus anti-human α IIb (CD61), Klon SZ22	Immunotech, Marseille, France
mAk Maus anti-human β 3 (CD41), Klon SZ21	Immunotech, Marseille, France
mAk Maus anti-human β 2 microglobulin, Klon B1G6	Immunotech, Marseille, France
mAk MBC 132.1	Blood Research Institute, Milwaukee, USA

Polyklonale Antikörper

Esel anti-Maus IgG PO	Dako, Hamburg
Esel anti-Human IgG PO	Dako, Hamburg
Kaninchen anti-Maus IgG	Dako, Hamburg
Kaninchen anti-Human IgG	Dako, Hamburg
Ziege anti-Human IgG Fc γ PO	Dianova, Hamburg
Streptavidin-Meerrettich-PO	Amersham, Buckinghamshire, UK
Ziege anti-Human IgG Biotin	Dianova, Hamburg
Kaninchen anti-Human IgG FITC	Dako, Hamburg
Kaninchen anti-Maus IgG FITC	Dako, Hamburg
Kaninchen anti-Human C1q FITC	Dako, Hamburg
Streptavidin FITC	Dianova, Hamburg

2.6 Nukleinsäuren und Nukleotide

Nukleotide

2' Desoxynucleotid 5' Triphosphate
(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

Biotech, Martinsried

Tab. 2.1: Primer.

Polymorphismus	Primer-ID/Position	Typ	Primersequenz (5'-3')
<i>Primer für FcRn VNTR Amplifikation (putative Promotorregion von -794 bis +1375)</i>			
	cRN 1803 - 1820 repeat	V	CAG GAT GTG AGA GAG GAA C
	cRN 2368 - 2350 repeat	R	CTT GAT AGG CTG AGA GTC C
<i>Primer für ortsgerichtete Mutagenese des WT-β3-Leu33 (176T) Konstruktes</i>			
T176C	178 - 213	V	CTG ATG AGG CCC TGC CTC CGG GCT CAC CTC GCT GTG
		R	CAC AGC GAG GTG AGC CCG GAG GCA GGG CCT CAT CAG
C175G		V	CTG ATG AGG CCC TGC CTG TGG GCT CAC CTC GCT GTG
		R	CAC AGC GAG GTG AGC CCA CAG GCA GGG CCT CAT CAG
<i>Sequenzierprimer für β3-Konstrukte</i>			
	56 - 72	V	GAC TGT GCT GGC GCT GG
	412 - 391	R	CGC ACT TGG ATG GAG AAA TTC
<i>Sequenzierprimer für αIIb-Konstrukte</i>			
	2193 - 2216	V	GAA TCG CGA TGT TGG TGA GCG TGG
	2726 - 2707	R	CGA GAA CTG GAT CCT GAA GC
<i>Primer für αIIb cDNA Amplifikation und Sequenzierung</i>			
T2621G	1604 - 1625	V1	CTA AAT GCC GAG CTG CAG CTG
	2149 - 2130	R1	CAC CAC CCT GGT CTC ATT CT
	1895 - 1919	V2	GAC TCT GGG GAA GAT GAC GT
	2424 - 2401	R2	CCC CAG CTG TCC AAG CTG TTC TGC
	2474 - 2498	V3	GTG AAT GGT CTT CAC CTC AGC ATC C
	2726-2707	R3	CGA GAA CTG GAT CCT GAA GC
	3061-3044	R4	CTT CCA CAT GGC CAG GAC
	3201-3176	R5	GCT TGG AGG CAA CTT GTT GGA GAA GG

Konstrukte

Firefly Luciferase Control Vector

Invitrogen, Karlsruhe

Renilla Luciferase Reporter Plasmid

BD Bioscience, Heidelberg

2.7 *Marker*

GenSizer™ VII, pBR322 DNA/Hae III Marker	Innotrain, Kronberg
Rainbow™ coulered protein weight marker	Amersham, Buckinghamshire, UK
Standard phiX174 DNA-Hae III	Invitrogen, Karlsruhe

2.8 *Enzyme und Proteine*

Accutase	Invitrogen, Karlsruhe
Apyrase	Sigma-Aldrich, München
Hirudin	Pentapharm, Basel, Schweiz
Humanes Komplement C1q	Sigma-Aldrich, München
Humanes Polyvalentes IgG	Octapharma, Langenfeld
Leupeptin	Sigma-Aldrich, München
Neuraminidase aus Athrobacter urefaciens	Calbiochem, Darmstadt
Prostaglandin E1 (PGE1)	Sigma-Aldrich, München
Proteaseinhibitor-Cocktail	Sigma-Aldrich, München
TaqGold Polymerase	Perkin Elmer, Massachusetts, USA
Wheat-Germ-Agglutinin PO	Sigma-Aldrich, München

2.9 *Zelllinien und Bakterien*

CHO-K1 Zellen	Ovarialzellen des chinesischen Hamsters ACC 110, DSM, Braunschweig
COS-7-Zellen	Nierenzelllinie des afrikanischen grünen Affen (CV-1 Origin SV 40), DSM
Myeloische U937 Zellen	myeloleukämische Zellen eines 37-jährigen Kaukasiers mit diffusen, histiozytischen Lymphomen, American Type Culture Collection, Wesel
Escherichia Coli Zellen:	DH5α™, Qualität Maximum Efficiency Gibco BRL, Karlsruhe

2.10 *Humane Antiseren*

Die humanen Seren von Müttern mit FNAIT (fetale und neonatale Alloimmunreaktion)-Kindern, von Patienten mit posttransfusioneller Purpura bzw. Autoimmunthrombozytopenie wurden uns freundlicherweise vom Thrombozytenlabor des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin in Gießen überlassen (s. Anhang, Tab. 10.1).

2.11 *Fetale DNA-Proben*

Die DNA Proben von folgenden Feten bzw. Neugeborenen mit einer fetomaternalen HPA-1 Inkompatibilität entstammen dem Thrombozytenlabor des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin in Gießen (s. Anhang, Tab. 10.2). Die Proben wurden auf ihren VNTR (variable number of tandem repeats) FcRn Genotyp typisiert (s. 3.1.8).

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Transformation kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Für die Transformation wurden 5 – 50 ng des zu vermehrenden Plasmids mit 100 µl DH5α kompetenten *E. coli* Zellen (Qualität Maximum Efficiency) vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es wurde ein 1-minütiger Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad durchgeführt und die Bakterien anschließend für 2 min auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 900 µl S.O.C. Medium und einer 60 min Anzucht bei 37 °C im Schüttelinkubator (225 Upm) wurden die Bakterien abzentrifugiert (4500 Upm), auf Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden in LB-Medium (0.5 % Hefeextrakt, 1 % Bacto-Trypton, 1 % NaCl, 50 µg/ml Ampicillin, pH 7.4) kultiviert. Zur Herstellung einer Glycerolkultur wurde 900 µl einer Bakterienkultur mit einer optischen Dichte von 0.4 – 0.6 (bei 600 nm) mit 100 µl Glycerin (87.5 %) versetzt und bei -80 °C in einem Kryogefäß aufbewahrt.

3.1.2 Isolierung von Plasmiden aus *Escherichia coli*-Zellen

Zur Vermehrung rekombinanter Proteine in *E. coli* Zellen wurde eine 2 ml Vorkultur (LB-Medium) mit einer Kolonie von frisch ausgestrichenen Bakterien oder einer Glycerolkultur (s. 3.1.1) angeimpft. Die Vorkultur wurde für 2 h bei 37 °C geschüttelt, in 30 ml LB-Medium überführt und über Nacht im Schüttelinkubator (225 Upm 37 °C) kultiviert.

Aus Übernacht-Kulturen mit einem Volumen von 30 ml wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des Qiagen HiSpeed Plasmid Midi Kit isoliert. Die Bakterienkulturen wurden pelletiert (4500 Upm 15 min) und in Anlehnung an das Herstellerprotokoll weiter aufgearbeitet. Nach Zellwandlyse in einem alkalischen Puffer (Qiagen) wurden durch Absenkung des pH-Wertes bakterielle Proteine und genomische DNA ausgefällt, während die Plasmid-DNA in Lösung bleibt. Diese wurde über eine selektive Bindung an mitgelieferte Anionenaustauschersäulen des Kits isoliert. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde mit 90 µl DNase freiem Wasser eluiert und ihre Konzentration bestimmt (s. 3.1.7).

3.1.3 DNA Isolierung aus EDTA-Vollblut/ Buffy Coat

DNA aus Vollblut/*Buffy Coat* wurde mit Hilfe des QIAamp® DNA Mini Kit isoliert. Das Prinzip beruht auf der selektiven Bindung von DNA an Silikamembranen, welche in Abhängigkeit vom pH und der umgebenden Salzkonzentration reversibel ist. Die Zellen wurden mit entsprechenden Pufferlösungen lysiert, Proteine, RNAsen und DNAsen denaturiert und inaktiviert. Nach mehreren Wasch- und Zentrifugationsschritten, die Proteine und Zellfragmente entfernen, wurde die DNA mit 200 µl DNase freiem Wasser eluiert und die Konzentration photometrisch bestimmt (s. 3.1.7).

3.1.4 Isolierung von Thrombozyten-RNA aus Vollblut

Die Isolierung der RNA wurde mit Hilfe des Roti®-Quick-Kit durchgeführt. Zur Abnahme von 45 ml Vollblut wurden zwei 50 ml PP-Röhrchen mit je 5 ml vorgelegter 5 % EDTA-Lösung (autoklaviert) vorbereitet. Das Blut wurde in zehn 10 ml PP mit einer Stabpipette aufgeteilt und für 30 min bei RT in Schräglage inkubiert. Nach Zentrifugation (800 Upm 25 min ohne Bremse) wurde vom gewonnenen plättchenreichen Plasma (PRP) das obere Drittel in frische 10 ml PP überführt. Das PRP wurde mit gleichem Volumen an autoklaviertem Trispuffer (96.5 mM NaCl, 87.5 mM Glucose, 1.1 mM EDTA, 8.5 mM Tris) versetzt, die Plättchen pelletiert (2200 Upm 10 min) und zweimal mit Trispuffer zum Entfernen von Plasmabestandteilen gewaschen. Alle Röhrchen wurden dann gepoolt, die Plättchen sedimentiert und in 1 ml Lösung 1 (Roth) lysiert. Je 500 µl dieses Lysates wurden in sterile, RNase-freie Reaktionsgefäße überführt und nach Zugabe von 650 µl Lösung 2 (Roth) für 10 min auf Eis inkubiert. Die nach Zentrifugation (10000 Upm 15 min 4 °C) in der oberen, wässrigen Phase enthaltene RNA wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Lösung 3 (Roth) versetzt, geschwenkt und für 30 min bei -20 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die RNA bei 13000 Upm bei 4 °C sedimentiert und zweimal mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen (13000 Upm 10 min). Die isolierte, gereinigte RNA wurde in 30 µl RNase-freiem, autoklaviertem DPEC-Wasser (500 µl DPEC in 500 ml sterilem Aqua dest. für 1 h bei RT lösen und 2x autoklavieren) resuspendiert und bis zur cDNA-Synthese (s. 3.1.6) bei -70° C gelagert.

3.1.5 RNA Isolierung aus mononukleären Zellen

Die RNA wurde aus $5 \cdot 10^6$ aufgereinigten Monozyten (s. 3.2.1) mit Hilfe des QIAgen RNeasy® Mini Kit isoliert. Nach Zelllyse und Proteindenaturierung wird die Probe mit

Ethanol versetzt und auf die Silika-Gelsäule geladen. Durch die selektive Bindung von RNA an Silikamembranen wird die RNA von Protein- und Zellfragmentresten in mehreren Waschschritten getrennt. Die aufgereinigte RNA wurde mit 37 μl RNase freiem Wasser eluiert und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur cDNA-Synthese (s. 3.1.6) aufbewahrt.

3.1.6 In vitro Transkription

Für die Synthese der cDNA wurde die isolierte RNA (1 – 5 μg) in Wasser für 10 min auf $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt und dann für 2 min auf Eis gekühlt. Ready-To-Go You-Prime First Strand Beads werden in 30 μl der denaturierten RNA-Lösung rekonstituiert und der Reaktionsansatz nach Zugabe von 1 μl Random Primer pd (N)₆ und 2 μl DPEC-Wasser für 60 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

3.1.7 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

Die Konzentration der DNA und RNA wurde mit dem NanoDrop® ND-2000 UV/VIS Spektralphotometer gemessen. Dabei wird unter Bestrahlung mit einer Xenon-Blitzlampe das Absorptionsspektrum von 220 bis 750 nm gemessen. Die aromatischen Ringe der DNA haben die Eigenschaft UV-Licht bei einem Absorptionsmaximum von $\lambda = 260\text{ nm}$ zu absorbieren. Die Extinktion bei 280 nm entspricht dem Absorptionsmaximum der Proteine, die als Verunreinigung in der Probe vorliegen können. Der Quotient aus E_{260}/E_{280} gibt Aufschluss über die Reinheit der Präparation. Bei Werten unter 1.8 sind Proteinverunreinigungen enthalten. DNA- und RNA-Anteil können nicht unterschieden werden.

3.1.8 Amplifikation von DNA-Sequenzen mittels Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

Zur Amplifikation von definierten DNA-Bereichen wurde eine PCR mit Vorwärts- und Rückwärtsprimern, welche zur Zielsequenz komplementär sind (s. Tab. 2.1), freien Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTP's) dATP, dCTP, dGTP, dTTP, Reaktionspuffer und einer thermostabilen DNA-Polymerase durchgeführt. Grundsätzlich besteht der Zyklus einer PCR aus 3 Schritten: a. Denaturierung (Auftrennung eines DNA-Doppelstranges in seine Einzelstränge, welche der Polymerase als Template dienen), b. Primer-Annealing (durch Abkühlen der Temperatur wird spezifische Hybridisierung der Primer mit komplementären Sequenzen ermöglicht) und c. Extension (Oligonukleotidprimer werden durch Anfügen

komplementärer dNTP's bis zum Ende der Template-DNA durch die Taq-Polymerase bei 72 °C verlängert). Der Zyklus wird zwischen 20 und 40 Mal wiederholt. Nach Abschluss der Reaktion wird das Produkt mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft (s. 3.1.11).

Zur Amplifikation der FcRn VNTR Allele wurde eine PCR mit Hilfe des GC-RICH PCR Systems durchgeführt, welches eine effiziente Amplifikation GC-reicher Sequenzen ermöglicht. 60 ng genomischer DNA wurden mit 0.5 pM allelspezifischen Vorwärts (V)- und Rückwärtsprimern (R) (s. Tab.2.1), 0.2 mM dNTP's, 2.5 µl Lösungspuffer (Roche), 5 µl Reaktionspuffer (Roche) und 0.37 µl Enzymmix (thermostabile TaqDNA Polymerase und thermostabile Tgo DNA-Polymerase mit 3'-5' Exonukleaseaktivität, Roche) in einem Endvolumen von 25 µl aufgenommen und unter folgenden Bedingungen: 96 °C 10 min; für 32 Zyklen 95 °C 45 s, 52 °C 45 s, 72 °C 45 s; 72 °C 10 min, auf einem GeneAmp PCRsystem 9600 (Perkin Elmer) amplifiziert. Im Anschluss wurden die PCR-Produkte auf 1.5 % Agarose-Gelen mit Tris-Borat-EDTA (TBE) Puffer analysiert und mit Hilfe des Nukleinsäuremarkers GenSizer VII identifiziert (s. 3.1.11).

Geschachtelte PCR

Zur Amplifikation einer 1457 Basenpaare (bp) großen Region der α IIB cDNA wurde eine geschachtelte PCR durchgeführt. In der geschachtelten PCR werden zwei Primerpaare, ein inneres und ein äußeres verwendet.

In einem ersten Amplifikationsschritt wurden 5 µl der cDNA mit 5 µM Primer (s. Tab.2.1), 1.25 mM dNTP's und 1.25 U TaqGold Polymerase in einem Endvolumen von 25 µl mit dem GeneAmp PCRsystem 9600 (Perkin Elmer) unter folgenden Bedingungen amplifiziert: 95 °C 10 min; 30 Zyklen 93 °C 60 s, 55 °C 60 s, 72 °C 60 s). Dieses äußere Primerpaar produziert zuerst ein etwas größeres Amplikon (1. Amplikon), an dem in einem zweiten Amplifikationsschritt ein inneres Primerpaar bindet. Hierzu wurden 5 µl von 1:10 oder 1:100 verdünnten PCR-Produkten mit inneren Primern (s. Tab.2.1) unter identischen Bedingungen amplifiziert. Dieses amplifiziert in 30 weiteren Zyklen einen kleineren, intern gelegenen Abschnitt (2. Amplikon). Durch die entfallenden Nebenprodukte der ersten Amplifikation wird die Sensitivität und Spezifität der PCR erheblich gesteigert. Die PCR-Produkte wurden in einem 2 % igen Agarose-Gel aufgetrennt, isoliert (s. 3.1.11) und sequenziert (s. 3.1.12).

3.1.9 Quantifizierung von FcRn-spezifischen Transkripten mittels TaqMan® Echtzeit PCR (Real-time PCR)

Für die Quantifizierung von cDNA wurde eine TaqMan® Echtzeit-PCR mittels des ABI Prism 7000 Sequence Detection System durchgeführt. Hier wurde neben PCR Primern (s. Tab. 2.1) eine zur Zielsequenz komplementäre, kurze Oligonukleotid-Sonde eingesetzt, die mit einem fluoreszenzmarkiertem Reporterfarbstoff am 5' Ende (6-FAMTM, 6-Carboxyfluorescein) und einem nicht-fluoreszierenden Quencherfarbstoff (NFQ) am 3' Ende markiert ist (FAMTM-TaqMAN MGB Sonden: FCGRT Assay, ID Hs00175415_m1 und GAPDH Assay, ID Hs99999905_m1) (s. Tab. 2.1). Nach Laserlichtanregung bei 488 nm wird die Fluoreszenzemission des Reporterfarbstoffs durch einen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) auf den Quencher-Farbstoff unterdrückt (Förster-Typ Energie) (Förster 1948). Am 3' Ende der Sonde sind *minor groove binders* (MGB) gebunden, welche die Bindung zwischen Sonde und komplementärer Sequenz durch Schmelztemperaturerhöhung stabilisieren. Die PCR wird mit der AmpliTaq GoldTM Polymerase durchgeführt, die eine 5'-3'- Exonucleaseaktivität aufweist. Diese zerschneidet bei der Extension des PCR-Produkts die an der Zielsequenz gebundene Sonde, so dass die räumliche Nähe und damit auch der FRET zwischen Reporter- und Quencher-Farbstoff aufgehoben sind. Die Akkumulation von PCR-Produkten kann während des gesamten Prozesses kontinuierlich in Echtzeit über das ansteigende Fluoreszenzsignal gemessen werden. Die Reaktion erfolgte bei 50 °C 2 min, 95 °C 10 min, gefolgt von 40 - 50 Zyklen bei 95 °C 15 s, 60 °C 1 min. Die Quantifizierung erfolgt über Bestimmung des PCR-Zyklus (threshold cycle, ct), bei dem die Fluoreszenzintensität deutlich über der Hintergrundfluoreszenz liegt (Schwellenwert = threshold) und die Amplifikation exponentiell erfolgt. Als endogene Referenz wird ein nicht-reguliertes Haushaltsgen (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) mitgeführt und alle ermittelten ct-Werte darauf normalisiert (Δ ct-Wert). Die relativen Änderungen in der Genexpression wurden nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode berechnet (Livak and Schmittgen, 2001).

3.1.10 Site-directed Mutagenesis

Die site-directed mutagenesis ermöglicht den gezielten Austausch, Einführung (Insertion), oder die Entfernung (Deletion) von Aminosäuren. Es wurden zwei zueinander komplementäre Oligonukleotide (Vorwärts- und Rückwärtsprimer) verwendet (s. Tab. 2.1), die die gewünschte Mutation enthielten. Der QuikChangeTM Site-directed Mutagenesis Kit wurde für die Insertion der C>G Mutation in das Wildtyp β 3-Leu33 Konstrukt verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. In einer PCR-ähnlichen Reaktion wurde die Template-DNA

kopiert, so dass Plasmide mit der neuen Sequenz synthetisiert wurden. Nach Subklonierung in *E. coli*-Zellen wurden alle Konstrukte mit entsprechenden Primern (s. Tab. 2.1) für weitergehende Transfektionsstudien sequenziert (s. 3.1.12).

3.1.11 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren im Agarosegel

DNA ist unter nativen Bedingungen aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrates negativ geladen und kann daher im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Wanderung zur Anode erfolgt in einer Matrix aus Agarose nach dem Molekularprinzip. Die Größe der Poren ist von der Agarosekonzentration abhängig. Je höher die Konzentration desto kleiner sind die Poren und die Fragmente wandern langsamer durch das Gel. Es wurden Gele mit 1.5 – 3 % Agarose in TBE-Puffer gekocht und nach dem Abkühlen mit 0.1 µg/ml Ethidiumbromid, einem in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, versetzt. Das Gel wird in einen Gelschlitten mit Probentaschenkamm gegossen und polymerisiert. Die DNA-Proben wurden mit Probenpuffer erhöhter Dichte gemischt, in die Probentaschen neben dem Molekulargewichtsstandard aufgetragen und die Fragmente bei 100 – 120 V aufgetrennt. Die Visualisierung erfolgte mit dem Geldokumentationssystem unter UV-Licht.

Präparative Gel-Elektrophorese

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten nach einer Agarose-Gelelektrophorese wurden die gewünschten Fragmente unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Zur Reinigung und Aufkonzentrierung der DNA wurde das E.Z.N.A. Gel Extraktion Kits verwendet.

3.1.12 DNA-Sequenzierung

Die DNA Sequenzierungen erfolgten nach der enzymatischen Kettenabbruchmethode nach Sanger und Coulson (Sanger 1975) mit dem „ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit“. Zunächst wird die zu analysierende Sequenz über PCR amplifiziert (s. 3.1.8). Vor Durchführung der Sequenzier-PCR wurde das PCR-Produkt mit dem MultiScreen Vakuum Manifold (Millipore, Moisheim, Frankreich) in 2 Reinigungsschritten mit je 100 µl HPLC-Wasser aufgearbeitet. 10 - 100 ng dieses gereinigten PCR-Produkts, 1 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer (s. Tab.2.1), 2 µl Big Dye™ wurden für 25 Zyklen 96 °C 10 s, 50 °C 5 s und 60 °C 4 min im PCR Gerät inkubiert. Die zusätzlich zu den dNTP's zugebenen fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide (ddNTP's, Big Dye™) führen nach Einbau aufgrund der fehlenden 3'OH-Gruppe zum vorzeitigen Kettenabbruch.

Diese entstandenen Abbruchfragmente sind in ihrer Länge statistisch verteilt. Im Anschluss an die Sequenzier-PCR wurden die markierten DNA-Fragmente über eine Sephadexsäule (Sephadex™ G-50 Superfine) mit 10 µl HiDi-Formamid durch Zentrifugation für 5 min bei 2400 Upm aufgereinigt. Die Detektion der Sequenzen erfolgte über den ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer. Dieser trennt die aufgereinigten DNA-Fragmente über eine Gelmatrix in Kapillarelektrophoretetechnik, regt die Fluoreszenzen mit einem 488 nm Laser an und liest die Emission durch einen Konfokalscanner in 4 Kanälen gleichzeitig aus.

3.2 Zellbiologische Methoden

Die Zellkulturarbeiten wurden unter den sterilen Bedingungen einer Sicherheitswerkbank durchgeführt.

3.2.1 Isolierung von Monozyten

Mononukleäre Zellen wurden aus frisch entnommenem, EDTA-antikoaguliertem Vollblut gewonnen. Dazu wurden vier Mal 20 ml Vollblut mit jeweils 15 ml sterilem PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} in 50 ml PP Röhren versetzt, jeweils auf 15 ml Ficoll-Paque™ geschichtet und für 30 min bei 1500 Upm ohne Bremse zentrifugiert. Die Dichte des Glycogenpolymers Ficoll Paque™ liegt mit 1.077 g/l zwischen Erythrozyten (1.1 g/l) und mononukleären Zellen (1.07 g/l), so dass bei Zentrifugation der Dichtegradient zu einer Plasmaschicht, einem Interphasering aus mononukleären Zellen und einem Pellet aus Erythrozyten und Granulozyten führt. Der Interphasering wurde mit einer Transferpipette abgesaugt und dreimal mit PBS gewaschen (800 Upm 10min). Die pelletierten mononukleären Zellen wurden in sterilem PBS aufgenommen, gezählt und $1 \cdot 10^8$ Zellen in 400 µl PBS mit 100 µl paramagnetischen anti-CD14 Microbeads für 15 min bei 4 °C markiert. MACS® Microbeads sind 50 nm große Molekülkomplexe aus Eisenoxid und Polysacchariden. Nach einem Waschschrift mit 5 ml PBS wurden die Zellen in 400 µl PBS aufgenommen und über Positivselektion (Programm „Pssel D“) mit dem automatischen Magnet-assoziierten Zellsortierungsgerät (AutoMACS™) isoliert. Die mit den Microbeads markierten Zellen passieren eine Separierungssäule, die sich in einem starken, permanenten Magnetfeld befindet. Bei der Positivselektion bleiben die paramagnetisch markierten Zellen an der Säule haften und unmarkierte Zellen passieren als negative Fraktion die Säule. Nach Abschalten des magnetischen Feldes können die in der Säule verbliebenen Zellen als positive Fraktion eluiert

werden. Die isolierten Zellen wurden gezählt und zur RNA-Isolierung (s.3.1.4) oder im Zelladhäsionstest mit Kristallviolett (s.3.3.3) eingesetzt.

3.2.2 Kultivierung von eukaryontischen Zelllinien

Die Kultivierung von eukaryontischen Zellen erfolgte je nach Verwendungszweck in Zellkulturgewebescheiden oder –flaschen. Die Standardbedingungen waren eine gesättigte Wasserdampfatosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium erneuert, bevor eine Kultur vollständige Konfluenz erreicht hatte.

COS-7 Zellen

Die COS-7-Zellen wurden in DMEM mit „low glucose“ (1000 µg/ml) unter Zugabe von 10 % FKS (Gibco BRL) und 200 mM Glutamin, und Gentamycin (40 µg/ml) zur Selektion gehalten (Vollmedium). Nach 3 - 4 Tagen Wachstum waren die Zellen zu 80 – 90 % konfluent und wurden zur weiteren Kultivierung passagiert. Dazu wurden sie zweimal mit 7 ml D-PBS gewaschen und mit 1 ml Accutase zwei bis fünf Minuten behandelt, durch leichtes Klopfen der Zellkulturschale vom Boden gelöst. Nach Zugabe von 4 ml frischem Vollmedium wurde die Zellsuspension resuspendiert, und je 1 ml in neuen Zellkulturschalen mit 9 ml frischem Vollmedium kultiviert.

CHO-K1 Zellen

Die CHO-K1-Zellen wuchsen in α -MEM unter Zusatz von 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin. Diese Zellen wurden zweimal in der Woche in einem Verhältnis von 1:10 - 1:20 passagiert. Die stabilen Zelllinien wurden unter Zugabe von 500 µg/ml Geneticin und 250 µg/ml Zeocin kultiviert.

U937 Zellen

Die myeloischen U937 Zellen wurden in RPMI-Medium mit L-Glutamin unter Zusatz von 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Diese Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen in Suspension gehalten und zweimal in der Woche in einem Verhältnis von 1:6 - 1:12 passagiert.

3.2.3 *Einfrieren und Auftauen von Zellen*

Konfluent gewachsene Zellen einer Zellkulturschale wurden vor dem Einfrieren gewaschen, mit Accutase abgelöst und nach Zugabe von 5 ml frischem Medium abzentrifugiert (1200 Upm 5 min). Die Zellen wurden in 900 µl frischem, vorgekühltem Vollmedium resuspendiert, in eine Einfrierampulle mit 900 µl Einfriermedium (Vollmedium mit 20 % DMSO) überführt und für etwa 24 h bei -70 °C eingefroren und danach im flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Eingefrorene Zellen wurden schnell bei 37 °C aufgetaut, bis nur noch eine geringe Menge Eis vorhanden war. Die Zellen wurden in 5 ml frisches, warm gestelltes Vollmedium aufgenommen, abzentrifugiert (1200 Upm 5 min), in 2 ml frischem Vollmedium resuspendiert und auf einer Zellkulturschale mit 7 ml Medium kultiviert.

3.2.4 *Transiente Expression von allelspezifischen α Ib β Isoformen*

COS-7 und CHO-K1 Zellen

Ein Tag vor Transfektionsbeginn wurden $2.0 - 8.0 \cdot 10^5$ (60 mm Kulturschale) bzw. $0.5 - 2.5 \cdot 10^6$ (100 mm Kulturschale) COS-7 mit 9 ml DMEM Medium/10%FKS/1% Penicillin/Streptomycin oder CHO-K1 Zellen mit 9 ml α -MEM/10 % FKS/1 % Penicillin/Streptomycin ausgesät und bis zu einer Bedeckung von 80 % kultiviert.

Für die Transfektion wurden 2 µg pMPSV GPIIIa der Leu33 (HPA-1a) oder Pro33 (HPA-1b) oder Val33 (3. HPA-1 Allel) und 2 µg pMPSV GPIIb der Ile843 (HPA-3a) oder Ser843 (HPA-3b) in COS-7 oder CHO-K1 Zellen kotransfiziert.

Die Transfektion wurde Liposomen-vermittelt mit Hilfe des Effectene® Transfektionsreagenz nach Anleitung des Herstellers (Qiagen) durchgeführt. In einem ersten Schritt wird die Plasmid-DNA durch Interaktion mit einem Enhancer in einem definierten Puffersystem kondensiert. Das erleichtert die nachfolgende Bildung micellärer Strukturen mit dem liposomenhaltigen Reagenz Effectene. Dabei interagieren die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA-Moleküle mit der positiv geladenen Oberfläche der Liposomen. Dieses DNA-Reaktionsgemisch wird tropfenweise auf gewaschene, in frischem Vollmedium befindliche Zellen zugegeben. Die restlichen, freien positiven Ladungen auf den Liposomen interagieren dann wahrscheinlich mit Sialinsäureresten der Zelloberfläche und werden durch Endozytose oder Verschmelzen der Liposomen mit der Zellmembran in die Zelle aufgenommen. Die Zellen wurden für 48 h weiter kultiviert.

Nach 2 - 3 Tagen wurden die transfizierten Zellen mit Accutase abgelöst, die α Ib β 3-Oberflächenexpression durchflusszytometrisch untersucht und die Zellen im MAIPA Assay (s. 3.3.1), oder Immunoblot (s. 3.3.10), oder in der Immunpräzipitation (s. 3.3.11) analysiert. Ein weiteres Aliquot der Zellsuspension wurde unter Zugabe von Einfriermedium (1:1 Verhältnis; DMEM mit 20 % DMSO) in flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.2.5 Stabile Expression von allelspezifischen α Ib β 3 Isoformen in CHO-K1

CHO-K1 Zellen wurden mit allelspezifischen GPIIIa (Val33) und GPIIb (Ile843) Konstrukten mit Hilfe des Effectene®-Reagenz transfiziert (s. oben). Die Zellen wurden für 48 h im Brutschrank inkubiert und dann in Selektionsmedium (α -MEM, 10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 700 μ g/ml Geneticin, 250 μ g/ml Zeocin) passagiert. Nach einer 14-tägigen Kultivierung wuchsen die resistenten Zellen zu kleinen Kolonien heran. Das Medium wurde von der Schale vorsichtig abgesaugt, die Zellen zweimal mit 7 ml D-PBS gewaschen und mit 2 ml D-PBS überschichtet. Mit Hilfe von 100 μ l sterilen Pipettenspitzen wurden 48 Klone ausgewählt und in 24-er Klonierungsplatten überführt, die jeweils mit 3 ml Selektionsmedium in jedes Loch ausgesät wurden.

Die nach dem Picken verbliebenen Zellen (900 μ l) wurden unter Zugabe von 900 μ l Einfriermedium (1:1 Verhältnis, α -MEM mit 20 % DMSO) in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Nach 2 Tagen wurden die Zellen in 6-Lochplatten überführt und für mehrere Tage weiterkultiviert. Dann wurden die gewachsenen Zellklone geerntet und durchflusszytometrisch auf die α Ib β 3-Oberflächenexpression untersucht.

Um eine homogene α Ib β 3 Expression auf den Zellen zu erhalten, wurden die stabilen Zelllinien subkloniert.

3.2.6 Zellselektion

Eine Methode zur Zellselektion wurde mittels CELlection™ Pan Mouse IgG Kit durchgeführt. Dazu wurden 25 μ l Ziege anti-Maus IgG Beads in 1 ml Vollmedium mit 1 % Rinderalbumin (BSA) mit einem Magnetzellseparator pelletiert, in 25 μ l Medium mit 1 % BSA resuspendiert und mit 0.5 μ g der spezifischen mAK unter Rotation (160 Upm) für 30 min bei RT inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Beads in 25 μ l Medium mit 1 % BSA bei 4 °C (max. 5 Tage) bis zur Zellselektion gelagert.

Zur Subklonierung wurden die resistenten Zellklone aus einer Gewebekulturschale geerntet, mit PBS gewaschen (1200 Upm 5 min), in 0.5 ml Medium mit 1 % BSA resuspendiert und mit 25 µl vorbehandelten Partikeln für 30 min bei RT unter Rotation (160 Upm) inkubiert. Die antikörperbeladenen Zellen wurden dann mit Hilfe eines Magnetzellseparators selektiert und nach Waschen in 200 µl Medium mit 1 % BSA aufgenommen. Die auf diese Weise selektionierten Zellen wurden in 7 ml Selektionsmedium überführt und je nach Ausbeute auf eine 24-/6-Loch Platte kultiviert.

3.2.7 *Renilla-Luciferase Reporter-Gen-Assay*

Zur Untersuchung der transkriptionellen Aktivität des FcRn Promotors wurde ein Renilla-Luciferase Reporter-Gen-Assay (Dual-Luciferase® Reporter Assay) durchgeführt. In diesem System dient ein Biolumineszenz hervorrufendes Gen, das aus Leuchtkäfern (Firefly-Luciferase) entstammende Luc-Gen, als Reporter. Wird Luciferase in transfizierten Zellen als Reporter-Genprodukt hergestellt, kann die Aktivität des Enzyms *in vitro* durch eine Biolumineszenzreaktion in den Zelllysaten gemessen werden. Die Firefly-Luciferase wandelt Luciferin in Gegenwart von molekularem Sauerstoff, ATP und Mg^{2+} in Oxyluciferin und CO_2 um. Bei dieser Reaktion wird Licht einer Wellenlänge von 562 nm emittiert, das in einem Luminometer gemessen werden kann. Da die gemessene Lichtemission proportional zur Menge an Luciferase im Zelllysate ist, kann man direkt auf die Transkriptionsrate des Luciferase-Reportergens schließen.

Es wurde ein Luciferase-Reporterplasmid unter transkriptioneller Kontrolle des FcRn Promotors generiert. Die putative FcRn Promoterregion (-764 bis +1375) von VNTR genotypisierten Individuen (VNTR 1, 2, 3, 4 und 5) wurde mit entsprechenden Primern (s. Tab. 2.1) amplifiziert (s. 3.1.7) und die PCR Produkte in einer präparativen Agarose-Gelelektrophorese (s. 3.1.10) isoliert.

Für die weitere Klonierung der VNTR-Allele wurden das FcRn Promotorfragment-Amplifikat und der Vektor geschnitten. Die Ligation wurde in einem Volumen von 10 µl durchgeführt mit 50 ng geschnittener Vektor-DNA (1 µl) (Promega), 3 µl geschnittenes PCR-Produkt, 5 µl Rapid Ligation Premix 2x (Promega) und 1 µl Aqua über Nacht bei 4 °C.

Zur Vermehrung und Analyse wurden 5 - 50 ng (2 µl Ligationsansatz) dieses Konstruktes in 50 µl transformationskompetente *E. coli* (DH5α™) durch Hitzeschock transformiert (s. 3.1.1). Die transformierten Klone wurden auf Carbenicillin LB-Medium selektioniert,

vermehrt (Schüttelkultur) und die Plasmide über eine Midi-Präparation (s. 3.1.2) aufgereinigt und sequenziert (s. 3.1.12).

$4-8 \cdot 10^5$ U937 Zellen wurden am Vortag der Transfektion auf 24-Lochplatten ausgesät und über Nacht in RPMI-Medium mit L-Glutamin unter Zusatz von 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die anschließende Transfektion erfolgte mittels LipofektaminTM 2000 in serumfreien Medium (Optimem) entsprechend den Angaben des Herstellers (Invitrogen). Pro Ansatz wurden je 1 μg des Reporterkonstrukts und 1 μg des Firefly-Luciferase-Kontrollvektors pGL3 (Promega) kotransfiziert. In Parallelansätzen wurden U937 mit dem Kontrollvektor als positive Kontrolle (Promega) oder mit dem Reporterkonstrukt als negative Kontrolle transfiziert. Bei der hier benutzten kationischen Lipid-Methode bilden die Liposomen mit der DNA einen Komplex, der von den Zielzellen mit relativ hoher Effizienz aufgenommen wird.

Nach 48 h Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet, gewaschen, durch Zugabe von 100 μl PBL-Puffer 1x (Promega) von der 24-Loch Platte gelöst und durch wiederholtes Einfrieren (Ethanol/Trockeneisbad) und Auftauen (Wasserbad 37 °C) aufgeschlossen. Nach Abtrennung der Zellfragmente wurden 20 μl des Überstandes mit 100 μl des Luciferase-Substrates (LARII) (Promega) in einem FACS-Röhrchen gemischt und die Firefly-Luciferaseaktivität sofort in einem Luminometer bei 562 nm gemessen. Nach Inhibition der Firefly-Luciferaseaktivität durch Zugabe von 100 μl Stop&Glo Reagenz (Promega) wurde die Aktivität der Renilla-Luciferase bestimmt.

3.3 *Immunologische und biochemische Methoden*

3.3.1 *Monoclonal antibody immobilization of platelet antigens (MAIPA) Assay*

Die Aktivität plättchenreaktiver Antikörper wurde nach Standardprozedur eines glykoprotein-spezifischen Testverfahrens, dem MAIPA Assay untersucht (Kiefel, 1992; Kiefel et al., 1987).

Im MAIPA Assay wurden Thrombozyten oder stabile transfizierte CHO-Zellen (s. 3.2.5) als Testzellen verwendet.

Die Testthrombozyten entstammten einem Zellpool HPA-typisierter Spender des Thrombozytenlabors/Transfusionsmedizin Gießen oder wurden frisch isoliert aus 100 ml EDTA-antikoaguliertem Blut. Zur Thrombozytengewinnung wurde plättchenreiches Plasma

(PRP) durch Zentrifugation (800 Upm 25 min) gewonnen, die Thrombozyten pelletiert, dreimal mit NaCl/0.5 g % EDTA-Lösung (pH 6.5) gewaschen und die Zellzahl in einem Zellcounter (Sysmex) bestimmt. Gelagert wurden die Thrombozyten in NaCl/0.1% NaN₃ (pH 6.5) bei 4 °C unter Zusatz von 10 % Proteaseinhibitorcocktail (äquivalent zu 1 mg USP Pankreatin). Für die Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff wurden Plättchen mit RPMI/Tris (3:1) mit 10% DMSO/3.2 mM L-Glutamin und 10% AB-Serum auf eine Konzentration von 500.000/µl eingestellt. Zur Reaktivierung wurden die Plättchen bei 37 °C aufgetaut, mit 4 µl PGE1 versetzt, mit NaCl (pH 6.5) gewaschen und gezählt.

Vor Testbeginn wurde ein polyklonaler Ziege anti-Maus Fcγ spezifischer Antikörper (1:5000 in Bindungspuffer: 1.59 g Na₂CO₃, 2.93 g NaHCO₃, 0.2 g NaN₃ ad 1000 ml Aqua dest., pH 9.6) über Nacht bei 4 °C oder 2 h bei 37 °C an die Festphase einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Durch Blockieren mit TBS-Waschpuffer (3.63 g Tris, 15 ml Triton X-100, 1.5 ml Tween, 1.5 ml CaCl₂ ad 3000ml NaCl, pH 7.4) für 30 min bei 4 °C wird die Hintergrundgrundreaktion durch unspezifische Bindung mit Analyten und dem Detektionskomplex verhindert.

20*10⁶ frische bzw. kryokonservierte Plättchen oder rekombinante CHO-Zellen (Kroll et al., 2005b) in 0.2 % iger BSA-PBS-Lösung wurden mit 50 µl Humanserum und 10 µl eines gereinigten mAK (20 µg/ml) oder Kulturüberstand sequenziell, mit eingeführten Waschschritten, für jeweils 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit physiologischer NaCl Lösung (0.9%) wurden die Glykoproteine aus der Plättchenmembran mit 100 µl des Lysepuffers (0.121 g Tris, 0.5 ml Triton X-100 ad 100 ml NaCl) solubilisiert. Nicht-lysierte Zellmembranbestandteile wurden durch Zentrifugation (10.000 Upm 30 min) von den Lysatüberständen getrennt. 100 µl dieser verdünnten Antigen-Antikörper-Komplexe (1:5 in TBS-Waschpuffer) wurden jeweils in die Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert und für 90 min bei 4 °C inkubiert. Nach Entfernung nicht-gebundener Glykoproteinkomplexe wurden 100 µl eines PO-konjugierten Ziege anti-Human IgG Fcγ Antikörpers (1:4500 in TBS-Waschpuffer) pipettiert, für 2 h bei 4 °C inkubiert, gewaschen und gebundene Humanantikörper in einer chromogenen Enzymsubstratreaktion (15 min) nachgewiesen. Die Peroxidase katalysiert durch H₂O₂ die Umsetzung vom farblosen OPD in das orange-braun gefärbte 2,3-Diaminophenazin (DAP), wodurch eine Änderung der OD hervorgerufen wird. Nach Abstoppen der Reaktion mit 50 µl Stopplösung (2.5 N H₂SO₄) wurde die Änderung der OD photometrisch (Tecan) bei 492 und 630 nm gemessen. Eine positive Reaktion wird definiert als die Differenz der Extinktion gegenüber nicht-gecoateten Vertiefungen der

Mikrotiterplatte über 0.2. Klassifikation der Reaktionsstärken im MAIPA Assay: < 0.2 (-), 0.2 – 0.4 (+), 0.4 – 0.8 (++) , 0.8 – 1.2 (+++) , > 1.2 (++++).

Absorptionsexperimente nach Neuraminidaseverdau

Für einige Experimente wurden anti-HPA-3a Seren mit Neuraminidase behandelten oder unbehandelten Plättchen vorabsorbiert und anschließend im MAIPA mit unbehandelten Plättchen untersucht.

Für die Vorabsorption wurden $8 \cdot 10^7$ HPA-3a homozygote Plättchen in PBS/2% Rinderalbumin ohne oder mit Zugabe von 15 mU Neuraminidase für 6 h bei 37 °C inkubiert und zweimal mit PBS gewaschen. $4 \cdot 10^7$ unbehandelte und Neuraminidase-behandelte Plättchen wurden mit 70 µl der vorverdünnten Seren für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Plättchen wurden zentrifugiert (13000 Upm 3 min) und der Überstand erneut absorbiert. Die Überstände aus dem zweiten Absorptionsexperiment wurden dann im MAIPA Assay mit unbehandelten Plättchen analysiert.

3.3.2 Plättchen-Adhäsions-Immunfluoreszenz-Test (PAIFT)

Der PAIFT (von dem Borne et al., 1978) wurde im Standardverfahren nach modifiziertem Protokoll von Schnaider und Schneidt (Schneider and Schnaidt, 1981) durchgeführt. Thrombozyten können an Glasobjektträgern adhären. 10 µl HPA-typisierter kryokonservierter Thrombozyten ($2 \cdot 10^6$ Zellen) wurden nach Reaktivierung auf den Ring einer Hamaxplatte pipettiert und für 30 min bei RT sedimentiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden 10 µl des Patientenserums bzw. plättchenfreien Plasmas mit den Thrombozyten für 30 min bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit NaCl (pH 6.5) wurden 10 µl eines FITC-konjugierten anti-Human Antikörpers (1:50 in PBS, pH 6.5) zugegeben. Zur Humanantikörperbindung an die adhären Plättchen wurde für 15 min im Dunkeln inkubiert, die Thrombozyten gewaschen (NaCl, pH 6.5), in 10 µl Glycerin PBS (pH 6.5, 1:3) aufgenommen und die Reaktionen am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

3.3.3 Adhäsionstest mit mononucleären Zellen

Untersucht wurde die über den FcRn Rezeptor vermittelte Bindung der Monozyten an polyvalentes IgG in einem pH-abhängigen Adhäsionstest.

Humanes polyvalentes IgG wurde in einer Konzentration von 3 µg/well oder PBS an eine Mikrotiterplatte für 2 h bei 37 °C adsorbiert. Durch zweimaliges Waschen mit PBS wurde nicht-gebundenes IgG entfernt. Mononukleäre Zellen wurden durch paramagnetische Zellseparation (s.3.2.1) mittels AutoMACS® isoliert. Die aufgereinigten Monozyten wurden in RPMI 1640 mit L-Glutamin auf eine Konzentration von $8 \cdot 10^6$ /ml eingestellt und das Milieu auf einen pH von 7.2, 6.5 oder 6.0 mit Essigsäure angesäuert. $8 \cdot 10^5$ Zellen wurden je Vertiefung pipettiert und für 1 h bei 37 °C unter 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Nicht-gebundene Monozyten wurden in 2 Waschschritten mit PBS (pH 7.2, 6.5 und 6.0) vorsichtig mit einer Vakuumpumpe abgesaugt. Zur Fixierung wurden IgG-gebundene Monozyten mit 150 µl einer eiskalten Methanol/Aceton-Lösung (1:1, v/v) für 15 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Fixierlösung abgekippt und die Mikrotiterplatte trocken geklopft. Zum Anfärben wurden 50 µl einer Kristallviolettlösung (0.5 % Kristallviolett, 20 % Methanol, 79.5 % Aqua dest.) den Zellen zugefügt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Unter Leitungswasser wurde die Mikrotiterplatte gewaschen bis das Wasser klar war und getrocknet. Nach Zugabe von 100 µl einer Messlösung (Methanol/Essigsäure/Aqua dest. im Volumenverhältnis 4:1:5) wurde die Suspension in der Vertiefung leicht gemischt und die Intensität der Farbe photometrisch bei 592 nm gemessen.

3.3.4 *Reinigung von monoklonalen Antikörpern über eine Protein G-Säule*

Zur Aufreinigung von mAK aus Hybridomaüberstand oder muriner Aszitesflüssigkeit wurde eine Affinitätschromatographie über eine 1 ml Protein G-Säule (Hi Trap™ Protein G HP, Amersham) durchgeführt. Protein G ist ein Zellwandprotein aus Streptokokken der Gruppe C und G, welches eine starke Bindungsaffinität zur Fc Region von Immunglobulin G besitzt, d.h. es ist spezifisch für IgG. Durch diese Interaktion werden die meisten Nicht-IgG Kontaminanten aus der Probe entfernt.

Zelluläre Bestandteile in der Probe wurden abzentrifugiert (13.000 Upm 10 min 4° C), der Überstand im Verhältnis 1:2 mit Bindungspuffer (0.2 M Natriumphosphat, pH 7.0) verdünnt und über Filter einer Porengröße von 0.45 µm (Millipore) filtriert.

Zu Beginn wurde die Protein G-Säule mit 5 - 8 ml Aqua dest. gewaschen (1 Tropfen/sec, ca. 2 ml/min) und mit 10 - 15 ml Bindungspuffer equilibriert. Die vorbehandelte Probe wurde langsam auf die Säule aufgetragen und das Absorbat gesammelt. Nachfolgendes Waschen mit 20 ml Bindungspuffer diente zur Entfernung unspezifisch gebundener Komponenten. Eluiert wurden die mAK mit 6 ml Elutionspuffer (0.1 M Glycin-HCl, pH 2.7) und in einem 50 ml PP mit vorgelegtem Neutralisationspuffer (1 M 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 5 M Guanidin-Hydrochlorid-Lösung befüllt und für 30 - 60 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Säule mit 5 ml Bindungspuffer (0.2 M Natriumphosphat pH 7.0) gewaschen und mit warmem Triton X-100 (0.1 % in Aqua dest.) für 1 min 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 1 l PBS in Dialyseschläuchen (6.-8.000 MWCO) bei 4 °C dialysiert und mit Ultrafiltrationsmembransäulchen (YM-50 Säulen) bei 5000 g auf ein Volumen von 1 ml eingengt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration im BCA Assay (Pierce) (s. 3.3.6) wurden die Antikörper portioniert und bei -70 °C gelagert.

3.3.5 Isolierung von α Ib β 3- Plättchenprotein aus Plättchenkonzentraten

Das Plättchenglykoprotein α Ib β 3 wurde affinitätschromatographisch über eine reversible Interaktion mit dem α Ib β 3-komplexspezifischen mAK Gi5 isoliert.

3.3.5.1 Kopplung des Liganden an Trägermatrix

Voraussetzung für die Affinitätschromatographie war die kovalente, irreversible Bindung des Liganden (mAK Gi5) an eine wasserunlösliche polymere Matrix. Als Gelmatrix diente CyanBromid-aktivierte Sepharose 4B. Drei Gramm dieser Sepharose wurden in ein 50 ml PP eingewogen, für 15 min unter Rotieren in Aqua dest. zum Quellen belassen, über eine Fritte mit 600 ml 1 mM HCl für 15 min langsam gewaschen und getrocknet. Zur Kopplung von 10 mg mAK Gi5 an die Sepharose wurde eine Übernachtinkubation in 7.5 ml 2x Kopplungspuffer (0.2 M NaHCO₃, 1 M NaCl, pH 8.3) bei 4 °C durchgeführt. Die hier angewandte Bromcyan (CNBr)-Methode 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 den Aminogruppen des Antikörpers zu Isoharnstoffderivaten. Ungebundene Antikörper wurden durch Waschen mit 100 ml 1x Kopplungspuffer (0.1 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl, pH 8.3) entfernt und das Gel für 2 h bei Raumtemperatur in einer Blockierungslösung (0.1 M Tris, pH 8.0) inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose mit 200 ml 1x Kopplungspuffer und dann dreimal mit je 200 ml Acetatpuffer (0.1 M Na-Acetat, 0.5 M NaCl, pH 4.0) und Tris-Puffer (0.1 M Tris,

0.5 M NaCl, pH 8.0) abwechselnd gewaschen. Zur Lagerung wurde die Sepharose in 30 ml 1x Kopplungspuffer unter Zusatz von 0.01 % NaN₃ in 50 ml PP bei 4 °C aufbewahrt.

3.3.5.2 *Herstellung des Thrombozytenlysates*

Thrombozyten wurden aus abgelaufenen Apherese-Konzentraten von HPA-1a und HPA-1b homozygoten Spendern der Blutgruppe O isoliert (Transfusionsmedizin Gießen). Um eine ausreichende Proteinmenge zu isolieren, wurden mindestens vier Doppelpräparate pro HPA-1 Genotyp (1aa, 1bb) aufgearbeitet. Die Thrombozytenkonzentrate wurden auf 50 ml PP verteilt und die Thrombozyten bei 4000 g für 20 min bei 20 °C pellettiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet zweimal mit je 50 ml Waschpuffer (10 mM Tris, 3 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 7.4) zur Entfernung von Plasmaresten gewaschen (3500 Upm, 15 min). Die Plättchen von 3 Röhrchen wurden jeweils gepoolt, auf 50 ml mit Waschpuffer aufgefüllt und gezählt. Die Thrombozyten wurden mit Lysepuffer (92 % 20 mM 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 1 h auf Eis unter zwischenzeitlichem Vortexen (alle 10 min) lysiert. Anschließend wurde der Zelldebris bei 17.000 g für 45 min bei 4 °C pellettiert. Der Überstand wurde gesammelt, erneut bei 17.000 g bei 4 °C pellettiert und in 50 ml PP bei -70 °C bis zur Proteinisolierung aufbewahrt.

3.3.5.3 *Adsorption und Elution des Glykoproteins α IIb β 3*

Zur Affinitätschromatographie wurden 7.5 ml der mit Gi5 gekoppelten Sepharose in eine Säule (Amersham) gefüllt. Die Affinitätsmatrix wurde zunächst durch Waschen mit 1x Kopplungspuffer von NaN₃ Resten befreit. Vor dem Antigenauftrag wurde diese mit 50 ml Waschpuffer A (0.05 M Tris-HCl, 0.005 M NaCl, 0.1 % Triton X-100, pH 8.0), 30 ml Waschpuffer B (0.1 M Tris-HCl), 0.5 M NaCl, 0.1 % Triton X-100, pH 8.0) und 20 ml Waschpuffer A (Flussgeschwindigkeit 60 - 80 ml/h) equilibriert. Währenddessen wurde das Thrombozytenlysate aufgetaut, bei 3500 Upm zentrifugiert und durch Millipore-Filter mit einer Porengröße von 0.45 μ m filtriert. Zur Bindung von gerinnungsaktiven Plasmaproteinen (z.B. Fibrinogen) wurde der Gi5-Säule eine Sepharose-Säule mit polyklonalem Maus IgG (10 mg) vorgeschaltet. Das vorbereitete Thrombozytenlysate wurde bei einer Flussgeschwindigkeit von 10 ml/h über Nacht aufgetragen und der Durchlauf gesammelt. Nach beendeter Adsorption wurden die Säulen mit 100 ml Waschpuffer A, 50 ml Waschpuffer B und 50 ml Waschpuffer A bei einer Flussgeschwindigkeit von 60 - 80 ml/h gewaschen, um bei erhöhter Ionenstärke unspezifisch gebundene Komponenten zu entfernen. Eluiert wurde das gebundene α IIb β 3 Proteins unter sauren Bedingungen mit ca. 25 ml Elutionspuffer (0.1 M 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 (1 M Tris-HCl, pH 9.5), welche in Vorversuchen austitriert worden war, wurde entsprechend vorgelegt. Die ersten 5 ml des Proteineluates wurden getrennt von der Hauptfraktion gesammelt. Im Anschluss wurde die Säule mit ca. 50 ml Waschpuffer A regeneriert und vor dem Verwahren (4 °C) mit Kopplungspuffer und 0.1 % NaN₃ durchgespült.

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 30 min eingeweicht und das Eluat auslaufgesichert in die Dialysemembran eingeschlossen. Dialysiert wurde gegen 3 l PBS über Nacht bei 4 °C unter langsamem Rühren. Anschließend wurden die Eluate mit einem Ultrafiltrationsmembransälchen (YM-30) durch Zentrifugation bei 5000 g (4 °C) auf ein Endvolumen von ca. 1 - 4 ml eingengt.

Nach Konzentrationsbestimmung wurden die Eluate portioniert und bei -70 °C gelagert. Die Reinheit und Aktivität der Proteine wurde in der Silberfärbung (s. 3.3.9) und im Immunoblot (s.3.3.10) mit mAK gegen die α IIb und die β 3 Untereinheit und humanen anti- α IIb β 3 Seren überprüft.

3.3.6 IgG Aufreinigung aus Humansenen/-plasmen

Die Isolation der IgG Fraktion aus Humansenen oder -plasmen wurde mit dem „MelonTM Gel IgG Spin Purification Kit“ durchgeführt. Humane Plasmen wurden zuvor mit 12.5 mM CaCl₂-Lösung im Verhältnis 1:1 für 30 min bei 37 °C rekalkifiziert. Zur IgG Präparation wurden 50 μ l der Seren in 450 μ l Aufreinigungspuffer (Pierce) verdünnt. Die Aufreinigungssäulchen (Pierce) wurden mit 500 μ l Melon Gel (Pierce) beladen und nach dreimaligem Waschen (4000 Upm 30 s) mit 300 μ l Aufreinigungspuffer (Pierce) wurden 500 μ l der verdünnten Seren aufgetragen. Nach 5 minütiger langsamer Rotation wurde das IgG durch Zentrifugation (4000 Upm 1 min) in der Negativfraktion gewonnen. Vor der SPR-Analyse (s. 3.3.15) wurde die IgG Fraktion über Nacht in Dialysekartuschen gegen 500 ml PBS (Laufpuffer) dialysiert, filtriert (0.22 μ m) und die Proteingesamtkonzentration im BCA-Assay (s. 3.3.7) bestimmt.

3.3.7 *Proteinmengenbestimmung*

Die Proteinkonzentration wurde im BCA Assay nach Anleitung des Herstellers (Pierce) durchgeführt. In der BCA-Methode bilden Cu^{2+} Ionen unter alkalischen Bedingungen einen Komplex mit Peptidbindungen. Ein Cu^+ Ion wird durch zwei Moleküle BCA zu einem roten Farbkomplex gebunden, welcher sehr empfindlich nachgewiesen werden kann.

Thrombozytenlysate wurden in einer Verdünnung von 1:10 und 1:50 ausgetestet. Dazu wurden 25 μl der jeweiligen Probenverdünnungen mit 200 μl gebrauchsfertigem BCA-Reagenz in einer Mikrotiterplatte für 30 min bei 37 °C inkubiert und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 562 nm ausgelesen.

3.3.8 *Sodiumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)*

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen hinsichtlich ihrer Masse im elektrischen Feld. Durch die Bindung von SDS an die Proteine entstehen negativ geladene Protein-SDS-Komplexe mit einem konstanten Ladungs-Masse-Verhältnis. Im elektrischen Feld wandern diese Komplexe zum positiv geladenen Pol und werden durch den Molekularsiebeffekt in der Polyacrylmatrix nach ihrer Molekularmasse getrennt. Die SDS-PAGE wurde in einem 5 % igen Sammelgel bestehend aus 6.8 ml Aqua dest, 2 ml Acrylamid/Bisacrylamid (900 mM Acrylamid und 14 mM Bisacrylamid, Rotiphorese Gel 30), 1.25 ml Tris/HCl pH 6.8 (70 mM), 0.1 ml 10 % SDS (3 mM), 15 μl TEMED (0.13 %) und 375 μl APS (1.56 mM) und einem 7.5 % igen Trenngel bestehend aus 11.4 ml Aqua dest., 4.8 ml Acrylamid/Bisacrylamid (1000 mM Acrylamid, 16 mM Bisacrylamid, Rotiphorese Gel 30), 2.33 ml 3 M Tris/HCl pH 8.8 Puffer (360 mM), 0.188 ml 10 % SDS (3.4 mM), 25 μl TEMED (0.14 %) und 625 μl APS (1.42 mM) durchgeführt. Die Elektrophorese lief in 0.25 M Tris/1.92 M Glycin-Puffer/1% SDS (1:10 Rotiphorese SDS-PAGE 30) unter nicht-reduzierenden oder reduzierenden Bedingungen für 4.5 h bei 25 mA. Als Standard für die Molekulargewichte wurden 10 μl Rainbow Proteinmarker eingesetzt.

3.3.9 *Nachweis und Quantifizierung von getrennten Proteinen mit Silberfärbung*

Zum Nachweis der Proteine wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Das Gel wurde in 10 % Essigsäure und 30 % Methanol für 30 min fixiert und dann für 2 h bis über Nacht in eine Lösung aus 30 % Ethanol, 0.125 % Glutaraldehyd, 0.2 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ und 0.5 M Na-Acetat.) gelegt. Vor der Färbung wurde das Gel dreimal 5 min in Aqua dest. gewaschen, um den zur Komplexbildung der Ag^+ Ionen durch Proteine erforderlichen neutralen pH zu

generieren. Zur Färbung wurde das Gel für 30 - 40 min in einer Silbernitratlösung (0.1 % Silbernitrat, 0.2 % Formaldehyd mit Aqua dest.) getränkt. Während der Färbung bilden die Ag^+ Ionen Komplexe mit Glutamat-, Aspartat- und Cysteinresten. Anschließend wurde das Gel mit Aqua dest. gewaschen und zur Reduktion des komplexierten Ag^+ zu Ag eine 5 - 15 min Inkubation mit einer alkalischen Entwicklerlösung (2.5 % Na_2CO_3 , 0.1 % Formaldehyd) durchgeführt. Um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu verhindern, wurde die Reaktion für 10 min in 1.5 % $\text{Na}_2\text{-EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$ gestoppt.

3.3.10 Westernblot

Im Westernblot (Immunoblot) werden die Proteine in einer SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt, elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes übertragen und immobilisiert. Die Reaktionen der thrombozytären Antikörper mit den isolierten Glykoproteinen werden durch enzymmarkierte anti-Maus oder – Human Antikörper in einer spezifischen Enzym-Substrat-Reaktion direkt auf der Membran nachgewiesen.

Pättchenreiches Plasma (PRP) wurde aus 50 ml EDTA-antikoaguliertem Vollblut (1:6) HPA-typisierter Spender durch Zentrifugation (800 Upm 30 min) isoliert und zu gleichen Anteilen mit vorgewärmtem Puffer 1 (10 mM Tris, 3 mM EDTA, 150 mM NaCl, pH 7.4) gemischt. Die Plättchen wurden bei 2000 Upm 10 min pelletiert, zweimal gewaschen (2000 Upm 10 min) in Puffer 1 resuspendiert und gezählt. $4 \cdot 10^6$ Zellen/ μl wurden in Lysepuffer (20 mM Tris, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 4 mM N-Ethylmaleimide, 0.5 % NP-40, 1 mM Leupeptin, 1 mM PMSF, pH 7.4) für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (13.000 Upm 30 min 4°C) wurde die Lysate gepoolt und die Proteinmenge aus 1:10 und 1:50 verdünnten Lysaten im BCA-Assay bestimmt (s. 3.3.7). Die Proteinkonzentration wurde mit Lysepuffer auf 4 mg/ml eingestellt.

Zur elektrophoretischen Auftrennung wurden das Zelllysat 1:2 in 2-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer (4 % SDS, 15 % Glycerol, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, reduzierend mit 200 mM DTT) verdünnt und 3 min bei 99°C gekocht. Jeweils 100 μg des Zell-Lysates wurden in eine Geltasche (1.4 mg/Gel) aufgetragen und die Proteine in einer 7.5 % igen SDS-PAGE aufgetrennt (s. 3.3.8). Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine auf einer Nitrozellulosemembran (HibondTM-C extra, Amersham) transferiert. Für das Nassblotverfahren wurde das Gel zusammen mit der Nitrozellulose in Transferpuffer (20 mM

Tris, 150 mM Glycin, 20% Methanol, pH 8.5) für 15 min äquilibriert. Die Übertragung der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 50 V für 4 h unter Wasserkühlung bei 4 °C. Alternativ wurde ein Semi-Dryblot-Verfahren (Transferpuffer: Puffer A: 36.3 g Tris ad 800 ml pH 10.4, 200 ml Methanol; Puffer B: 3.03 g Tris ad 800 ml pH 10.4, 200 ml Methanol; Puffer C: 5.2 g epsilon-Aminocapronsäure ad 800 ml, 200 ml Methanol) für 1 h bei 0.8 mA/cm², 10 W durchgeführt.

Die Membran wurde in gleichmäßige Streifen mit einem Skalpell zugeschnitten und je Streifen mit 2 ml 1.5 % Rinderalbuminlösung (in ECL-Waschpuffer) zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für 1 h auf dem Rüttler inkubiert. Zur Immundetektion thrombozytenspezifischer Glykoproteine wurden 5 - 15 µg mAK bzw. 100 µl Kulturüberstand oder 50 µl der humanen Antiseren für 1 h bei RT inkubiert. Durch dreimaliges Waschen (3x15sec, 1x15min, 2x5min) mit ECL-Waschpuffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween 20, pH 7.4) wurden ungebundene Primärantikörper entfernt und die Antigen-Antikörperkomplexe mit einem PO-konjugiertem Sekundärantikörper (Esel anti-Human IgG oder -anti-Maus IgG) im Titer 1:100.000 für 45 min markiert. Nach einigen Waschschritten (3x15sec, 1x15min, 4x5min) wurden die biotinylierten Glykoproteine mit der Substratlösung (ECL Plusreagenz) für 5 min inkubiert und die Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm (Kodak X-OMAT AR) detektiert.

Immundetektion von anti-HPA-3 an Neuraminidase-verdauten Proteinen

Zur Desialylierung von dem Plättchenglykoprotein α IIb wurden 100 µl Lysat ohne oder mit 0.3 U/ml Neuraminidase (in 10 mM Calciumazetat, 100 mM Natriumazetat, pH 6.5) für 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden Immunpräzipitationen mit α IIb-spezifischen mAK mit antikörperbeladenen Protein A-Sepharose Beads durchgeführt wie nachfolgend beschrieben (s. 3.3.11). Die absorbierten Proteine wurden dann bei 99 °C eluiert und wie oben beschrieben analysiert.

Immundetektion von thrombozytenspezifischen Sialinsäuren mit WGA

Zur Detektion von thrombozytären Sialinsäuren wurde unbehandeltes und Neuraminidase-behandeltes Plättchenlysat präzipitiert, die Proteine in einer 7.5 %igen SDS-Page aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Nach einer Übernachtinkubation (16 h, 20 °C) mit 5 µg PO-konjugiertem Wheat-Germ Agglutinin (WGA) in PBS, 0.05 % Tween 20, 1 mM CaCl₂, 1 mM MnCl₂, 1 mM MgCl₂ und mehrmaligem Waschen wurde die Peroxidaseaktivität mit Chemilumineszenz detektiert (s. oben).

3.3.11 *Immunpräzipitation*

Im Immunpräzipitationstest werden biotinylierte Glykoproteine über eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion zwischen unlöslichem Protein A und thrombozytären Antikörpern immunpräzipitiert. Nachfolgend werden die isolierten Glykoproteine in einer SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und die biotinylierten Glykoproteine über eine Chemilumineszenzreaktion detektiert.

40 ml ACD-antikoaguliertes Vollblut (6:1 v/v, 3 μ M PGE1) gesunder, typisierter Spender wurde nach Abnahme 30 min in Schräglage bei 37 °C inkubiert. Durch Zentrifugation (800 Upm 25 min) gewonnenes PRP wurde zu gleichen Volumenanteilen mit vorgewärmtem Waschpuffer A (10 mM EDTA in PBS, pH 6.5) gemischt, die Plättchen durch dreimaliges Waschen (2000 Upm 10 min) isoliert und mit Waschpuffer A auf eine Konzentration von $1.3 \cdot 10^6/\mu$ l eingestellt.

$1.3 \cdot 10^9$ Plättchen wurden mit 100 μ l 5 mM N-Hydroxy-Succinimido (NHS)-LC-Biotin (Pierce) für 30 min auf Eis markiert. Ungebundenes Biotin wurde durch Waschen (3x 2000 Upm 10 min) der Plättchen mit 5 ml kaltem Waschpuffer B (20 mM Tris, 5 mM Glycin, 10 mM EDTA, 140 mM NaCl, pH 7.4) entfernt und die Plättchen mit 1 ml Lysepuffer (25 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 % TritonX-100, 1 mM PMSF, 1 mM Leupeptin, pH 7.4) für 30 min auf Eis inkubiert. Zur Biotinmarkierung von transfizierten Zelllinien wurde das Medium von den Gewebekulturschalen entfernt und die Schalen dreimal mit 7 ml PBS gewaschen. Zu jeder Schale wurden 2 ml 5 mM NHS-LC-Biotin in PBS gegeben und bei Raumtemperatur 30 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellen mit 1 ml Lysepuffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 2 mM PMSF) und Hilfe eines Gummistempels von der Schale geschabt. Das Lysat wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und für 30 min auf Eis inkubiert.

Das Plättchen- oder Zell-Lysat wurde abzentrifugiert (13000 Upm 30 min 4 °C) und an Protein-A-Sepharose CL-4B-Beads vorabsorbiert.

Dazu wurden 166 μ l einer 50 % igen Protein A Sepharose Bead-Lösung mit Immunpräzipitations-(IP) Puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, pH 7.4) gewaschen (2000 Upm 1 min) und mit 1 ml des Lysates, 133 μ l Rinderalbumin (100 mg/ml) und 33.3 μ l AB Serum für 30 min unter Rotieren inkubiert. Nach Zentrifugation (2000 Upm 1 min) wurde der Überstand erneut absorbiert.

100 μ l vorabsorbiertes Thrombozyten- oder 300 μ l Zell-Lysat wurden mit 5 μ g mAK bzw. 50 μ l Kulturüberstand oder 50 μ l Humansen über Nacht bei 4 °C präzipitiert. Nach Inkubation (1 h RT) mit 5 μ g Kaninchen anti-Maus oder -Human IgG Antikörper, welcher

eine hohe Affinität zu Protein A besitzt, wurde der Antigen-Antikörper-Komplex mit 50 µl Protein A Beads für 1 h präzipitiert. Die Beads wurden viermal mit IP-Puffer gewaschen (2000 Upm 1 min) und die Immunpräzipitate mit 80 µl zweifach konzentriertem SDS-Probenpuffer durch Kochen für 3 min im Thermoblock eluiert.

25 - 50 µl der Immunpräzipitate wurden in einer 7.5 % igen SDS-PAGE analysiert (s. 3.3.8). Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine auf einer Nitrozellulosemembran (HibondTM-C extra) transferiert (s. 3.3.10) und die Membran mit 8.3 µl PO-konjugiertem Streptavidin (1:3000 in Blockierungspuffer) für 30 min inkubiert. Nach einigen Waschschritten (3x15sec, 1x15min, 4x5min) wurden die biotinylierten Glykoproteine über eine Chemilumineszenzreaktion nach Inkubation mit dem ECL Plus Reagenz visualisiert.

3.3.12 Strippen von Membranen

Primär- und Sekundärantikörper zur Wiederverwendung von Nitrozellulosemembranen wurden mit 0.4 M Glycin-HCl (3x30 min RT) oder 0.4 M NaOH (1x30 min RT) gestrippt, die Membran mit TBS gewaschen und über Nacht mit 1.5 % Rinderalbumin-Blockierungslösung bei 4 °C inkubiert.

3.3.13 Detektion von Komplementbindung

3.3.13.1 Mikrokomplementbindungstest (MKBR)

Der MKBR basiert auf dem Nachweis komplementfixierender Antikörper (Colombani et al., 1971). Das Testsystem besteht aus einer Thrombozytensuspension, einem humanen Antiserum und einem Indikatorsystem aus Komplement und sensibilisierten Schafserythrozyten. Eine Antigen-Antikörper-Reaktion ist an einer fehlenden oder verminderten Hämolyse der sensibilisierten Schafserythrozyten erkennbar.

5 ml Hammelblutkörperchen (HBK) (Dade Behring) wurden dreimal in physiologischer NaCl-Lösung gewaschen (3000 Upm 15 min) und 0.6 ml dieser HBK mit 9.4 ml NaCl gemischt (HBK Suspension). Zur Einstellung einer konstanten Konzentration wurde photometrisch die Hämolyse bestimmt. Dazu wurden 2.9 ml Aqua dest. mit 0.1 ml der HBK Suspension gemischt und die Extinktion bei 546 nm (Filter Hg) gegen Aqua dest. als Leerwert gemessen. 10 ml der eingestellten HBK wurden mit 10 ml eines Kaninchen anti-HBK Antikörpers (Ambozeptorlösung 1:2000 in NaCl, Dade Behring) gemischt, für 30 min bei

37 °C im Brutschrank unter Schütteln und anschließend für 30 min 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.

Humane Antiseren oder Plasmen wurden zuvor für 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert und mit NaCl im Verhältnis 1:2 verdünnt.

Das Komplement (aus Meerschweinchen, Dade Behring) wurde entsprechend der Komplementtitrationsauswertung in Titern von 1:30 - 1:40 eingesetzt.

Zum Ansetzen der Komplementbindungsreaktion wurden 2 µl der inaktivierten Seren und 2 µl Komplement (oder NaCl als Negativkontrolle) mit einer Hamilton-Mikroliterspritze (100 µl) auf eine Mikrottestplatte pipettiert. Nach einer 1 h bei 37 °C wurden 2 µl der 1:2 verdünnten sHBK Suspension zugegeben, 30 min bei 37 °C inkubiert und der Hämolysegrad zunächst makroskopisch auf einem Leuchtkasten beurteilt (Hämolysegrad 4: > 80 % – negativer Antikörpernachweis; Grad 3: 50 – 75 % - ganz schwacher Antikörpernachweis; Grad 2: 25 - 50 % - schwacher Antikörpernachweis; Grad 1: deutlicher Antikörpernachweis; Grad 0: starker Antikörpernachweis).

3.3.13.2 *Durchflusszytometrischer Komplementbindungstest*

Die Bindung der Komplementkomponente C1q an Immunkomplexe aus Plättchenantigen und –antikörper wurde durchflusszytometrisch mit antigenbeschichteten Beads detektiert. Aufgereinigtes α IIB β 3 Protein (HPA-1a und -1b Isoform) (s. 3.3.5) wurde über eine Streptavidin-Biotinbindung an Dynal M-280 Beads immobilisiert. Die Biotinylierung des Proteins (30 µg) erfolgte in Gegenwart eines 20 - 30 fachen molaren Überschusses an N-Hydroxy-Succinimido-LC-Biotin (Pierce) für 1 h bei RT. Freies, ungebundenes Biotin wurde durch Filtration (YM-50 Säulchen) entfernt (ca. 5 min, 7000 Upm, 4 °C). Zur Immobilisation wurden 10 µg des biotinylierten Proteins mit 100 µl Streptavidin-Beads (Dynal M-280) unter sanftem Schütteln für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die antigenbeschichteten Beads (HPA-1a oder HPA-1b) wurden nach dem Waschen bei 4 °C bis zum Gebrauch in PBS gelagert (max. 4 Wochen). Zur Detektion der antikörpervermittelten Komplementbindung wurden 10 µl der HPA-1a oder HPA-1b Beads mit 20 µl inaktiviertem (30 min 56 °C) AB-Serum oder anti-HPA-1a Seren für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Waschen wurden jeweils 2.5 µg humanes gereinigtes Komplement C1q für 30 min bei 37 °C den Ansätzen zugegeben. Gebundenes C1q wurde über einen FITC-konjugierten Sekundärantikörper durchflusszytometrisch (s. 3.3.14) (FACS Calibur) detektiert. In Parallelansätzen wurde mit einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper die Bindung des Humanantikörpers überprüft.

3.3.14 *Durchflusszytometrie*

Zur Durchflusszytometrie wurde ein FACS Calibur Gerät (Becton Dickinson) verwendet. Ein Durchflusszytometer ist ein optisches Messsystem zur Analyse der Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von Partikeln in einer Suspension. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der hydrodynamischen Fokussierung. Dabei wird die zu untersuchende Partikelsuspension über eine Kapillare mit Überdruck in den Messbereich befördert, wobei das Probenmaterial zur Gewährleistung eines kontinuierlichen Flusses von einem Mantelstrom isotoner Pufferlösung (Trägerflüssigkeit) umgeben ist. Dieser Druck beschleunigt die Partikel beim Eintreffen am Analysenpunkt derartig, dass sie perlenkettenartig aneinandergereiht vorliegen. Am Analysenpunkt trifft monochromatisches Licht einer Wellenlänge von 488 nm, welches mit Hilfe eines fokussierten Argon-Laserstrahls generiert wird, auf die einzelnen Partikel. Der Laserstrahl regt die jeweiligen Fluorochrome bzw. deren Energieniveau an und beim Abfallen auf das Ursprungsniveau wird Licht einer charakteristischen, längeren Wellenlänge (Stokesverschiebung) emittiert. Durch das optische System bestehend aus Filtern, Spiegeln und optischen Linsen, wird das emittierte Licht aufgetrennt, so dass 6 verschiedene Parameter jeder Zelle erfasst werden können: der Anteil des vorwärts gestreuten Lichtes (Forward-Scatter FSC, 0 – 10 ° Winkel) korreliert zur Zellgröße, der Anteil des seitwärts gestreuten Lichtes (90 °, Side-Scatter SSC) zur Granularität der Zelle. Fluoreszenzemissionen werden mit dichromatischen Spiegeln in ihre spektralen Komponenten zerlegt und in 4 Kanälen (FL1 - 4) gemessen.

Die Darstellung erfolgte entweder als Histogramm, in dem Zellzahlen gegen Fluoreszenzintensitäten aufgetragen werden, oder als Punktwolkendarstellung, in der eine Zelle, entsprechend ihrer Fluoreszenz und Größe bzw. Granularität, durch einen Punkt repräsentiert wird. Zur Auswertung der Messungen wurde die Software Win-MDI 2.8 verwendet.

Nachweis der Antikörperbindung an Plättchen

PRP wurde aus ACD-antikoaguliertem Blut isoliert (800 Upm 25 min) und nach Zugabe von 111 µl ACD-A und 5 µl Apyrase in 1ml PRP die Plättchen pelletiert (2000 Upm, 7 min). Die Plättchen wurden in Tyrode-Puffer (TP: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 0.14 mM NaH₂PO₄, 1.75 % v/v BSA, 1 % v/v Glucose) mit 15 U Apyrase und 10 ATU Hirudin resuspendiert und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Plättchen dann in TB mit 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂ auf eine Konzentration von 3*10⁵/µl eingestellt und 30 ml dieser Plättchensuspension mit 20 µl Patientenserum oder 10 µl mAκ (0.02 mg/ml) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zur Detektion der Antikörperbindung wurde

Biotin-konjugiertes anti-Human IgG und FITC-konjugiertes Streptavidin oder FITC-konjugiertes anti-Maus IgG (DAKO) eingesetzt.

Nachweis der Antikörperbindung an CHO-Zellen

Transfizierte CHO-Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert wie zuvor beschrieben (Santoso et al., 1999). Dazu wurden CHO-Zellen einer Gewebekulturschale geerntet, in PBS gewaschen und in 1 % Paraformaldehyd für 3 min fixiert. 450 μ l der Zellsuspension ($10^6/\mu$ l) wurden nach dem Waschen mit 50 μ l der mA-K (20 μ g/ml) oder 20 bis 30 μ l der Antiseren für 30 min bei RT inkubiert. Gebundene AK wurden nach der Markierung mit 500 μ l anti-Maus oder anti-Human IgG (1:40) durchflusszytometrisch analysiert.

3.3.15 Oberflächenplasmonresonanz-Messung (Surface Plasmon Resonance, SPR)

Zur Messung der Oberflächenplasmonresonanz (SPR) wurde ein vollautomatisches BIAcore 2000 Gerät (BIAcore AB) eingesetzt. Mit dieser SPR Technologie lässt sich die Wechselwirkung zwischen unmarkierten Biomolekülen in Echtzeit ohne Waschprozedur analysieren. Dabei wird einer der Interaktionspartner (Ligand) auf der Sensoroberfläche immobilisiert (gereinigtes α Ib β 3 Protein), während der sich in der mobilen Phase befindliche Analyt (anti- α Ib β 3 mA-K oder gereinigte IgG Fraktion maternaler Seren) an der Sensoroberfläche angereichert wird. Die Änderung der Massenkonzentration an der Sensoroberfläche ist die Konsequenz aus der Assoziation und Dissoziation zwischen dem HPA-1 Antigen (HPA-1a und HPA-1b) und seinem korrespondierenden Antikörper und wird als SPR Antwort in einem Sensorgramm (Signalintensitätsänderung [Δ RU]) gemessen. Das Messsignal entsteht durch Reflektion und Refraktion monochromatischen Lichtes an der Grenzfläche zweier Medien (Glas, Sensoroberfläche), die sich hinsichtlich ihrer Brechungsindizes unterscheiden. Durch die Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper ändert sich der Brechungsindex in der Nähe der Sensoroberfläche, wodurch sich der Winkel des reflektierten Lichtes und damit das SPR Signal verändert (s. Abb. 3.1). Da der Brechungsindex für Proteinlösungen unabhängig von der Aminosäuresequenz ist, sind Änderungen des Brechungsindex direkt proportional zur Masse des Analyten. Die Einheit für das SPR Signal ist die Resonanzeinheit (RU), bei der 1000 RU einen Shift im Resonanzwinkel von 0.1 ° betragen. Eine Antwort von 1000 RU korrespondiert mit einer Änderung in der Oberflächenproteinkonzentration von 1 ng/mm².

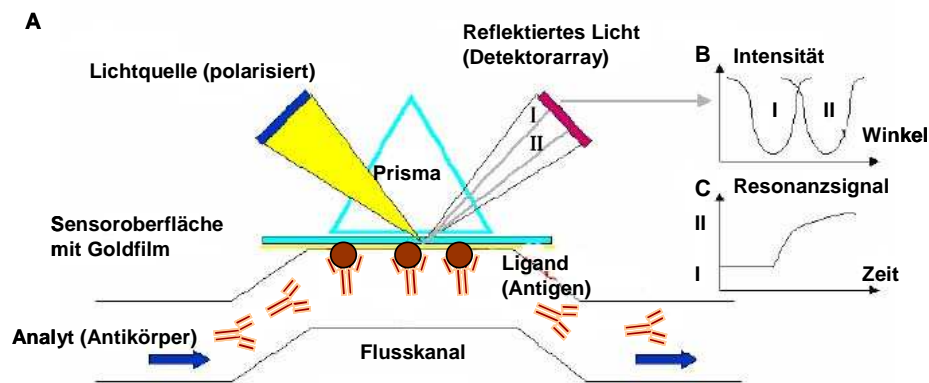


Abb. 3.1: Prinzip der Oberflächenplasmonresonanz Technologie.

(A) Das Antigen (Ligand) wird am Sensorchip kovalent gekoppelt, während der Antikörper (Analyt) als Lösung durch den Flusskanal über die Sensoroberfläche geleitet wird. Das eingestrahlte polarisierte Licht wird an der Grenzschicht zwischen Sensorchip und Lösung total reflektiert und von photoelektrischen Dioden reflektiert. Unter den Bedingungen der Totalreflexion regt ein bestimmter Winkel des eingestrahnten Lichts Oberflächenplasmonen in der Grenzschicht an, da diese mit einem Goldfilm bedeckt ist.

(B) Die absorbierte Lichtenergie zeigt sich als eine Verringerung der Lichtintensität bei einem bestimmten Winkel im reflektierten Lichtkegel. Die aus der absorbierten Lichtenergie entstehende evaneszierende Welle reicht etwa 300 nm in die Lösung hinein und wird von dem dort vorliegenden Brechungsindex beeinflusst. Binden jetzt viele Antikörper an das Antigen, so verändern sich Resonanzbedingungen und der Winkel des absorbierten Lichtes verschiebt sich (von I zu II).

(C) Diese Änderung wird als Resonanzsignal aufgezeichnet.

Abb. modifiziert aus <http://www.rci.rutgers.edu/~longhu/Biacore/MolecularInteractionAnalysis.html>

3.3.15.1 Immobilisierung von α Ib β 3-Protein

Die Sensoroberfläche besteht aus einem dextranbeschichteten Goldfilm (CM5-Chip). Die carboxymethylierte Dextranschicht erstreckt sich ca. 100 nm in das umgebende Medium. Diese hydrophile Matrix ermöglicht es, das α Ib β 3 Protein in nicht-denaturierter Form kovalent zu binden.

Das Plättchenprotein α Ib β 3 wurde aus Plättchenapherese-Konzentraten HPA-1a und HPA-1b homozygoter Spendern isoliert (s.3.3.5) und seine Reinheit und Aktivität mittels Silberfärbung (s. 3.3.9) und Immunoblot (s. 3.3.10) überprüft.

Pro Sensorchip konnten jeweils das HPA-1a und HPA-1b Antigen und gereinigtes Rinderalbumin (Pierce) als interne Kontrolle immobilisiert werden.

Zur kovalenten Aminokopplung wurde das Dextran durch eine 5-minütige Perfusion mit 0.4 M 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid (EDC) und 0.1 M N-Hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert. Der EDC/NHS-Komplex bildet auf der Dextranoberfläche aktive Ester, welche mit den Aminogruppen des immobilisierten Proteins reagieren. Vor seiner Immobilisierung wurde das α Ib β 3 Protein durch Reduzierung des pH Wertes mit 10 mM Natriumacetat (pH 4) auf eine pH Einheit unter seinem isoelektrischen

Punkt (pI) eingestellt. Dadurch erhalten Proteine eine positive Nettoladung und infolge ionischer Interaktionen kommt es zu einer Vorkonzentrierung der Proteine innerhalb der durch die sauren Carboxylgruppen negativ geladenen Dextranschicht. Nach einer kurzen Perfusion der Messkammer mit Laufpuffer (PBS) wurden 210 μl (21 μg) des Proteins (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) mit einer Geschwindigkeit von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ injiziert, bis ca. 9000 RU auf der Sensoroberfläche gebunden waren (Abb. 3.2). Diese Beladungsdichte erwies sich als optimal für die hier durchgeführten Messungen. Ungebundene Ester wurden durch Perfusion von 50 μl 1 M Ethanolamin abgesättigt. Die Sensoroberfläche wurde anschließend für mindestens 1 h mit Laufpuffer (Flussrate 100 $\mu\text{l}/\text{min}$) equilibriert. Während der Regenerationszyklen mit 25 mM NaOH veränderte sich das Immobilisationsniveau, so dass der Chip für maximal 50 Messungen verwendet wurde. Bei einer Lagerungstemperatur von 4 °C war der Chip für ca. 2 Wochen stabil.

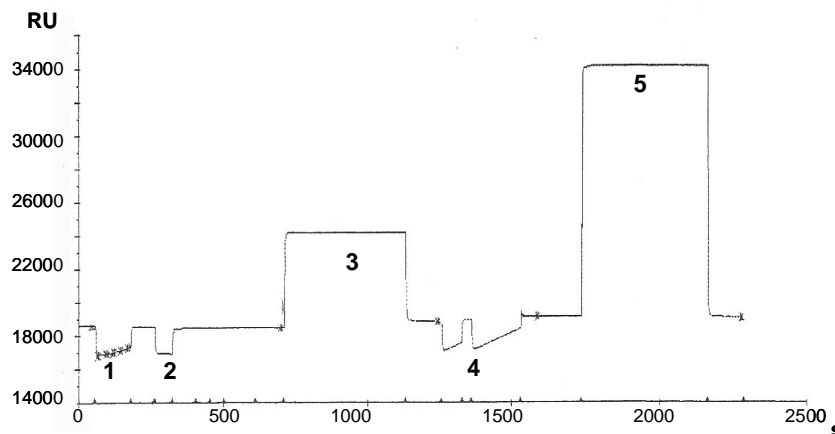


Abb. 3.2: Darstellung der Immobilisierungsprozedur.

Nach einer initialen Bestimmung der Bindungsrate (for Aim of Immobilization Level) (1) wird durch einen kurzen Waschimpuls (2) mit 1 M Ethanolamin das gebundene Antigen wieder entfernt. Die Sensoroberfläche wird mit einem Mix aus EDC/NHS aktiviert (3) und das Antigen zur Immobilisation injiziert (4). Anschließend wird die Sensoroberfläche zur Entfernung von ungebundenem Antigen mit 1 M Ethanolamin gewaschen (5). Zwischen den einzelnen Schritten wird mit Laufpuffer gespült.

Abb. aus BIACORE 2000 Instrument Handbook.

3.3.15.2 Messung der Antigen-Antikörper Interaktion mit SPR

Die Messungen erfolgten wegen der starken Temperaturabhängigkeit der SPR Prozesse bei einer Temperatur von 25 °C unter Verwendung von PBS/0.005 % P20 als Laufpuffer. Der Laufpuffer war die Lösung, in dem die Analyten vorlagen und wurde vor der Messung filtriert (0.22 μm). Aliquots von 25 μl mA-K (250 ng) oder humanem IgG (25 - 50 μg) wurden seriell mit der KINJECT Biacore Software injiziert bei einer Flussrate von 20 oder 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Ein Bindungsexperiment besteht aus 3 Phasen, 1. der Assoziation des Antikörpers an das Antigen, 2. der Dissoziation des Antikörpers und 3. der Regeneration der Sensoroberfläche mit 5 μl

25 mM NaOH (s. Abb. 3.3). Unterschiede zwischen dem Laufpuffer und der Probe (z.B. in der Ionenstärke) führten zu einem Indexsprung (bulk refractive index change), d.h. zu einem Sprung am Anfang und Ende der Messung. Durch die Subtraktion des Signals der Referenzzelle (Rinderalbumin) wurde dieser Puffersprung korrigiert, um präzise Auswertungen zu erhalten. Als Standardmessbedingungen für die Analyse von mAK wurde eine Assoziationszeit von 75 s und eine Dissoziationszeit von 130 s durchgeführt wie zuvor beschrieben (Santoso et al., 2006). Für die Analyse von humanem polyklonalem IgG wurde eine Assoziations- und Dissoziationszeit von je 150 s durchgeführt. Die Sensoroberfläche wurde mit 5 μ l 25 mM NaOH bis zum Erreichen der Basislinie regeneriert, so dass das SPR Signal zu dem Ausgangsniveau zurückgeht.

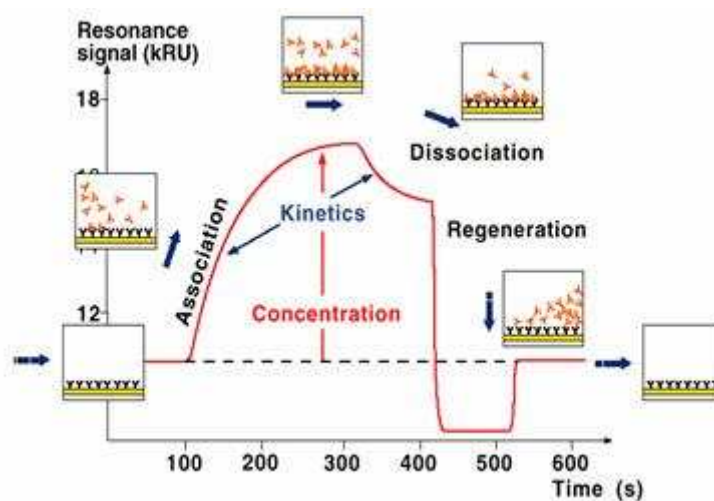


Abb. 3.3: Phasen der Antigen-Antikörperinteraktion im SPR Sensorgramm. Assoziation, Dissoziation und Regeneration der Sensoroberfläche in schematischer Darstellung. Abb. aus http://core.nhri.org.tw/images/BIAcore2000_clip_image002.jpg

Die Daten wurden ausgewertet mit der BIAevaluation Software Version 3.2 (BIAcore AB). Von der gemessenen Bindung in der Messzelle mit immobilisiertem Antigen wurde das unspezifische Hintergrundsignal in der Referenzzelle (Rinderalbumin) abgezogen.

3.4 Statistische Methoden

Zur statistischen Auswertung der experimentellen Daten wurden die SPSS-Software 12.0 und die SigmaStat-Software 3.1 verwendet.

4 Ergebnisse

I Heterogenität diaplazentarer Transportmechanismen in der FNAIT: der neonatale Fc Rezeptor als IgG Transporter

4.1 Phänotypische Relevanz eines Polymorphismus in der Promotorregion des FcRn Rezeptors und seine Rolle in der Pathogenese der FNAIT

Der neonatale Fc Rezeptor (FcRn) ist als hochaffiner IgG Rezeptor von großer Bedeutung für den diaplazentaren IgG Transfer (Ellinger et al., 2005; Firan et al., 2001; Simister et al., 1996) und die Aufrechterhaltung der IgG Hämöstate (Antohe et al., 2001; Ward et al., 2003). Genetische Variationen dieses Rezeptors können möglicherweise die antikörpervermittelten Pathologien des Feten und Neugeborenen beeinflussen. Während einer Sequenzanalyse von 20 Individuen wurde im Labor keine Missense-Mutation in der kodierenden Region (5 Exone) des FcRn Gens detektiert werden, aber ein Polymorphismus mit einer variablen Anzahl von Tandem Repeats (VNTR) in der Promotorregion. Der VNTR Polymorphismus besteht aus einer bis zu fünf Wiederholungen eines 37 bp langen Grundmotivs (VNTR Allele 1-5) (s. Abb. 4.1). Diese 5 Allele treten mit folgenden Frequenzen auf: 0.1 (VNTR1), 7.5 (VNTR2), 92.0 (VNTR3), 0.2 (VNTR4) und 0.2 % (VNTR5) (Sachs U.J., Socher I., Braeunlich C.G., Kroll H., Bein G., Santoso S., 2006).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob die beiden häufigsten Promotor-Varianten VNTR2 und VNTR3 mit einer unterschiedlichen Aktivität des Promotors assoziiert sind. Dies erfolgte durch Ermittlung der allelspezifischen Transkriptionsaktivität des Promotors, der Quantifizierung der mRNA, sowie des Rezeptorproteins am Monozytenmodell.

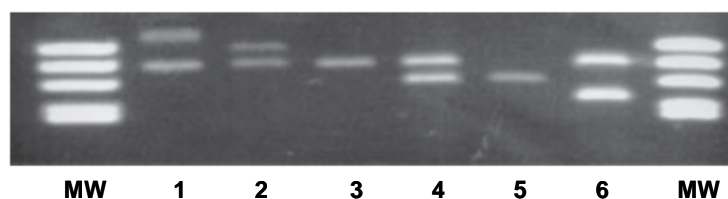


Abb. 4.1: Darstellung der PCR-Produkte von Individuen mit verschiedenen VNTR Genotypen. VNTR5/VNTR3 (1); VNTR4/VNTR3 (2); VNTR3/VNTR3 (3); VNTR3/VNTR2 (4); VNTR2/VNTR2 (5) and VNTR3/VNTR1 (6) ; VNTR - variable number of tandem repeats
MW: Molekularmarker

Der 5' untranslatierte Bereich des FcRn Gens wurde mit Vorwärts- und Rückwärtsprimern, welche die VNTR Region beinhalten, durch Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) amplifiziert.

4.1.1 Ein VNTR Polymorphismus beeinflusst die Transkriptionsaktivität des neonatalen Fc Rezeptor α -chain Promotors

Eine Genotypisierung von 420 Individuen hat gezeigt, dass Allele mit zwei (VNTR2) und drei (VNTR3) Wiederholungen am häufigsten in der kaukasischen Bevölkerung auftreten (7.5 vs. 92 %).

Hier wurde das FcRn Transkript von VNTR3/3 und VNTR2/3 Genotypen quantifiziert, um die phänotypische Relevanz des VNTR Promoterpolymorphismus zu analysieren.

Es wurden je 5 Individuen der relevanten Genotypen untersucht. VNTR3 Homozygote (VNTR3/3) und VNTR3 Heterozygote (VNTR2/3) unterschieden sich statistisch signifikant in ihren $2^{-\Delta C_T}$ Mittelwerten (0.073 ± 0.01 vs. 0.045 ± 0.011) ($p = 0.002$, Mann-Whitney U-Test) (s. Tab. 4.1).

Um die relative Zunahme des FcRn Transkripts in Homozygoten gegenüber Heterozygoten zu evaluieren, wurde die $\Delta\Delta C_T$ Methode angewandt (Livak and Schmittgen, 2001).

VNTR3 homozygote Individuen exprimieren das 1.66 Fache (95 % Konfidenzintervall: 1.28 - 2.04-fach) mehr an FcRn Transkript im Vergleich zu VNTR3/VNTR2 heterozygoten Individuen.

Diese Daten zeigen, dass das VNTR3 Allel zu einer effizienteren Transkription des FcRn Gens führt als das VNTR2 Allel.

Die Transkriptionsaktivität des FcRn Promotors wurde zur Bestätigung in einem Renilla-Luciferase Reporterplasmid-Assay analysiert. Dazu wurde die putative FcRn Promotorregion von der Position -764 bis +1375 amplifiziert (bezogen auf die FcRn Transkriptionsseite).

Die zwei häufigsten FcRn Allele VNTR3 und VNTR2 wurden in Renilla Luciferase Reporterplasmide kloniert, separat in myeloischen U937 Zellen transient exprimiert und ihre Fähigkeit zur Renilla Luciferase Reporter-gen-Transkription untersucht.

Das VNTR3 Allel führte im Vergleich zum VNTR2 Allel dazu, dass das Reporter-gen zweifach effektiver transkribiert wurde ($p < 0.01$) (s. Abb. 4.2).

Tab. 4.1: Relative Expression der FcRn messenger RNA aus Monozyten von VNTR3/3 homozygoten Individuen ist signifikant 1.66 fach höher als die von VNTR2/3 Individuen.

Individuen	VNTR Genotyp	ΔC_T	$2^{-\Delta C_T}$	MW $2^{-\Delta C_T} \pm$ STABW ($p = 0.002$)
1	3/3	3.73	0.0754	0.073 \pm 0.01
2	3/3	3.57	0.0842	
3	3/3	3.64	0.0802	
4	3/3	3.93	0.0656	
5	3/3	4.02	0.0616	
6	2/3	4.49	0.0445	0.045 \pm 0.011
7	2/3	4.34	0.0494	
8	2/3	4.36	0.0487	
9	2/3	4.16	0.0559	
10	2/3	5.18	0.0276	

Die Gesamt-RNA wurde aus Monozyten von genotypisierten Individuen isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine quantitative Expressionsanalyse mit FcRn spezifischen Primern mittels TaqMan PCR durchgeführt. Jede Probe wurde als Duplett angesetzt und 2 Wasserkontrollen (non template control, NTC) mitgeführt.

Ermittelt wurde der threshold cycle ΔC_T , bei dem die Fluoreszenzintensität die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Die Werte wurden auf die eines nicht-regulierten Haushaltsgenes (GAPDH) normalisiert. Die relative mRNA Expression wurde über die Ermittlung des $2^{-\Delta C_T}$ Wertes ermittelt (Livak and Schmittgen, 2001).

VNTR – variable number of tandem repeats; MW – Mittelwert; STABW - Standardabweichung

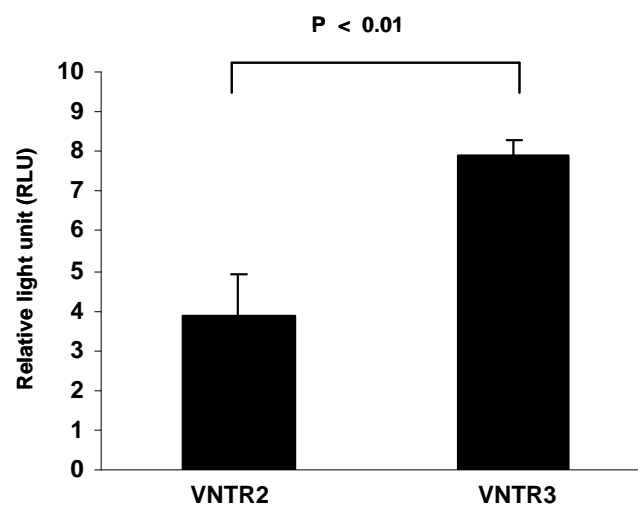


Abb. 4.2: Die Transkriptionsaktivität des FcRn Promoter Allels VNTR3 ist signifikant höher als die von VNTR2.

Die beiden häufigsten VNTR (variable number of tandem repeats) Promotorallele, VNTR2 und VNTR3, wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, die Transkription des Renilla Luciferase Reportergens in U937 Zellen zu unterstützen. Die Renilla Werte wurden auf die Aktivität des kotransfizierten Firefly Luciferase Kontrollplasmids normalisiert. Die Renilla Induktion wurde für jedes Allelkonstrukt in Doppelbestimmungen in drei unabhängigen Transfektionen reproduziert.

Dies bedeutet, dass eine höhere Anzahl von Tandem Repeats (VNTR) in der Promotorregion des FcRn Rezeptors eine optimale Transkription des FcRn Gens ermöglicht.

4.1.2 Eine variable Oberflächenexpression von FcRn beeinflusst die pH-abhängige IgG Bindung an Monozyten

Unter der Annahme, dass eine verstärkte Transkriptionseffizienz von FcRn zu einer erhöhten Expression von FcRn Rezeptoren führt, ist vorstellbar, dass der VNTR Promoterpolymorphismus die Menge an FcRn gebundenem IgG/Zelle (IgG Bindungskapazität) erhöht.

Es wurde die Adhäsionsfähigkeit humaner Monozyten von VNTR3/3 Homozygoten (n = 4) und VNTR2/3 Heterozygoten (n = 4) an immobilisiertes polyvalentes IgG analysiert.

Hier wurde die Monozytenadhäsion an IgG oder PBS Puffer (negative Kontrolle) bei einem pH von 6.5 und 6.0 analysiert. Die ermittelten Werte wurden auf die IgG Kapazität bei einem pH von 7.2 normalisiert, da in neutralem Milieu die IgG Bindung vorzugsweise durch andere IgG Fcγ Rezeptoren erfolgt.

Für Monozyten von 4 homozygoten VNTR3/3 Individuen wurde im Vergleich zu 4 VNTR2/3 heterozygoten Individuen eine statistisch signifikante Zunahme der IgG Bindung unter aziden Bedingungen beobachtet. Dieser Unterschied war bei einem pH von 6.0 stärker ausgeprägt als bei einem pH von 6.5 ($p = 0.021$ vs. $p = 0.041$, Mann-Whitney U-Test) (s. Abb. 4.3).

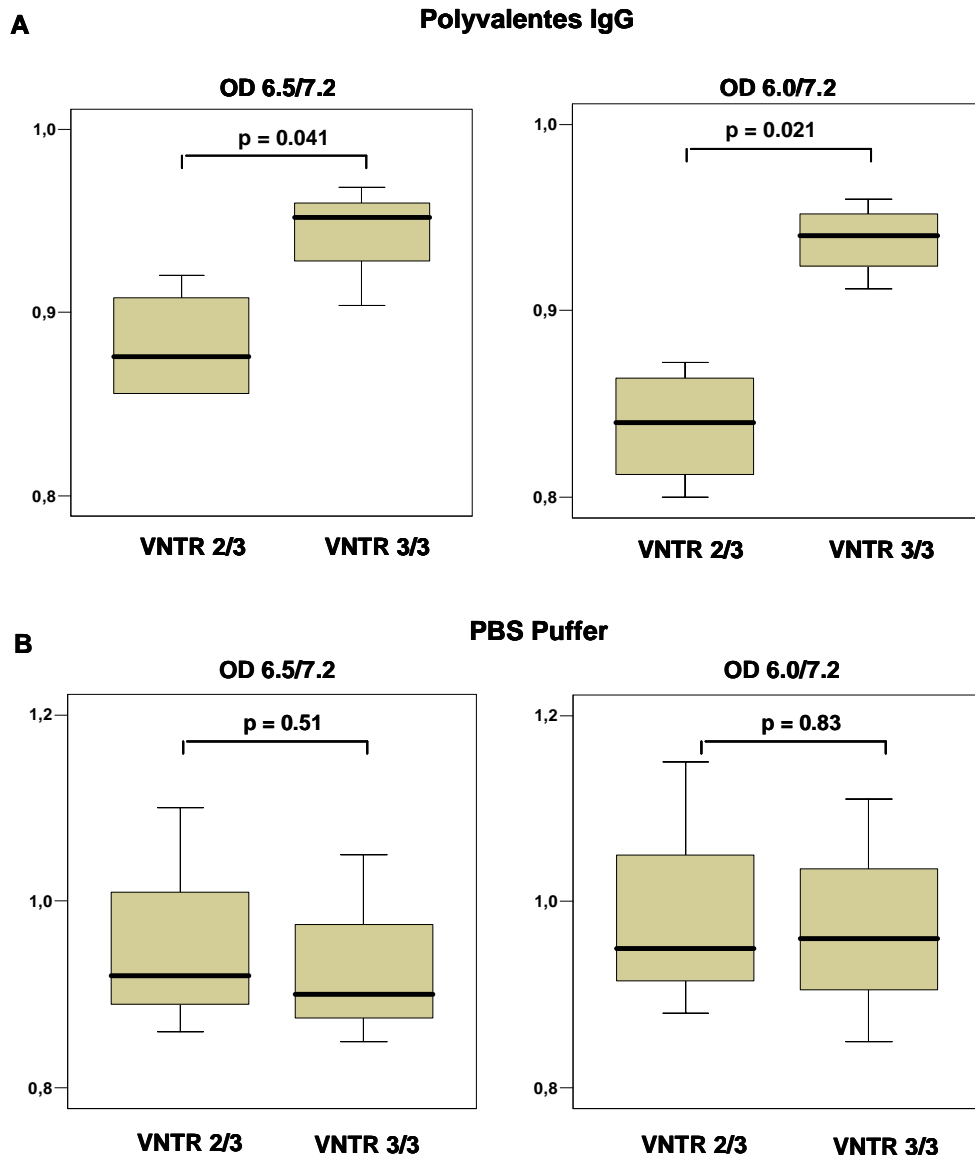


Abb. 4.3: Humane Monozyten von VNTR3/3 Individuen zeigen eine signifikant höhere IgG Bindung als die von VNTR2/3 Individuen.

Es wurden Monozyten von je 4 VNTR3/3 und VNTR2/3 Individuen isoliert. Zur Ermittlung der Adhäsion an immobilisiertes polyvalentes IgG (A) oder PBS als negative Kontrolle (B) wurden die Zellen bei einem pH von 6.0, 6.5 und 7.2 für 1 h bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Nach Kristallviolett färbung wurde die Intensität der Farbe photometrisch bei 562 nm gemessen.

Die Ergebnisse sind im Boxplot dargestellt. Die Mittellinie repräsentiert den Median, die untere und obere Begrenzung der Box die 25 und 75 % Perzentile. Die Fehlerbalken kennzeichnen die minimalen und maximalen Extremwerte.

VNTR – variable number of tandem repeats

Dies bedeutet, dass nicht nur die Expression der mRNA in Individuen mit einer höheren Anzahl von Tandem Repeats in der FcRn Promotorregion (VNTR3/3), sondern auch die IgG Bindungskapazität von Monozyten VNTR3/3 Homozygoter gegenüber der von VNTR2/3 Heterozygoten erhöht ist.

4.1.3 Einfluss der variablen Expression des neonatalen Fc Rezeptors auf die klinische Ausprägung der fetalen und neonatalen Alloimmunthrombozytopenie

Unter der Annahme, dass der neonatale Fc Rezeptor auf dem Synzytiotrophoblasten in Abhängigkeit vom VNTR Genotyp differentiell exprimiert wird, könnte eine erhöhte Expression von FcRn einen gesteigerten Transfer von IgG Antikörpern hervorrufen. Ein erhöhter Transfer von Alloantikörper gegen humane Plättchenalloantigene könnte damit eine die Ausprägung der Thrombozytopenie in der fetalen und neonatalen Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT) fördern.

In dieser Arbeit wurden die VNTR Allele des FcRn Rezeptors von 104 Feten (Kollektiv I, n = 54) bzw. Neugeborenen (Kollektiv II, n = 50) HPA-1a negativer Mütter, die von einer anti-HPA-1a induzierten FNAIT betroffen waren, mit allelspezifischen Primern genotypisiert.

Die klinischen Daten dieser Patienten wurden aus den Akten dokumentiert und sind in der Abb. 4.4 dargestellt.

Das Kollektiv I (antenal) umfasst fetale Proben von 54 Müttern, deren Immunisierung gegen HPA-1a bereits in der 1. Schwangerschaft (SS) für eine schwere Thrombozytopenie des Neugeborenen verantwortlich war. Während der 2. SS wurden zur antenatalen Therapie mehrmalig maternale Thrombozyten intrauterin transfundiert (IUTT = intrauterine Thrombozytentransfusion). Die fetalen Proben wurden während der intrauterinen Thrombozytentransfusion zu verschiedenen Zeitpunkten der Schwangerschaft entnommen.

Die fetale Plättchenzahl lag vor Beginn der Pränataltherapie im Mittel bei $51 \cdot 10^9/L$ (Schwankungsbereich: $1-214 \cdot 10^9/L$). In 38 Fällen war die Plättchenzahl $< 50 \cdot 10^9/L$, in 16 Fällen $\geq 50 \cdot 10^9/L$. Es besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Ausprägung der Thrombozytopenie vor der ersten intrauterinen Thrombozytentransfusion und zunehmender Schwangerschaftswoche (SSW) ($p < 0.05$) (s. Abb. 4.4A)

Die minimale fetale Plättchenzahl lag während der Pränataltherapie bei $19 \cdot 10^9/L$ (Schwankungsbereich; $1 - 110 \cdot 10^9/L$). In 48 Fällen war die Plättchenzahl $< 50 \cdot 10^9/L$, in 6 Fällen $\geq 50 \cdot 10^9/L$. Diese Werte waren nicht mit der SSW assoziiert ($p = 0.303$) (s. Abb. 4.4B).

Das Kollektiv II (postnatal) umfasst 50 postpartal entnommene Proben von Neugeborenen mit einer FNAIT. 43 der Patienten waren von einer schweren Thrombozytopenie mit Plättchenzahlen $< 50 \cdot 10^9/L$ betroffen. Die minimale postnatale Plättchenzahl lag bei

$19 \cdot 10^9/L$ (Schwankungsbereich: $5 - 107 \cdot 10^9/L$). Die Thrombozytopenie manifestierte sich in 3 Fällen in intrakraniellen Blutungen (Grad 4, Median der minimalen Plättchenzahl: $9 \cdot 10^9/L$), in einem Fall in gastrointestinalen Blutungen (Grad 3, Median der minimalen Plättchenzahl: $20 \cdot 10^9/L$), in 27 Fällen in subkutanen Blutungen (Grad 2, Median der minimalen Plättchenzahl: $24 \cdot 10^9/L$). Neunzehn der Neugeborenen zeigten keine Blutungszeichen (Grad 1, Median der minimalen Plättchenzahl: $39 \cdot 10^9/L$). Die Ausprägung der Blutungsneigung war signifikant mit der minimalen Plättchenzahl assoziiert ($p < 0.05$) (s. Abb. 4.4C).

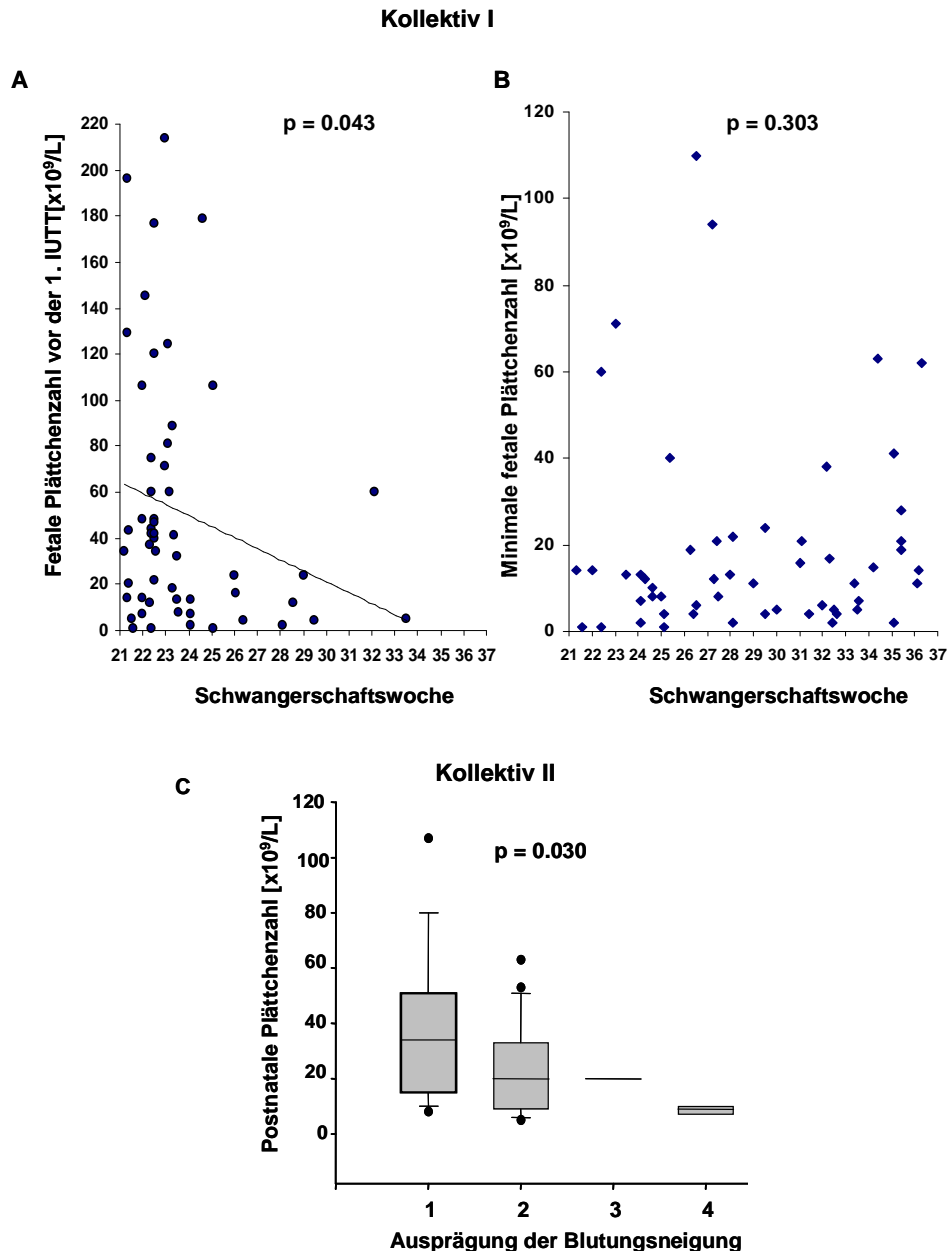


Abb. 4.4: Aus den Patientenakten dokumentierte klinische Daten der FNAIT Patienten.

Das Kollektiv I umfasst 54 fetale Proben. (A) Es besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Ausprägung der Thrombozytopenie vor der ersten intrauterinen Thrombozytentransfusion (IUTT) und zunehmender Schwangerschaftswoche (SSW) ($p < 0.05$). (B) Die minimale fetale Plättchenzahl während der Pränataltherapie war nicht mit der SSW assoziiert ($p = 0.303$).

(C) Das Kollektiv II umfasst 50 postpartal entnommene Proben von Neugeborenen mit einer FNAIT. Die Ausprägung der Blutungsneigung war signifikant mit der minimalen Plättchenzahl assoziiert ($p < 0.05$).

Die in dieser Arbeit ermittelten Frequenzen der VNTR Allele 2 und 3 bei FNAIT Patienten wurden mit den verfügbaren Daten eines Kollektivs gesunder Individuen ($n = 420$) verglichen. Es wurden keine Unterschiede in den Frequenzen der VNTR3 und VNTR2 Allele vorgefunden (s. Tab. 4.2). Die niedrig-frequenten VNTR Allele VNTR1 (0.1 %), VNTR4 (0.2 %) und VNTR5 (0.2 %) wurden in der Population der FNAIT Patienten nicht beobachtet.

Tab.4.2: Frequenzen der VNTR2 und VNTR3 Allele in einer Normalpopulation und der FNAIT sind ähnlich.

	Anzahl (N)			Allelfrequenzen [%]	
	Gesamt	VNTR2	VNTR3	VNTR2	VNTR3
Gesunde Individuen	420	64	356	7.5	92.0
FNAIT Kollektiv I	54	6	48	5.6	94.4
FNAIT Kollektiv II	50	8	42	8.0	92.0

Die VNTR (variable number of tandem repeats) Allele von 104 FNAIT Patienten (Kollektiv I – antenatal; Kollektiv II – postnatal) wurden mit FcRn spezifischen Primern in einer Polymerasekettenreaktion genotypisiert. Die Frequenzen der Allele wurden ermittelt und mit den dokumentierten Frequenzen einer Normalpopulation verglichen.

Die klinischen Parameter im Kollektiv I (fetale Plättchenzahl vor der ersten IUTT; minimale fetale Plättchenzahl während Pränataltherapie) und im Kollektiv II (minimale postnatale Plättchenzahl) wurden auf eine Assoziation zum VNTR Genotyp analysiert. Die Ausprägung der Blutungsneigung (Grad 1, 2, 3, 4) konnte aufgrund der geringen Fallzahl nicht als Parameter herangezogen werden.

Keiner der untersuchten Parameter war mit dem VNTR Genotyp statistisch signifikant korreliert (s. Abb. 4.5).

Die fetale Thrombozytenzahl vor der ersten intrauterinen Thrombozytentransfusion (Kollektiv I) war nicht mit dem VNTR Genotyp assoziiert ($p = 0.794$) (s. Abb. 4.5A).

VNTR3/3 Homozygote im Kollektiv I zeigen aber eine Tendenz zu geringeren minimalen fetalen Plättchenzahlen gegenüber VNTR2/3 Heterozygoten ($18 \cdot 10^9/L$ vs. $33 \cdot 10^9/L$) ($p = 0.329$) (s. Abb. 4.5B).

In ähnlicher Weise wurden im Kollektiv II für VNTR3/3 Homozygote geringere minimale postnatale Plättchenzahlen im Vergleich zu VNTR2/3 heterozygoten Individuen beobachtet ($26 \cdot 10^9/L$ vs. $42 \cdot 10^9/L$) ($p = 0.267$) (s. Abb. 4.5C).

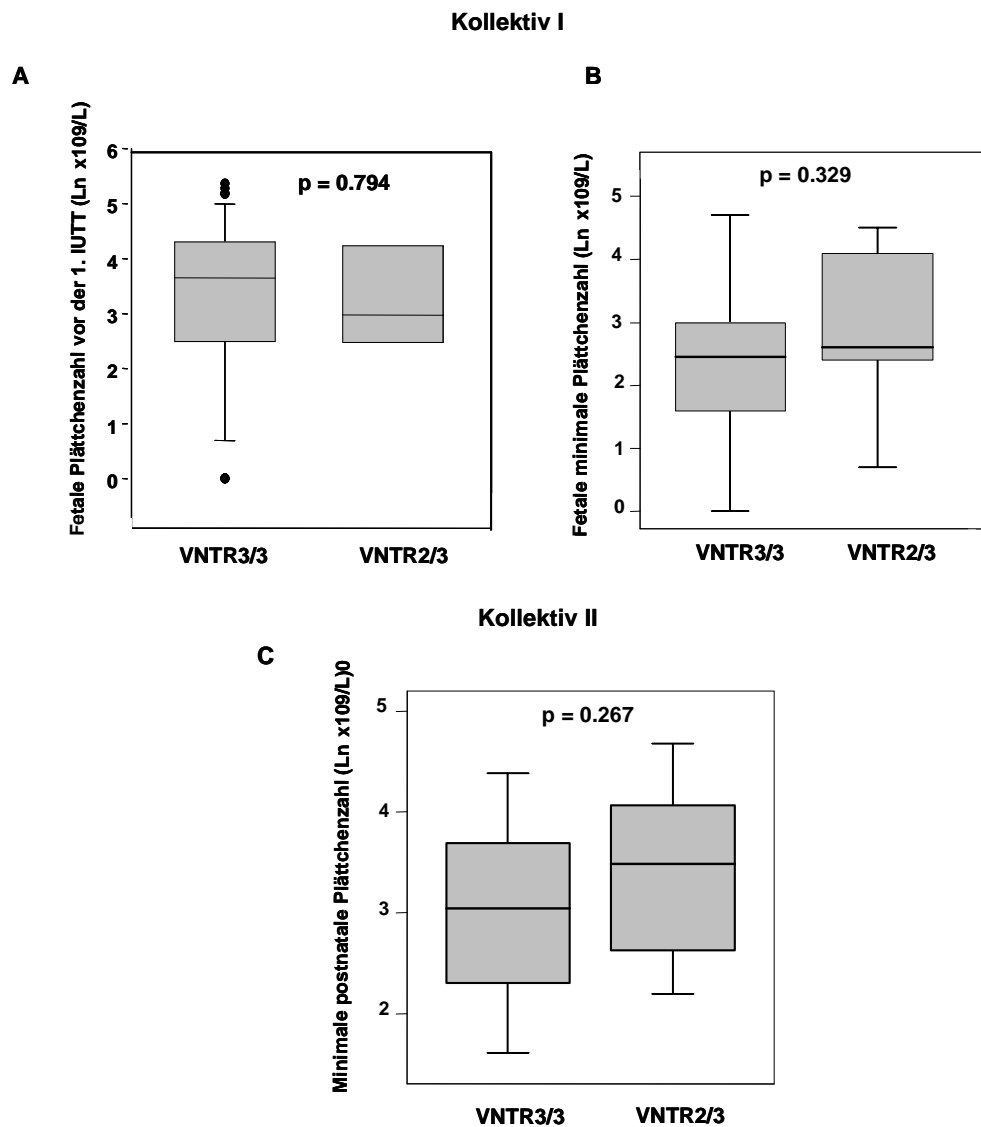


Abb. 4.5: Der VNTR Genotyp zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die fetale und neonatale Plättchenzahl.

Kollektiv I mit 54 fetalen Proben. (A) fetale Plättchenzahl vor 1. intrauteriner Thrombozytentransfusion (IUTT) ist nicht mit dem VNTR Genotyp assoziiert ($p = 0.794$). (B) VNTR3/3 Homozygoten zeigen eine Tendenz zu geringeren minimalen fetalen Plättchenzahlen gegenüber VNTR2/3 Heterozygoten ($18 \cdot 10^9/L$ vs. $33 \cdot 10^9/L$) ($p = 0.329$).

Kollektiv II mit 50 postnatalen Proben. (C) VNTR3/3 homozygote Individuen zeigen eine Tendenz zu geringeren minimalen postnatalen Plättchenzahlen im Vergleich zu VNTR2/3 heterozygoten Individuen ($25 \cdot 10^9/L$ vs. $42 \cdot 10^9/L$) ($p = 0.267$). VNTR – variable number of tandem repeats: vs. = versus

Dies bedeutet, dass der VNTR3/3 Phänotyp keinen biologisch signifikanten Einfluss auf die Schwere der Thrombozytopenie bei Feten bzw. Neugeborenen HPA-1a negativer Mütter hat.

II Heterogenität von plättchenspezifischen Alloantikörpern gegen das Integrin α Ib β und deren Auswirkung auf die klinische Ausprägung und Diagnostik der FNAIT

4.2 Eine natürliche Leu33Val Mutation im β -Integrin definiert einen Split des HPA-1a Epitops: Bedeutung für die klinische Ausprägung der Alloimmunthrombozytopenie

Vor kurzem wurde eine seltene, natürlich vorkommende Leu33Val Mutation (C175G) auf dem β 3-Integrin identifiziert, welche das dritte Allel von HPA-1 definiert (Santoso S., Kroll H., Andrei-Selmer C.L., Socher I., Rankin A., Kretzschmar E., Watkins N.A., 2006). Zum besseren Verständnis der folgenden Kapitel werden in der Abb. 4.6 die vom Kooperationspartner durchgeführten Ergebnisse der Lightcycler- und Sequenzanalyse dargestellt. Während der HPA-1 Genotypisierung mittels Lightcyclertechnik wurde für ein Individuum aus einer Kohorte von 1910 Patienten mit thromboembolischen Erkrankungen eine außergewöhnliche Schmelzkurve beobachtet. Die Schmelzkurve für das HPA-1b Allel (Pro33) zeigte die bekannte Schmelztemperatur von 69 °C, während in der HPA-1a Kurve eine Verschiebung der Schmelztemperatur von 60 auf 53 °C detektiert wurde. Eine Sequenzierung der β 3-cDNA enthüllte eine heterozygote C175G Transition im Exon 3, welche eine Missense-Mutation von Leucin (CTG) zu Valin (GTG) an der Position 33 des reifen β 3-Integrins bedingt (Pro33Val33) (s. Abb. 4.6B). Die vom Thrombozytenlabor durchgeführte SSP-PCR Genotypisierung von 2950 gesunden Blutspendern konnte nur ein einziges weiteres heterozygoten Leu33Val33 Individuum mittels einer neuen TaqMan® PCR identifizieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Aufklärung der HPA-1 Alloantikörperheterogenität und dem Einfluss der neutralen Val33 Mutation auf die Struktur des HPA-1 Epitops β 3-cDNA Konstrukte mittels site-directed Mutagenesis hergestellt, welche im Bereich der epitopbildenden Sequenz die Val33 Mutation enthalten. Diese β 3-Konstrukte wurden mit Hilfe eines geeigneten Expressionsvektors auf CHO-K1 und COS-7 Zellen exprimiert. Die rekombinanten Proteine wurden mit bekannten plättchenspezifischen mono- und polyklonalen HPA-1 Alloantikörpern im Vergleich zu den natürlichen Isoformen β 3-Leu33 und β 3-Pro33 untersucht (Durchflusszytometrie, Immunpräzipitation, MAIPA Assay).

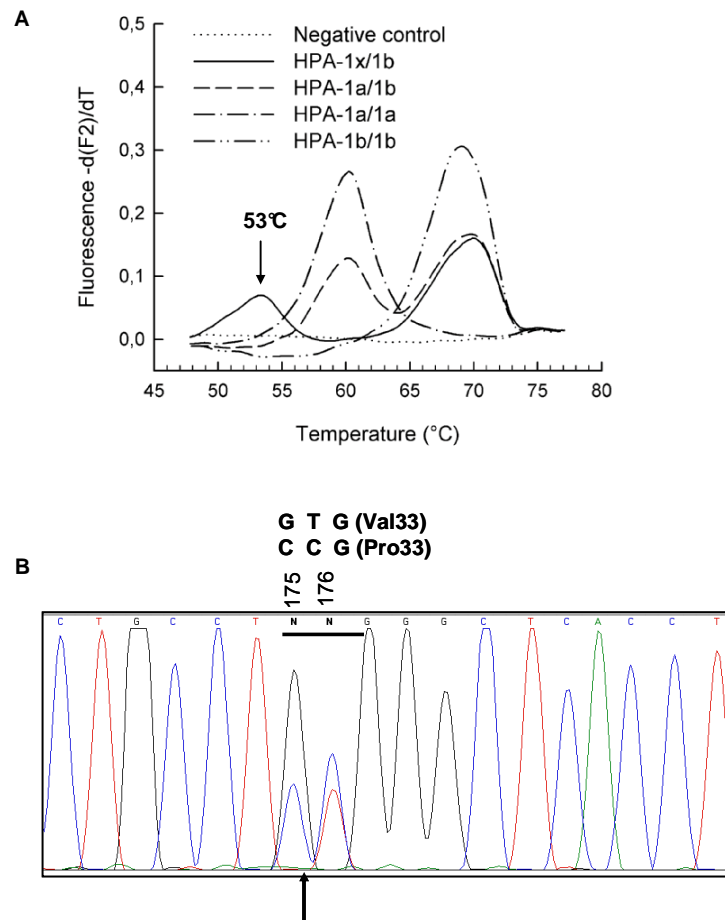


Abb. 4.6: Identifizierung einer neuen β 3-Val33 Punktmutation mittels Lightcycler-Technik und Sequenzanalyse.

(A) Schmelzkurve des heterozygoten Pro33Val33 Individuums. Der Shift in der HPA-1a Schmelztemperatur von 60 auf 53 °C ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

(B) Die β 3-cDNA (Exon 3) wurde mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Die Sequenzierung enthüllte eine heterozygote C175G Transition in der β 3-cDNA, welche eine Missense-Substitution von Leucin (CTG) zu Valin (GTG) an der Position 33 des reifen β 3-Integrins bedingt.

Leu – Leucin; Pro – Prolin; Val – Valin. Abb. modifiziert aus (Santoso et al., 2006).

4.2.1 Die Leu33Val Mutation verändert nicht die Oberflächenexpression des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$

Zur Generation der β3 -Val33 Isoform wurde in das Wildtyp β3 -Leu33 Konstrukt eine C>G Mutation mittels ortsgerichteter Mutagenese eingeführt und der Basendimorphismus (C175G) durch Sequenzanalyse mit entsprechenden Primern überprüft.

Die allelspezifischen β3 -Konstrukte Val33, Leu33 und Pro33 wurden mit αIIb Expressionsvektoren in CHO-K1 cotransfiziert und stabile Zelllinien über Geneticin- und Zeocinresistenz selektioniert.

Um die HPA-1 Alloantikörperheterogenität am Beispiel der Val33 Punktmutation zu untersuchen, wurde zunächst geprüft, ob der neutrale Leu33Val Austausch eine Konformationsänderung im Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ hervorruft.

Eine durchflusszytometrische Analyse mit dem $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -komplexspezifischen monoklonalen Antikörper (mAK) Gi5 konnte auf allen CHO-Transfektanten $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ in ähnlicher Dichte auf der Zelloberfläche nachweisen.

Das bedeutet, dass die Leu33Val Mutation nicht die quantitative Oberflächenexpression des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ verändert (s. Abb. 4.7).

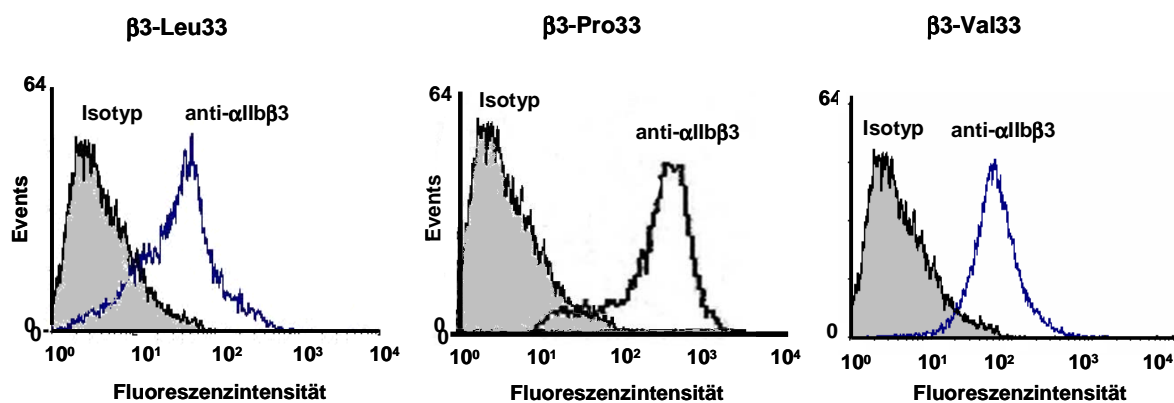


Abb. 4.7: Oberflächenexpression des Integrins $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ auf CHO-Transfektanten zeigt keine Unterschiede zwischen der β3 -Leu33, -Pro33 und -Val33 Isoform.

Stabile CHO-Transfektanten (β3 -Leu33, -Pro33 und Val33) wurden mit 20 μl Überstand des monoklonalen Antikörpers Gi5 (anti- $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$) oder MausIgG als Isotypkontrolle inkubiert. Nach dem Waschen wurde die $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ Oberflächenexpression mit einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper durchflusszytometrisch gemessen.

4.2.2 Die Leu33Val Mutation beeinflusst die Struktur des HPA-1a Epitops

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente verfolgen das Ziel zu analysieren, ob die Val33 Mutation die Bindungsstelle von HPA-1-spezifischen Alloantikörpern verändert.

Dazu wurde zunächst die Reaktivität der rekombinanten β 3-Val33 Isoform im Vergleich zu den natürlichen Isoformen β 3-Varianten Leu33 und Pro33 in der Immunpräzipitation mit oberflächenbiotinylierten CHO-Transfektanten untersucht (s. Abb. 4.8A). Der α Ib β 3-komplexspezifische mAK Gi5 präzipitierte die α Ib (130 KDa) und β 3 (90 KDa) Untereinheit aller rekombinanter β 3-Isoformen Leu33, Pro33 und Val33. Im Kontrollexperiment reagierten polyklonale anti-HPA-1b Seren (n = 3) weder mit der β 3-Leu33, noch mit der β 3-Val33 Isoform. Die Bildung von HPA-1b Epitopen durch die Leu33Val Substitution ist daher auszuschließen. Hingegen exprimieren β 3-Pro33 Transfektanten das immunogene HPA-1b, aber nicht das HPA-1a Epitop. Zur Charakterisierung des neuen HPA-1 Allels β 3-Val33 wurden rekombinante humane (rhu) mAK gegen HPA-1a, welche durch Phagendisplaytechnik generiert wurden (Garner et al., 2000; Griffin and Ouwehand, 1995), eingesetzt. Interessanterweise wurden Unterschiede in der Alloantikörperreaktivität beobachtet. Die ursprünglich aus B-Zellen von PTP Patienten isolierten Klone 19-7 und 23-15 (Proulx et al., 1997) reagierten mit der β 3-Leu33 und der β 3-Val33 Isoform. Im Vergleich zeigte der rhu mAK CamTran007 einer FNAIT Patientin keine Bindung mit der β 3-Val33 Isoform (s. Abb. 4.8A). Im Kontrollexperiment präzipitierten alle drei rhu mAK die β 3-Pro33 Isoform nicht (nicht dargestellt).

Die Beobachtungen aus der Immunpräzipitation waren in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Durchflusszytometrie (s. Abb. 4.8B). Hierzu wurden die CHO-Zellen mit den rhu mAK CamTran007, 19-7, 23-15 und humanem Normalserum als negative Kontrolle inkubiert, gewaschen und mit einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper analysiert.

Dies bedeutet, dass die Leu33Val Punktmutation, welche zur einer Reduktion der Seitenkettenrestlänge um eine CH₂-Gruppe führt, die Bildung des HPA-1a Epitops beeinträchtigt. Während rhu mAK von FNAIT Patienten mit der β 3-Val33 nicht reagieren, erkennen rhu mAK Antikörper von PTP Patienten die β 3-Val33 Punktmutation.

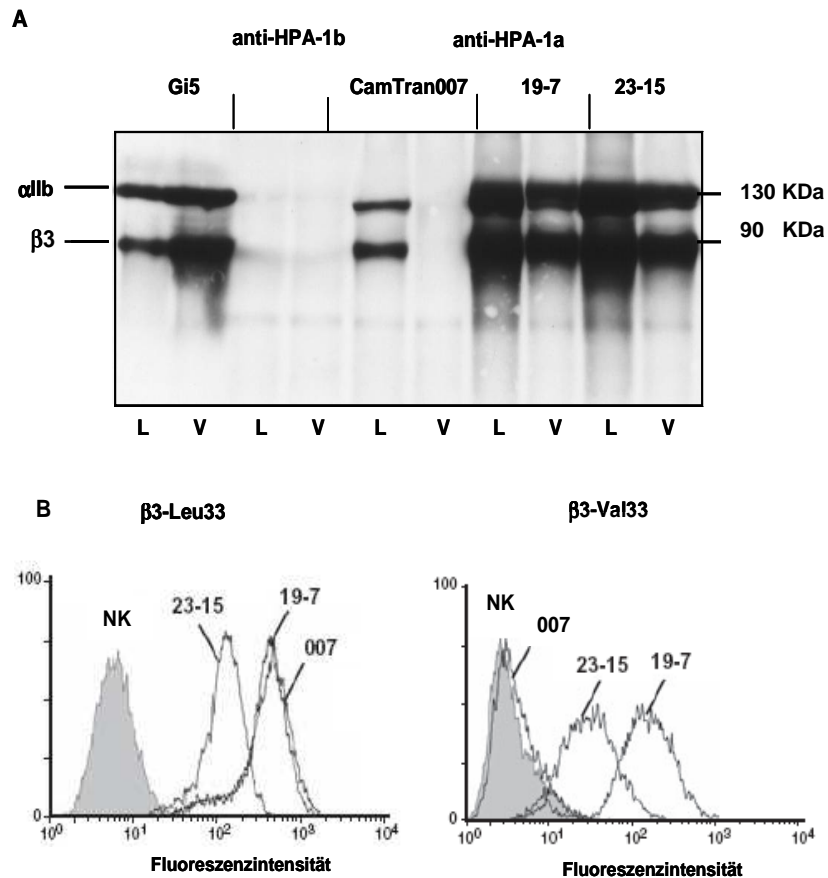


Abb. 4.8: Rekombinante humane mAK aus den B-Zellen von PTP Patienten erkennen die β 3-Val33 Mutation, von FNAIT Patienten hingegen nicht.

Die Reaktivität von rekombinanten humanen (rhu) mAK mit stabilen CHO Transfektanten (β 3-Leu33, β 3-Val33 Isoform) wurde in der Immunpräzipitation und der Durchflusszytometrie untersucht.

(A) Immunpräzipitation von CHO- β 3-Leu33 (L) und -Val33 (V) mit Gi5 (mAK anti- α Ib β 3 Komplex), anti-HPA-1b (humanes FNAIT Serum) und den rhu mAK CamTran007, 19-7 und 23-15 gegen HPA-1a. Zur Immunpräzipitation wurden die CHO-Zellen biotinyliert, lysiert und mit spezifischen mAK gegen HPA-1a präzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die Plattchenglykoproteine nach dem Blotten über eine Chemilumineszenzreaktion detektiert.

B. Durchflusszytometrische Analyse von CHO- β 3-Leu33 und -Val33 mit den rhu mAK CamTran007 (007), 19-7, 23-15 und humanem Normalserum (NK).

4.2.3 Die Affinität der rhu mAK ist nicht Ursache der HPA-1a Alloantikörperreaktivität mit der β 3-Val33 Isoform

Um zu untersuchen, ob die Unterschiede in der Reaktivität der rhu mAK mit der β 3-Val33 Isoform im Zusammenhang mit deren Antikörperaffinität steht, wurde eine kinetische Bindungsanalyse mittels der Oberflächenplasmonresonanz (Surface Plasmon Resonance, SPR) Technologie durchgeführt. Die Daten über die Bindungsaffinität wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Cornelia Andrej-Selmer erhoben. Es wurde die Bindung der

rhu mAK CamTran007 und 19-7 an lösliches, humanes α Ib β 3 Protein aus transfizierten Insektenzellen (Peterson et al., 1998) analysiert.

Die SPR-Sensorgramme wurden unter der Annahme einer homogenen 1:1 Assoziation (Langmuir Bindungsmodell: $A + B \leftrightarrow AB$) dargestellt und zeigen für beide rhu mAK ähnliche Kurvenverläufe ihrer Antigen-Antikörperinteraktion (s. Abb. 4.9). Die kinetischen Konstanten K_a und K_d wurden mit der BIAevaluation 2.1 Software mit Hilfe der nichtlinearen Analyse der kleinsten Fehlerquadrate berechnet. Die Kurvenanpassung erfolgte nach der Gleichung: $R_t = R_{eq} (1 - e^{-(k_a c + k_d)(t-t_0)})$

wobei R_t die Resonanz zum Zeitpunkt t und R_{eq} die Resonanz im Gleichgewicht zwischen gebundenen und freiem Analyten, c die Konzentration und t_0 der Assoziationsbeginn ist. Die an die Kurven angepassten Daten wurden statistisch mit dem Standardparameter χ^2 für die Güte der Anpassung verglichen. Es ergaben sich annähernd gleiche Dissoziationskonstanten (K_D) für CamTran007 ($6.00 \cdot 10^{-8}$ M) und 19-7 ($3.97 \cdot 10^{-8}$ M) ($\chi^2 < 2$) (s. Tab. 4.3).

Tab. 4.3: Bindungsparameter von rhu mAK CamTran007 und 19-7 gegen HPA-1a aus Insektenzellen sind ähnlich.

rhu mAK	K_a (1/Ms)	K_d (1/Ms)	K_D (M)	Chi (X) ²
CamTran007	1.37×10^5	8.23×10^{-3}	6.00×10^{-8}	1.49
19-7	1.30×10^5	5.16×10^{-3}	3.97×10^{-8}	2.00

Die kinetischen Konstanten K_a und K_d wurden mit der BIAevaluation 2.1 Software mit Hilfe des Langmuir 1:1 Modell errechnet. Die an die Kurven angepassten Daten wurden statistisch mit dem Standardparameter χ^2 für die Güte der Anpassung verglichen.

Dies bedeutet, dass die verminderte Reaktivität des mAK CamTran007 mit β 3-Val33 nicht auf eine geringere Affinität dieses AK zurückzuführen ist.

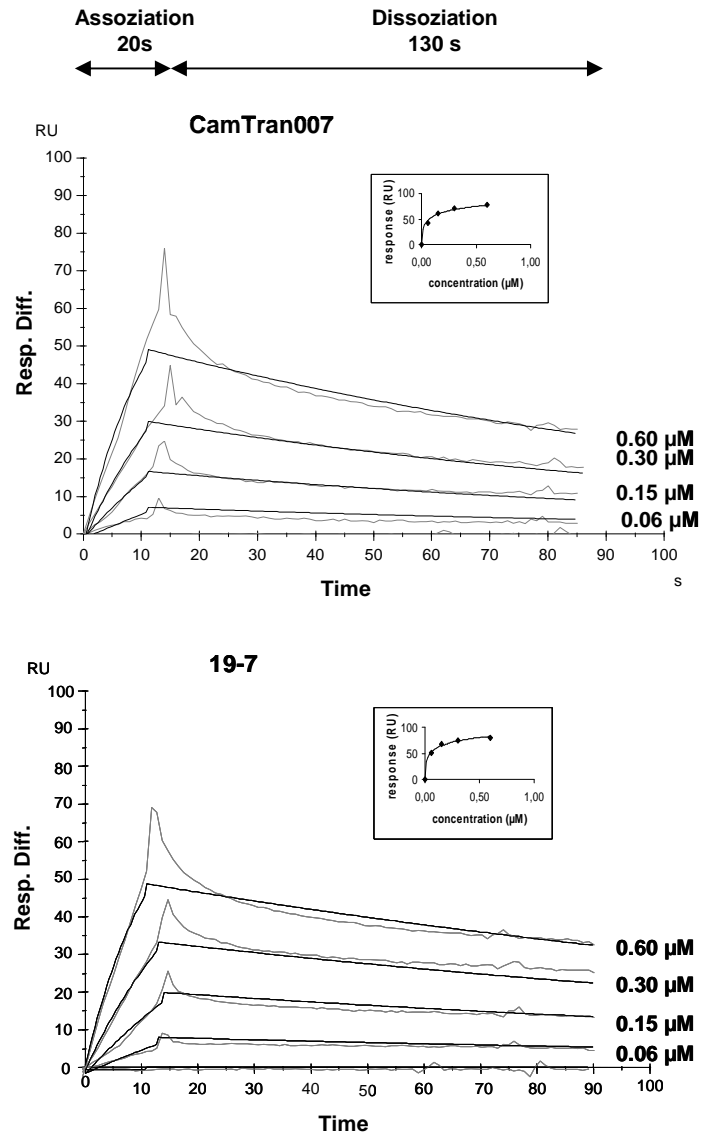


Abb. 4.9: Surface Plasmon Resonance Analyse ermittelt ähnliche Interaktion zwischen rekombinatem α IIb β 3 und rekombinanten humanen mAK CamTran007 (A) und 19-7 (B). Die rhu mAK CamTran007 und 19-7 wurden auf einen Sensorchip (CM5) mit einer Oberflächenkapazität von 1018 und 1356 RU über Aminokopplung immobilisiert. Lösliches, humanes α IIb β 3 Protein aus transfizierten Insektenzellen wurde in verschiedenen Konzentrationen (0.06 - 0.6 μ M) bei einer Flussgeschwindigkeit von 60 μ l/min seriell injiziert und die Interaktion (20 s Assoziation, 130 s Dissoziation) mit den anti-HPA-1a Antikörpern in Sensorgrammen aufgezeichnet. Das Hintergrundsignal in der Referenzzelle wurde in allen Fällen von dem Resonanzsignal in der Messzelle subtrahiert. Die Daten wurden normalisiert. Die eingefügten Diagramme zeigen die konzentrationsabhängige Responsekurve bis zum Erreichen des Gleichgewichtszustands.

4.2.4 Der Ursprung der HPA-1 Alloantikörper bedingt ein heterogenes Bindungsverhalten mit der β -Val33 Isoform

Zur weiteren Charakterisierung des Bindungsverhaltens von HPA-1a Alloantikörpern mit der β -Val33 Isoform wurden selektierte, polyklonale Antiseren von FNAIT ($n = 4$) und PTP Patienten ($n = 4$) mit den allelspezifischen CHO-Transfektanten in der Immunpräzipitation (s. Abb. 4.10A), und in der Durchflusszytometrie (s. Abb. 4.10B) analysiert. In Analogie zu den rhu mAK zeigten alle FNAIT Seren mit der β -Val33 im Vergleich zur Wildtyp β -Leu33 Isoform keine oder eine verminderte Reaktivität. Hingegen reagierten 3 von 4 PTP Seren gleichsam mit der β -Leu33 und der β -Val33 Variante. Ein viertes Serum zeigte eine bevorzugte Bindung zur Wildtyp-Variante. Das heterogene Bindungsverhalten der polyklonalen HPA-1a Alloantikörper werden repräsentativ für je ein PTP (#1) und ein FNAIT (#2) Serum dargestellt (s. Abb. 4.10).

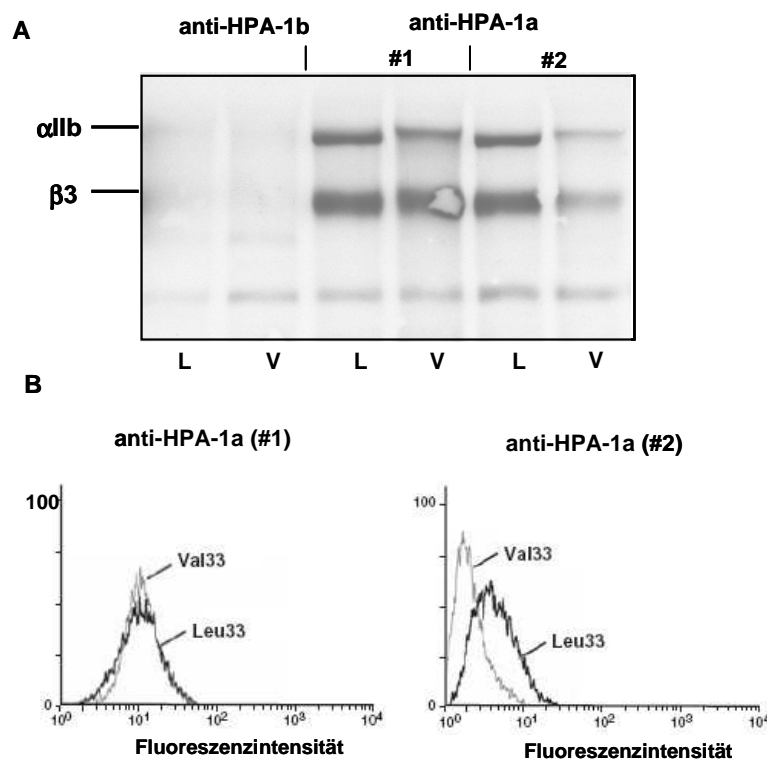


Abb. 4.10: Die β -Val33 Mutation beeinträchtigt das HPA-1a Epitop von polyklonalen anti-HPA-1a Alloantikörpern aus FNAIT Patienten, aus PTP Patienten hingegen nicht.

Die Reaktivität von anti-HPA-1a Antikörpern aus FNAIT und PTP Patienten mit stabilen CHO Transfektanten (β -Leu33, β -Val33 Isoform) wurde in der Immunpräzipitation und der Durchflusszytometrie untersucht.

(A) Immunpräzipitation von CHO- β -Leu33 (L) und -Val33 (V) Zellen mit humanen anti-HPA-1b Serum und humanen anti-HPA-1a Seren von PTP (#1) und FNAIT (#2) Patienten. Zur Immunpräzipitation wurden die CHO-Zellen biotinyliert, lysiert und mit polyklonalen anti-HPA-1 Seren präzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die Plättchenglykoproteine nach dem Blotten über eine Chemilumineszenzreaktion detektiert.

(B) Durchflusszytometrische Analyse von CHO- β -Leu33 und -Val33 Zellen mit einem PTP (#1) und einem FNAIT (#2) anti-HPA-1a Serum. Die Detektion der Antikörperbindung erfolgte nach Inkubation mit einem FITC-konjugierten anti-Human-IgG Antikörper.

Darüber hinaus bestätigte sich die Antikörperheterogenität der PTP (#1) und FNAIT (#2) Antiseren gegen HPA-1a in einem glykoproteinspezifischen Assay (MAIPA Assay) (Kiefel, 1992) mit stabilen CHO Transfektanten (Kroll et al., 2005b). Das anti-HPA-1a Serum #1 reagierte unabhängig von der ausgetesteten Serumverdünnung mit beiden β 3-Isoformen sehr stark. Das FNAIT Antiserum #2 zeigte gegenüber dem PTP Antiserum #1 mit β 3-Val33 eine signifikant verminderte Reaktivität (s. Abb. 4.11).

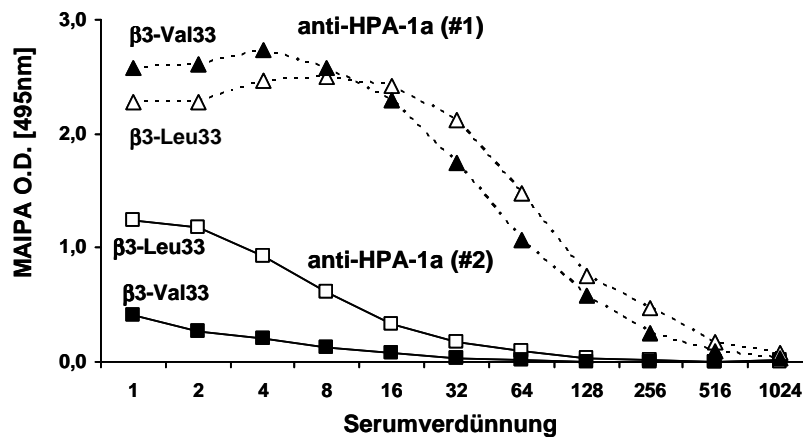


Abb. 4.11: Analyse von zwei unterschiedlichen anti-HPA-1a Seren (PTP #1; FNAIT #2) im MAIPA Assay mit CHO-Transfektanten (β 3- Leu33 und β 3-Val33) bestätigt Split der anti-HPA-1a Reaktivität.

Die CHO Transfektanten wurden mit verschiedenen Verdünnungen der Antiseren #1 und #2 und dem α Ib β 3-komplexspezifischen mAK Gi5 inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen lysiert und die gebundenen HPA-1a Alloantikörper über einen Peroxidase-konjugierten anti-Human IgG Antikörper in einer chromogenen Enzymsubstratreaktion detektiert.

Die beobachteten Unterschiede in der β 3-Val33 Bindung zeigen, dass der epitopbildende Aminosäurerest Leu33 (aliphatische CH_2 -Gruppe) für die Bindung von FNAIT HPA-1a Alloantikörpern bedeutsamer ist als für die von PTP Alloantikörpern gegen HPA-1a.

4.2.5 Die *Leu33Val* Mutation beeinflusst die Ausprägung der Thrombozytopenie, aber nicht die Blutungsneigung in der FNAIT

Es wurde auf eine Assoziation zwischen der Reaktivität mit den β 3-Isoformen (β 3-Leu33 und β 3-Val33) und der klinischen Ausprägung der FNAIT (Thrombozytopenie, Blutungsneigung) untersucht. Die Blutungsneigung dieser Patienten war nicht mit der Thrombozytenzahl korreliert.

Serumproben von 49 FNAIT Patienten wurden in der Immunpräzipitation auf ihre Reaktivität mit β 3-Leu33 und β 3-Val33 analysiert. Neun anti-HPA-1a Alloantikörper reagierten mit keiner der beiden β 3-Isoformen.

Den Präzipitationsmustern zugrunde liegend konnten die verbliebenen 40 HPA-1a Antiseren in drei unterschiedliche Reaktionstypen unterteilt werden: 1) keine Reaktion mit β 3-Val33 (Typ A), 2) eingeschränkte Reaktivität mit β 3-Val33 (Typ B) und 3) uneingeschränkte Reaktivität mit β 3-Val33 (Typ C) (s. Tab. 4.4).

Die Reaktivität der anti-HPA-1a Alloantikörper (Typ A vs. Typ B und C) mit β 3-Val33 war schwach signifikant mit der neonatalen Plättchenzahl (Kruskal-Wallis One-Way Analysis of Variance on Ranks, $p = 0.057$) assoziiert. Typ C Alloantikörper zeigen eine Tendenz zu höheren Plättchenzahlen (s. Abb. 4.12). Es besteht jedoch kein Zusammenhang zwischen der Reaktionsfähigkeit mit β 3-Val33 und einer schweren Blutungsneigung (Hirnblutung) (Fisher's Exakt Test, $p = 0.451$) (s. Tab. 4.4).

Tab. 4.4: Darstellung der β 3-Val33 Reaktivität der HPA-1a Alloantikörper von 40 FNAIT Patienten und ihrer klinischen Blutungsneigung.

	Reaktivität		Blutungsneigung	
	β 3-Leu33	β 3-Val33	keine Hirnblutung	Hirnblutung
Typ A	reaktiv	nicht reaktiv	21	8
Typ B	reaktiv	vermindert reaktiv	1	4
Typ C	reaktiv	gleich reaktiv	5	1

Stabile CHO-Transfektanten, welche die β 3-Leu33 oder β 3-Val33 exprimieren, wurden biotinyliert, lysiert und mit den anti-HPA-1a Seren von 40 FNAIT Patienten präzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und nach dem Blotten durch eine Chemilumineszenzreaktion detektiert. Die Antiseren wurden aufgrund ihres Reaktionsvermögens mit der β 3-Val33 Isoform im Vergleich zur Wildtypform β 3-Leu33 in die Reaktionstypen A (nicht reaktiv), B (vermindert reaktiv) und C (gleich reaktiv) eingeteilt.

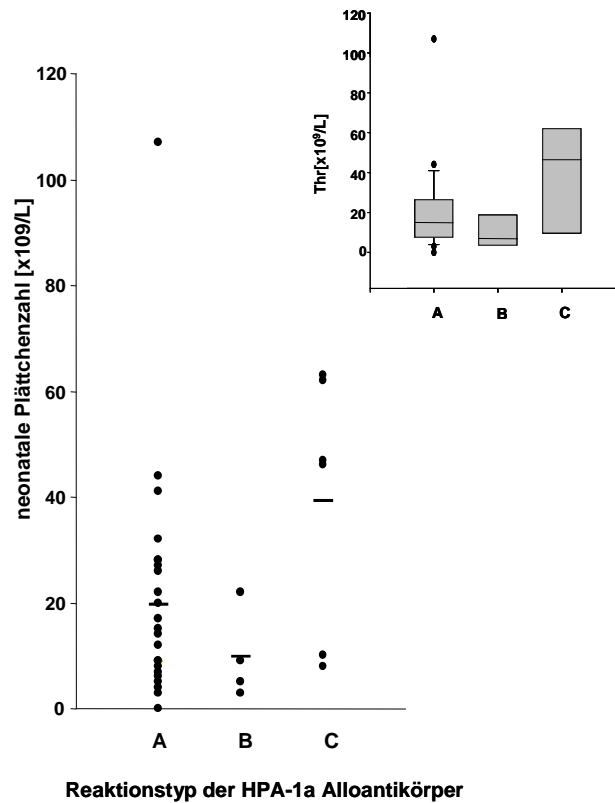


Abb. 4.12: Assoziation der Schwere der Thrombozytopenie (neonatale Plättchenzahl) mit der HPA-1a Alloantikörperreaktivität mit β 3-Val33 für 40 FNAIT Patienten.

Die Schwere der Thrombozytopenie zeigt eine schwache Korrelation zum Reaktionsvermögen der HPA-1a Alloantikörper mit β 3-Val33. Reaktivität mit Val33 im Vergleich zum Leu33 Wildtyp: Typ A (keine Reaktivität mit Val33); Typ B (verminderte Reaktivität mit Val33); Typ C (unveränderte Reaktivität). Im eingefügten Diagramm sind die Daten im Boxplot dargestellt: Die Mittellinie repräsentiert den Median, der untere und obere Rand der Box die 25 und 75 % Perzentile. Die Fehlerbalken kennzeichnen die minimalen und maximalen Extremwerte.

Dies bedeutet, dass polyklonale HPA-1a Antikörpern, die mit β 3-Val33 kreuzreagieren, für eine schwere Thrombozytopenie des Neugeborenen verantwortlich sein können.

4.3 Charakterisierung der HPA-1a Alloantikörperaffinität und der alloantikörpervermittelten Komplementbindung als prädiktive Parameter in der Pathogenese der FNAIT

Neben der Epitopspezifität bestimmen die Kinetik (Assoziation und Dissoziation) sowie die Affinität eines Antikörpers maßgeblich seine Interaktion mit dem korrespondierenden Antigen.

Häufig wird eine schwere Thrombozytopenie auch bei geringen maternalen Antikörperkonzentrationen oder einem fehlenden Antikörpernachweis beobachtet.

Daher wurde in diesem Abschnitt die Relevanz der HPA-1 Alloantikörper Binding und ihr Einfluss auf die Blutungsneigung der Patienten am Beispiel selektierter FNAIT Fälle (s. Tab. 4.6) untersucht.

Dazu wurde zunächst ein *in vitro* Testverfahren entwickelt, welches eine Echtzeitanalyse von HPA-1 Alloantikörpern in der Oberflächenplasmonresonanz (Surface Plasmon Resonance, SPR) Technologie erlaubt.

Weitergehend wurde in Kooperationsarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. P. Newman aus Milwaukee (Blood Research Institute) die Eignung eines neuen *in vivo* Modells mit NOD/SCID Mäusen zur funktionellen Analyse der alloantikörpervermittelten Zerstörung humaner Blutplättchen überprüft.

Ausgenommen der Antikörpereigenschaften wurde die Fähigkeit von HPA-1 Alloantikörpern zur Komplement C1q Bindung untersucht. Eine antikörpervermittelte klassische Komplementaktivierung könnte eine verstärkte Plättchenelimination im Pathomechanismus der FNAIT bewirken.

4.3.1 Etablierung der Oberflächenplasmonresonanz Technologie zur Echtzeitanalyse der HPA-1 Alloantikörperbindung

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente zeigen die wesentlichen Versuche, die SPR Technologie zur Charakterisierung von HPA-1 Alloantikörpern zu etablieren.

Thrombozyten wurden aus Apheresekonzentraten von HPA-1a und -1b homozygoten Spendern der Blutgruppe O isoliert und das α IIb β 3 Integrin affinitätschromatographisch über einen α IIb β 3-komplexspezifischen mAK (Gi5) aufgereinigt.

Silberfärbung und immunchemische Analyse im Blotverfahren bestätigten die Reinheit und die Aktivität der isolierten Antigene (s. Abb. 4.13).

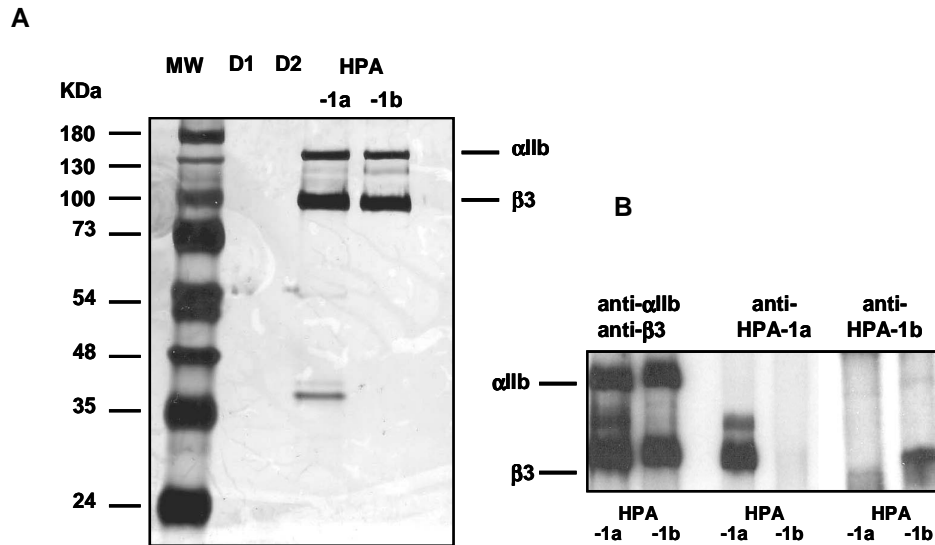


Abb. 4.13: Immunchemische Analyse bestätigt die Reinheit und Aktivität der isolierten α IIb β 3-Protein Fraktionen.

(A) Silberfärbung nach Auftrennung der Plättchenproteine in einer SDS-PAGE zeigt die α IIb und β 3-Untereinheit. MW: Molekulargewichtsmarker; Durchlauf (D) der HPA-1a (1) und HPA-1b (2) Proteinfraktion; isoliertes HPA-1a und HPA-1b Protein

(B) Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde die Aktivität der HPA-1a und HPA-1b Antigene durch Inkubation mit mAK gegen die α IIb (SZ22) und β 3 Untereinheit (SZ21) oder humane anti-HPA-1a oder anti-HPA-1b Seren analysiert.

Die zur Aminokopplung der HPA-1 Proteine erforderlichen pH-Bedingungen/Puffer und die minimal einzusetzende Proteinmenge wurden in einem Vorversuch (*pH-Scouting*) ermittelt (s. Abb. 4.14). Es hat sich gezeigt, dass zur Immobilisierung die Proteine in Natriumacetatpuffer (10 mM) bei einem sauren pH von 4.0 umgepuffert werden müssen, da in diesem (unterhalb ihres pI-Wertes) die Proteine eine positive Nettoladung erhalten und sich optimal in der negativ geladenen Dextranschicht (-COOH) der Sensoroberfläche vorkonzentrieren (s. Abb. 4.14G). Bei geringeren (pH 3.5) oder höheren pH-Werten (pH 5.0) war das Protein nicht aktiv (s. Abb. 4.14B, D, F). Für Proteinkonzentrationen unterhalb von 100 μ g/ml (20 μ g) (s. Abb. 14A, C, E) wurde während dieses Versuches nur eine geringe Oberflächenkapazität (RU) erreicht. Daher wurden zur Immobilisierung minimal 20 μ g (100 μ g/ml) Protein eingesetzt, welcher annähernd einer Sensorkapazität von 9000 RU entsprach (s. Abb. 4.15). Rinderserumalbumin wurde als Inline-Referenzzelle gewählt, um unspezifische Wechselwirkungen mit der Sensoroberfläche auszuschließen.

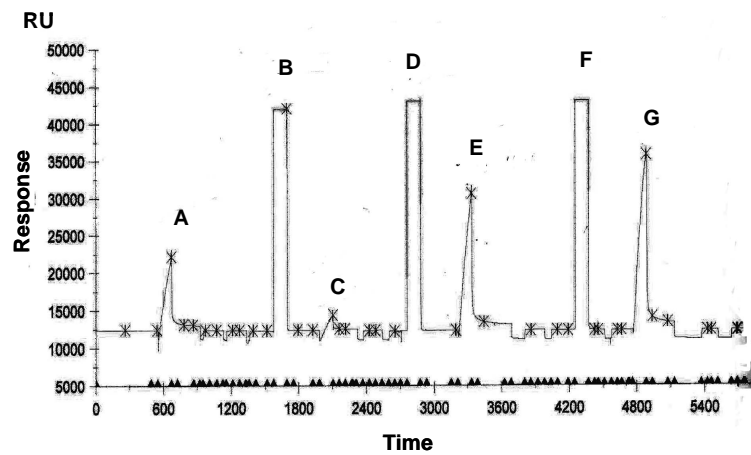


Abb. 4.14: Vortest (*Scouting*) zur Bestimmung der erforderlichen pH-Bedingungen und Proteinmenge (α IIb β 3) für die Immobilisierung.
 A. 30 μ g/ml α IIb β 3, pH4; B. 30 μ g/ml, pH5; C. 30 μ g/ml, pH4.5; D. 30 μ g/ml, pH3.5; E. 50 μ g/ml, pH4; F. 100 μ g/ml, pH3.5; G. 100 μ g/ml, pH4, unter den letzteren Bedingungen bindet das Protein in aktivem Zustand mit hoher Immobilisierungsrate.

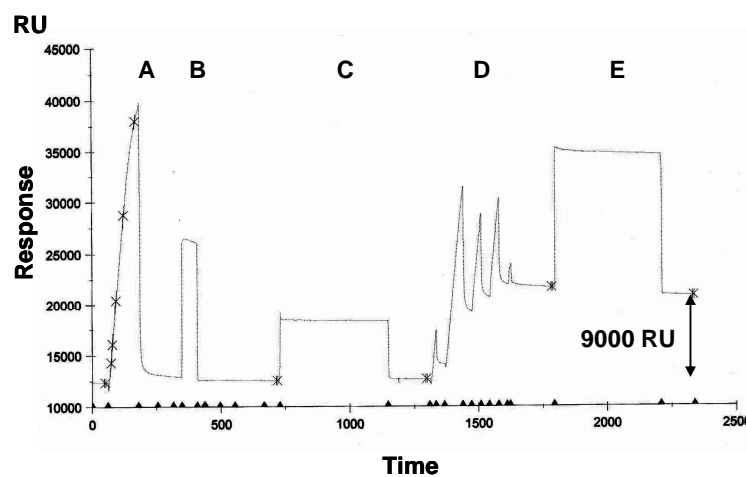


Abb. 4.15: Aminokopplung des α IIb β 3-Proteins an die Sensoroberfläche eines CM5-Chips. Das Sensorgramm zeigt die einzelnen Phasen der Immobilisierung mit (A) Bestimmung der Ligandenbindungsrate, (B) kurzer Waschimpuls, (C) Aktivierung der Sensoroberfläche mit NHS/EDC, (D) Injektion des Liganden und (E) Injektion von Ethanolamin zur Entfernung nicht-immobilisierten Proteins

Zur Aktivitätsbestimmung der immobilisierten Proteine wurden 250 ng anti- α IIb β 3 spezifischer mAK seriell bei einer Flussgeschwindigkeit von 20 μ l/min injiziert. Nach einer Assoziationsphase von 75 s wurde der Probenpuffer (PBS) über die Flusszellen geführt und die Dissoziation für 130 s verfolgt. Analysiert wurde die α IIb β 3 Bindung der mAK SZ21 gegen ein monomorphes Epitop auf der β 3 Untereinheit (s. Abb. 4.16A), AP3 gegen ein polymorphes Epitop auf der β 3 Untereinheit (s. Abb. 4.16B) und MBC gegen ein polymorphes Epitop auf der α IIb Untereinheit (s. Abb. 4.16C).

Die Spezifität der HPA-1 Antigene wurde mit dem rhu mAK CamTran007 gegen HPA-1a, welcher den B-Zellen einer FNAIT Patientin entstammt, überprüft (s. Abb. 4.16D).

Die Aktivität der mAK (s. Abb. 4.16E) wurde als externer Standard regelmäßig überprüft. Nach ca. 50 Messungen wurde eine Aktivitätsabnahme > 50 % beobachtet und ein neuer Chip hergestellt.

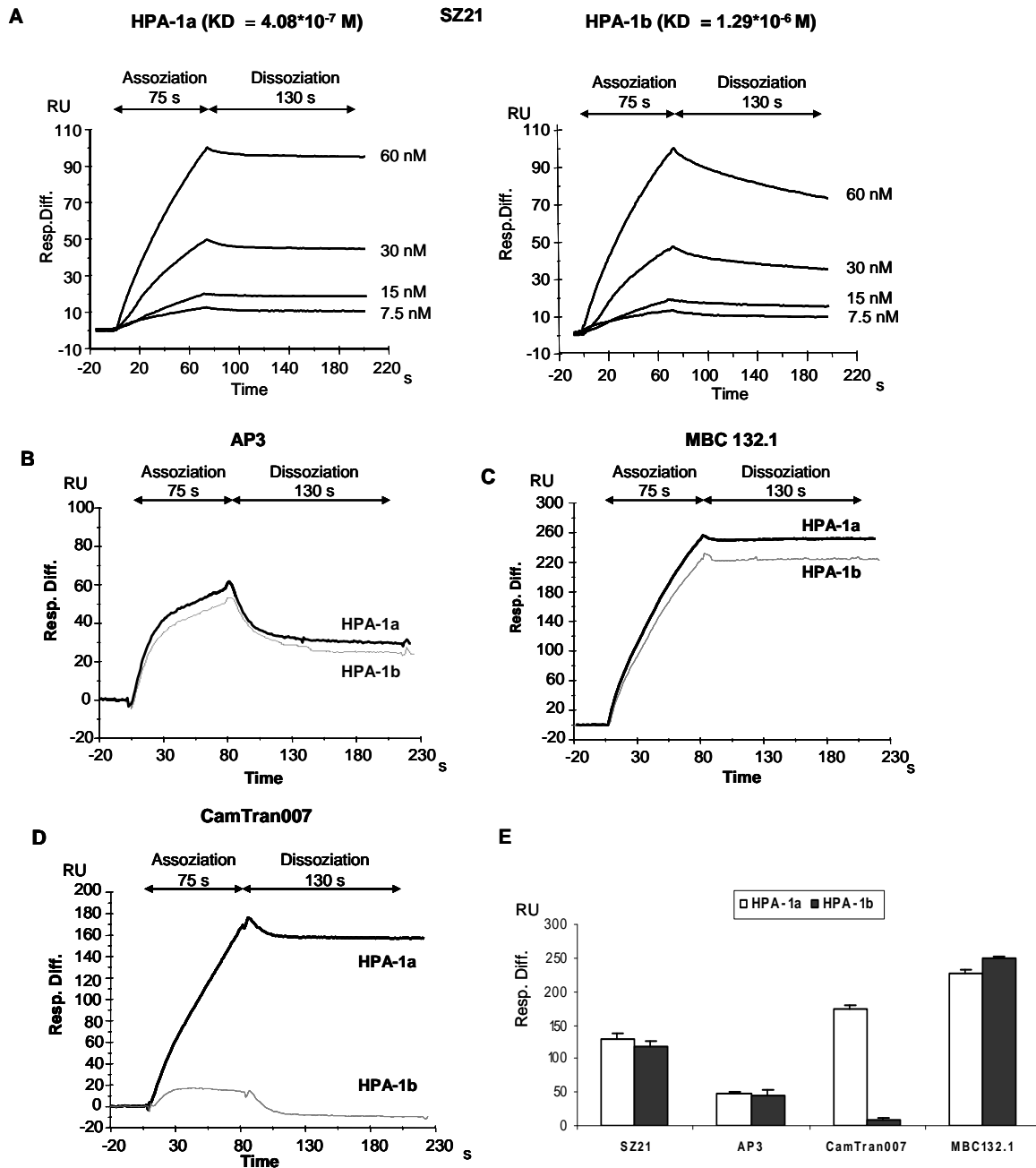


Abb. 4.16: Surface Plasmon Resonance Analyse von verschiedenen monoklonalen Antikörpern bestätigt die Aktivität und Spezifität des immobilisierten α IIb β 3 Proteins. Die Bindungskinetik (Assoziation und Dissoziation) wurde in Sensorgrammen aufgezeichnet: relativer Responseunterschied (Resonanz Units, RU) vs. Zeit (s).

A. Der β 3-spezifische mAK SZ21 wurde in verschiedenen Konzentrationen injiziert. Die Dissoziationskonstante verdeutlicht seine bevorzugte HPA-1a Bindung.

B. Der β 3-spezifische mAK AP3 interagiert mit HPA-1a und -1b in ähnlicher Weise.

C. Injektion des α IIb spezifischen mAK MBC 132.1 zeigt die Aktivität der α IIb Untereinheit.

D. CamTran007 interagiert spezifisch nur mit HPA-1a und nicht mit HPA-1b.

E. Signalstärke (RU) der untersuchten mAK überprüft die Aktivität des immobilisierten α IIb β 3 Proteins.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das immobilisierte HPA-1a und -1b Antigen Epitope ähnlich zu denen auf nativen Plättchen exprimieren.

4.3.2 HPA-1a FNAIT Alloantikörper zeigen eine heterogene HPA-1a Bindung

Humane Seren der FNAIT Patienten enthalten zusätzlich zu den HPA-1a Alloantikörpern eine hohe Mengen an Liganden des thrombozytären α IIb β 3 Rezeptors (Fibrinogen). Diese können direkt an das immobilisierte α IIb β 3 Protein binden und stören dadurch die Messung unserer HPA-1 Alloantikörper. Daher wurde von allen Humanseren die IgG Fraktion mittels Negativselektion isoliert (MelonTM Gel IgG Spin Purification Kit) und in SPR-Probenpuffer (PBS) dialysiert. Silberfärbung bestätigte die Reinheit der IgG Fraktion (s. Abb. 4.17).

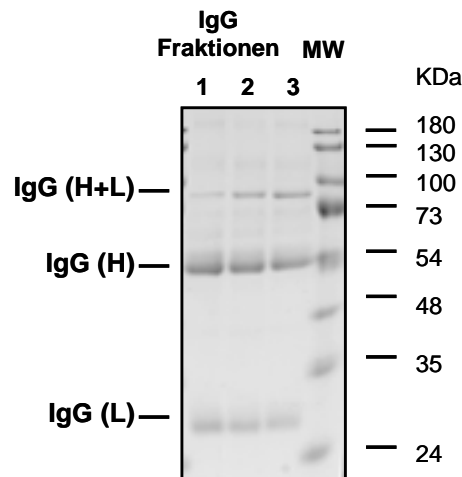


Abb. 4.17: Silberfärbung bestätigt die Reinheit von isoliertem IgG maternaler anti-HPA-1a Seren (#1, 2 und 3).

IgG wurde mit Hilfe des MelonTM Gel IgG Spin Purification Kit isoliert und nach Auftrennung der Proteine unter reduzierenden Bedingungen in der Silberfärbung analysiert. Es sind die Fc γ (75kDa), F(ab)[']2 (50kDa) und Fab (25kDa) Fragmente eindeutig zu erkennen.

Um optimale Bedingungen für eine Interaktion zwischen HPA-1 Alloantikörpern und ihrem korrespondierenden Antigen zu ermöglichen, wurde die Kontaktzeit (150 s Assoziation) durch eine Verringerung der Flussgeschwindigkeit auf 10 μ l/min erhöht.

Zur Evaluation der immobilisierten HPA-1 Antigene wurde die IgG Fraktion serologisch gut charakterisierter HPA-1a (n = 17) und HPA-1b (n =1) Antiseren von FNAIT Patienten mit positiver Reaktion in den konventionellen Testverfahren (MAIPA Assay, PAIFT) untersucht.

Das aufgereinigte IgG (25 - 50 μ g) wurde seriell injiziert (10 μ l/min). Nach einer Assoziationsphase von 150 s wurde Probenpuffer über die Flusszellen geführt und die Dissoziation für 150 s verfolgt.

Die IgG Fraktion aller maternalen HPA-1a Antiseren reagierte spezifisch mit HPA-1a. Vice versa interagierten die HPA-1b Alloantikörper spezifisch mit seinem korrespondierenden Antigen (s. Abb. 4.18A). Die Injektion von Antikörpern gegen Alloantigene der Spezifität HLA-Klasse I (n = 2) und HPA-5b (n = 2) führte nicht zu unspezifischen Bindungsreaktionen. Die Spezifität der SPR Methode wurde weitergehend durch die Analyse der IgG Fraktion von Humansenen gesunder Individuen (n = 2) bestätigt. Diese Daten zeigen, dass die SPR Methode geeignet ist, plättchenspezifische HPA-1 Alloantikörper voneinander zu diskriminieren.

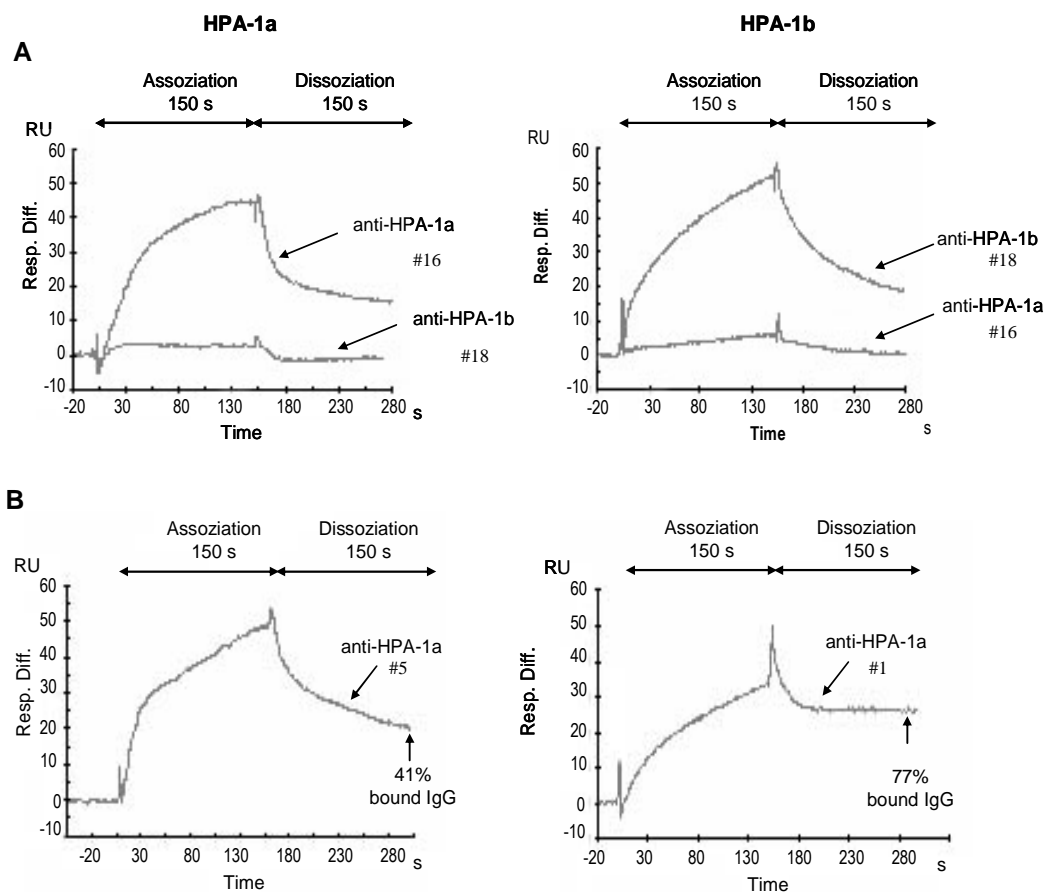


Abb. 4.18: Surface Plasmon Resonance Analyse verschiedener HPA-1 Alloantikörper von FNAIT Fällen mit immobilisiertem α Ib β 3 Plättchenprotein zeigt, dass die Antikörperbindung spezifisch, aber mit unterschiedlicher Affinität erfolgt.

Die Bindungskinetik (Assoziation und Dissoziation) wurde in Sensorgrammen aufgezeichnet: relativer Responseunterschied (Resonanz Units, RU) vs. Zeit (s). Der Dissoziationsgrad wurde ermittelt als prozentualer Anteil der relativen Response zu Beginn und zum Ende der Dissoziationszeit (% gebundene AG-AK Komplexe).

A. Analyse von HPA-1 Alloantikörpern mit positiver Reaktion im MAIPA Assay. Anti-HPA-1a (#16) oder anti-HPA-1b (#18) Alloantikörper interagierten spezifisch mit ihrem korrespondierenden Antigen. Variable Assoziation und Dissoziation wurde in beiden Fällen beobachtet.

B. HPA-1a Alloantikörper unterscheiden sich in ihren Bindungscharakteristiken. Anti-HPA-1a #5 zeigt eine geringere Antikörperaffinität als anti-HPA-1a #1 reflektiert durch den stärkeren Dissoziationsgrad.

Die Antigen-Antikörper Interaktion von FNAIT HPA-1 Alloantikörpern ist charakterisiert durch variable Signalstärken nach einer Assoziationszeit von 150 s (22.2.- 69.7 RU) und durch eine langsame, stetige Dissoziation. Um die Antikörperaffinität von HPA-1 Alloantikörpern in einem polyklonalem Antikörpergemisch zu beurteilen, wurde der Dissoziationsgrad, d.h. der nach 150 s Dissoziation prozentual noch gebundene Anteil der Antigen-Antikörperkomplexe ermittelt (s. Tab. 4.5).

Tab. 4.5: Reaktionen von FNAIT HPA-1 Alloantikörpern im PAIFT, MAIPA Assay und SPR.

IgG Probe	Spezifität	PAIFT	MAIPA OD[490 nm]	SPR	
				Resonanzsignal [RU] nach 150 s Ass.	% IgG nach 150 s Diss.
1	HPA-1a	4+	3.08	32.1	77
2	HPA-1a	4+	2.96	22.7	69
3	HPA-1a	2+/4+	2.91	43.1	31
4	HPA-1a	4+	1.69	28.8	55
5	HPA-1a	4+	3.50	48.6	41
6	HPA-1a	4+	2.95	57.2	78
7	HPA-1a	3+/4+	2.38	32.4	58
8	HPA-1a	4+	2.68	24.0	70
9	HPA-1a	2+	1.48	16.8	65
10	HPA-1a	1+/2+	0.201	22.6	8
11	HPA-1a	4+	2.68	62.8	20
12	HPA-1a	3+/4+	0.60	27.0	13
13	HPA-1a	3+/4+	0.41	44.2	10
14	HPA-1a	4+	3.50	29.7	61
15	HPA-1a	3+/4+	3.07	33.7	58
16	HPA-1a	4+	2.73	49.7	50
17	HPA-1a	4+	3.07	54.5	21
18	HPA-1b	2+	0.67	50.4	32

Die gereinigte IgG Fraktion (25 – 50 µg) von humanen anti-HPA-1a Seren, welche in den konventionellen Testverfahren (MAIPA, PAIFT) positiv sind, wurde seriell injiziert (10 µl/min). Die Assoziation (Ass) und Dissoziation (Diss) wurden für jeweils 150 s verfolgt. Die Stärke des Resonanzsignals am Ende der Ass [RU] reflektiert die relative Antikörperkonzentration. Der Dissoziationsgrad, d.h. der nach 150 s Dissoziation prozentual noch gebundene Anteil der Antigen-Antikörperkomplexe [% IgG], wurde aus dem Verhältnis der Signalstärke [RU] zu Beginn und zum Ende der Dissoziationsphase ermittelt. Dieser reflektiert die Antikörperaffinität.

HPA-1 Alloantikörper zeigen unterschiedliche Bindungseigenschaften an ihr korrespondierendes Antigen (s. Abb. 4.18B). Es besteht ein schwach linearer Zusammenhang (Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0.615$) zwischen dem Dissoziationsgrad (Antikörperaffinität) und der Antikörperreaktivität (OD) im MAIPA Assay. Für schwach reaktive HPA-1

Alloantikörper mit einer OD < 0.8 im MAIPA wurden geringere Antikörperaffinitäten beobachtet (s. Tab. 4.5). Die Antikörperreaktivität im MAIPA Assay ist jedoch nicht korreliert mit der Stärke des Resonanzsignals nach 150 s Assoziation (relative Antikörperkonzentration).

Diese Daten zeigen, dass HPA-1 Alloantikörper von FNAIT Patienten mit unterschiedlicher Affinität an ihr Epitop binden.

4.3.3 Zusammenhang zwischen Affinität von HPA-1a Alloantikörpern und der Ausprägung der FNAIT

Alle Neugeborenen der untersuchten FNAIT Fälle (s. Tab. 4.5) waren bis auf eine Ausnahme von einer schweren Thrombozytopenie mit Thrombozytenzahlen $50 \cdot 10^9/L$ betroffen, welche nicht mit deren Blutungskomplikation (Grad I: keine; Grad II: Hautblutungen; Grad III: innere Organblutungen, z.B. gastrointestinal; Grad IV: intrakranielle Blutung) korreliert war. Die klinischen Daten der Patienten sind der Tabelle 4.6 zu entnehmen.

Tab. 4.6: Klinische Daten von Patienten mit anti-HPA-1a und anti-HPA-1b induzierter FNAIT.

FNAIT Fall	Jahr der Schwangerschaft	Probenentnahme nach Geburt (d)	Blutungskomplikation	Thrombozytenzahl (*10⁹/L)
1	2006	8 d	HB, IB	45
2	1991	6 d	HB, IB	31
3	2005	4 d	HB	14
4	1981	Wochen später	HB	9
5	2000	2 d	IB	10
6	2003	1 d	HB	16
7	2005	2 d	keine	26
8	2005	7 d	HB, GB	20
9	2003	8 d	keine	107
10	2006	1 d	keine	50
11	1994	7 d	HB	11
12	2004	Tage nach Geburt	unbekannt	34
13	1999	8 d	unbekannt	25
14	2001	1 d	IB	17
15	2001	Tage nach Geburt	unbekannt	13
16	2003	2 d	IB	20
17	2006	21 d	HB	19
18	1996	7 d	unbekannt	6

Blutungskomplikationen der FNAIT Patienten: Hautblutung (HB), gastrointestinale Blutung (GB) und intrakranielle Blutung (IB)

Es wurde hier weitergehend auf eine Assoziation zwischen der Alloantikörperaffinität (s. Tab. 4.5) und der bestehenden Blutungsneigung untersucht.

Für Patienten ohne Blutungskomplikation (Grad I, n = 3 Median der Signalstärke 23.9 RU) wurden statistisch signifikant geringere Konzentrationen an HPA-1 Alloantikörpern im Vergleich zu Patienten mit Hautblutungen (Grad II, n = 5 Median der Signalstärke 48.5 RU) und schweren inneren Organblutungen (Grad III+IV, n = 6, Median der Signalstärke 35.9 RU) beobachtet (s. Abb. 4.19A).

Beim Auftreten einer schweren Blutungskomplikation (Grad III +IV) wurde allerdings eine Tendenz zu einer höheren Antikörperaffinität (Median 61 % IgG) als bei Hautblutungen (Grad II, Median 43.6 % IgG) oder einer isolierten Thrombozytopenie (Grad I, Median 43.2 % IgG) nachgewiesen (s. Abb. 4.19B).

Aufgrund der geringen Kollektivgröße sind diese Unterschiede aber zu relativieren.

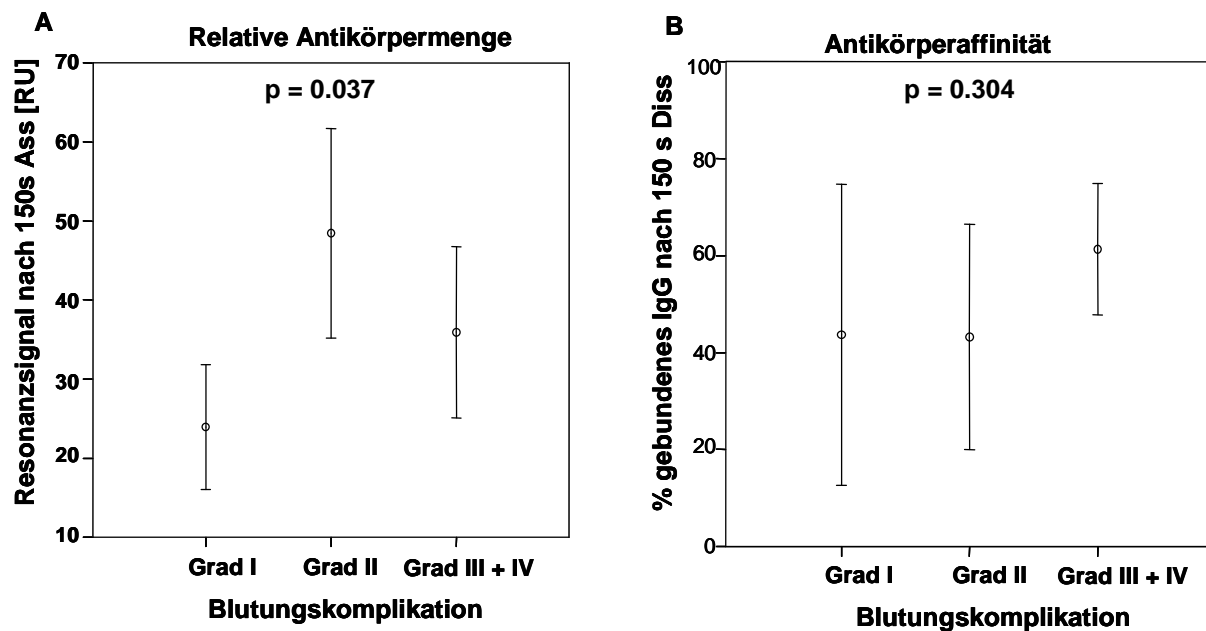


Abb. 4.19: Korrelation der SPR-Daten zur Blutungskomplikation der FNAIT Patienten.

(A) Zusammenhang zwischen Blutungskomplikation und der Stärke des Resonanzsignals nach 150 s Assoziation, d.h. der relativen Antikörpermenge.

(B) Zusammenhang zwischen Blutungskomplikation und dem Anteil des gebundenen IgG nach 150 s Dissoziation (Dissoziationsgrad), d.h. der Antikörperaffinität

Schweregrad der Blutungskomplikation: Grad I (keine Blutung), Grad II (Hautblutungen), Grad III und IV (gastrointestinale Blutungen, intrakranielle Blutungen)

Der Mittelpunkt repräsentiert den Median, die Fehlerbalken kennzeichnen die minimalen und maximalen Extremwerte.

Dies bedeutet, dass die Antikörpermenge mit der Ausprägung der Thrombozytopenie assoziiert ist. Eine Analyse der Antikörperaffinität könnte Hinweise auf das zu erwartende Blutungsrisiko des Feten bzw. Neugeborenen geben.

4.3.4 Antikörperreifung während FNAIT ist begleitet von Affinitätsreifung

In 15 - 25 % aller klinischen FNAIT Verdachtsfällen, in denen eine fetomaternale HPA-1 Inkompatibilität besteht, können in den maternalen Seren keine korrespondierenden HPA-1a Alloantikörper nachgewiesen werden (Bussel et al., 2005; Mueller-Eckhardt et al., 1989).

In den Jahren 1988 - 2004 wurden im Universitätsklinikum Gießen/Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin/Thrombozytenlabor insgesamt 569 Fälle mit fetomaternaler HPA-1 Inkompatibilität auf die Verdachtsdiagnose FNAIT untersucht.

Hier wurde retrospektiv der prozentuale Anteil der HPA-1 Alloantikörper, welche in diesen Fällen mittels konventioneller Testverfahren (MAIPA Assay, PAIFT) detektiert wurden, ermittelt. In Übereinstimmung zu den Beobachtungen anderer Autoren konnten in 22.9 % aller Fälle im MAIPA keine HPA-1a Alloantikörper gefunden werden (s. Tab. 4.7).

Tab. 4.7: Serologischer Nachweis von HPA-1 Alloantikörpern in FNAIT Verdachtsfällen durch anti-HPA-1a.

	Anzahl	Prozent	
FNAIT Verdachtsfälle mit HPA-1 Inkompatibilität	569	100	
Negativer Antikörpernachweis	99	17.3	
	MAIPA und PAIFT	438	77.1
Positiver Antikörpernachweis	nur PAIFT	32	5.6
	Gesamt	470	82.7

Weitergehend wurden aus der Population der FNAIT Fälle mit negativem Antikörpernachweis im MAIPA Assay und PAIFT zwei HPA-1a negative Mütter (Fall 1 und 2) selektiert. Diese waren für uns interessant, da in zwei aufeinanderfolgenden Schwangerschaften (1. und 2. Schwangerschaft, SS) die Neugeborenen von einer schweren Thrombozytopenie betroffen waren.

Die klinische Diagnose FNAIT konnte dennoch postnatal nach der ersten SS (Fall 1.1, Fall 2.1) nicht bestätigt werden. Infektionen und Hepatosplenomegalie konnten als medizinische Indikation für eine postnatale Thrombozytopenie ausgeschlossen werden. Transfusionen oder Autoimmunerkrankungen waren bei den Müttern nicht bekannt. Antikörper gegen die Glykoproteinkomplexe Ia/IIa, Ib/IX/V, CD109, CD31, HLA-Klasse I, ABO-Blutgruppenantigene und maternale anti-D Antikörperlagen nicht vor.

Um einen falsch negativen Befund im MAIPA durch eine mögliche kompetitive Hemmung der humanen Alloantikörper auszuschließen, wurden verschiedene monoklonale Antikörper

gegen α Ib β 3 eingesetzt. Die negativen Ergebnisse waren mit den mAK Gi5 (α Ib β 3-Komplex spezifisch), P2 (α Ib β 3-Komplex spezifisch) und Gi16 (α Ib Untereinheit) reproduzierbar. Hingegen waren in der zweiten SS maternale HPA-1a Alloantikörper detektierbar, im Fall der Mutter der FNAIT Mutter 2 bereits pränatal (Fall 2.2), jedoch bei der FNAIT Mutter 1 erst postnatal (Fall 1.3) (s. Abb. 4.20A).

Im Anhang sind die Fallberichte der beiden Mütter dargestellt (s. 184).

Die durchflusszytometrische Antikörperdetektion mit frischen, unfixierten Plättchen ist bei einigen Plättchenantigenen zur integren Epitopexpression vorteilhaft (Harrison et al., 2003). Durchflusszytometrisch konnten in den maternalen Seren aus der ersten SS (Fall 1.1 und 2.1) sehr schwache Bindungsreaktionen mit HPA-1a homozygoten Plättchen detektiert werden, die aber nicht eindeutig von HPA-1a negativen Plättchen diskriminiert werden konnten. In der zweiten SS waren die HPA-1a Alloantikörper durch ein starkes Fluoreszenzsignal nachweisbar, im Fall der FNAIT Mutter 1 parallel zum MAIPA Assay aber nur postnatal (Fall 1.3) (s. Abb. 4.20B).

Diese Beobachtungen zeigen, dass vermutlich schon in der 1.SS eine Immunisierung gegen fetales HPA-1a Antigen mit Bildung eines HPA-1 Alloantikörpers klinisch für die neonatale Thrombozytopenie verantwortlich war.

Zur Charakterisierung der Antikörpereigenschaften wurde die gereinigte IgG Fraktion der maternalen Antiseren aus der ersten (1.1 und 2.1) und zweiten Schwangerschaft (1.2, 1.3 und 2.2) in der Oberflächenplasmonresonanz Technologie untersucht.

Es wurden spezifische HPA-1a Alloantikörper in allen maternalen Proben detektiert, deren Antikörpernachweis in den konventionellen Testverfahren (MAIPA, PAIFT) negativ war (Fall 1.1, 1.2, 2.1). Diese Alloantikörper weisen eine niedrige Affinität zu ihrem Antigen auf, die sich in 1) einer initial raschen Antigen-Antikörper Immunkomplexbildung während der Assoziationsphase (steiler Anstieg), 2) einer stetigen Antikörperdissoziation beginnend bereits in der Assoziationsphase und 3) einer vollständigen Dissoziation des Antikörpers am Ende der Dissoziationsphase zeigt (s. Abb. 4.20C).

Interessanterweise zeigten die HPA-1a Alloantikörper aus den maternalen Proben der 2. SS (Fall 1.3, 2.2), welche serologisch durch eine stark positive Reaktion im MAIPA (s. Abb. 4.20.A) Assay nachgewiesen wurden, deutlich stärkere Bindungsaffinitäten (84 % und 19 %) zu ihrem Antigen (s. Abb. 4.20C).

Diese Beobachtungen reflektieren möglicherweise eine Affinitätsreifung der HPA-1a Alloantikörper im Verlauf der FNAIT.

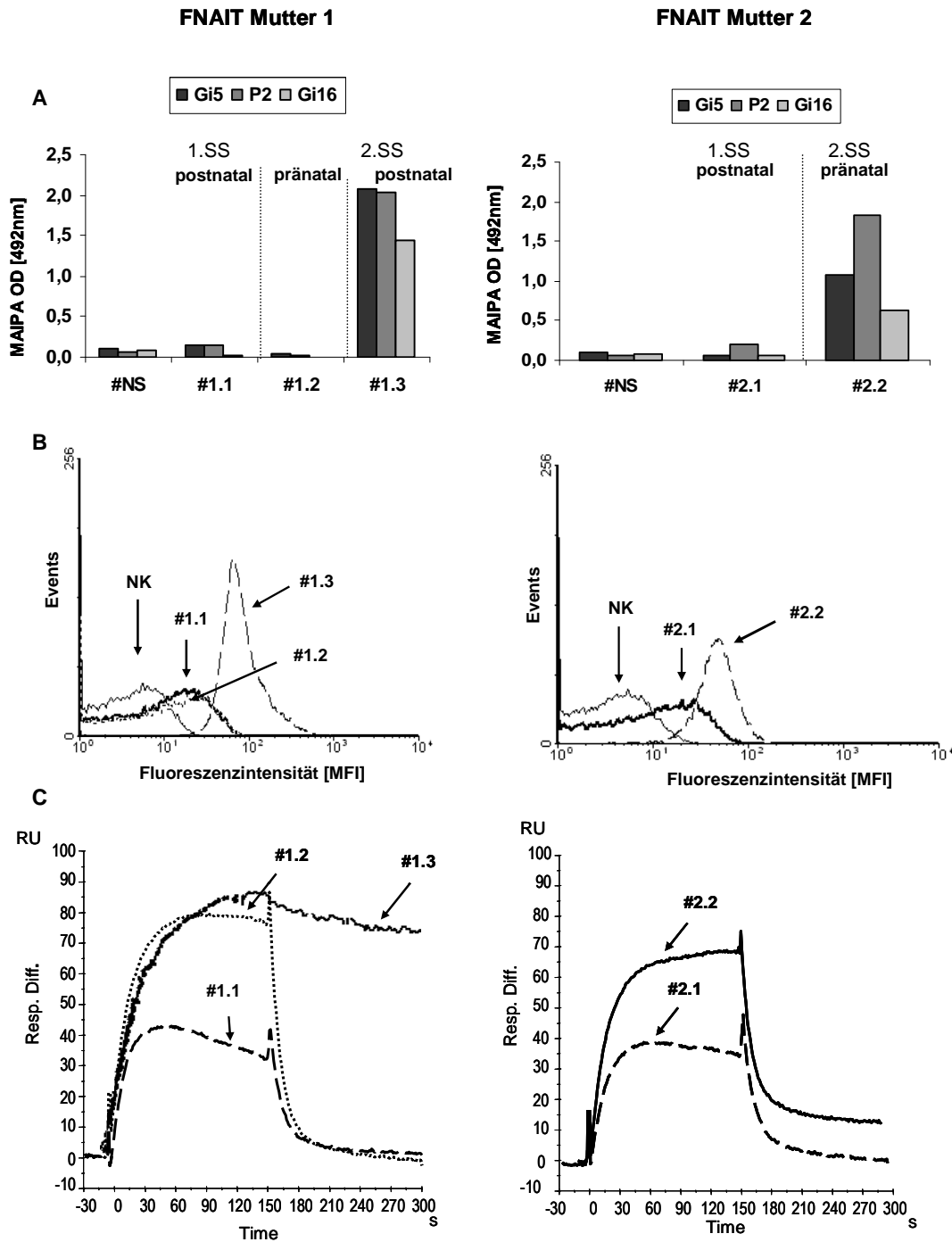


Abb. 4.20: Surface Plasmon Resonance Analyse detektiert Zunahme der HPA-1a Alloantikörperaffinität während einer Sekundärimmunisierung in der FNAIT. (A) Analyse der HPA-1a Alloantikörper aus der ersten (1.1 und 2.1) und der zweiten Schwangerschaft (SS) (1.2, 1.3 und 2.2) von 2 FNAIT Müttern im MAIPA Assay unter Verwendung der mAK Gi5 (anti- α Iib β 3 Komplex), P2 (anti- α Iib β 3 Komplex) und Gi16 (anti- α Iib). Eine MAIPA O.D. > 0.2 gilt als positives Testergebnis.

(B) Durchflusszytometrische Analyse der maternalen Seren aus der 1. SS (1.1, 2.1) und 2. SS (1.2, 1.3 und 2.2) mit HPA-1a homozygoten Plättchen und HPA-1a negativen Plättchen als negative Kontrolle (NK).

(C) Gereinigte IgG Fraktionen (25 - 50 μ g) der maternalen Antiseren (1.1, 1.2, 1.3 und 2.1, 2.2) wurden seriell injiziert und die Interaktion (Assoziation und Dissoziation) über einen Zeitraum von 300 s im SPR gemessen. Die Menge der gebundenen AG-AK Komplexe nach 150 s Dissoziation verdeutlicht den Wechsel der Antikörperaffinität von der 1. zur 2.SS.

In maternalen IgG Proben von zwei HPA-1a negativen Müttern, welche gesunde HPA-1a positive Kinder geboren haben (Thrombozytenzahl: $173 \cdot 10^9/L$; $230 \cdot 10^9/L$), wurde keine Interaktion mit HPA-1a detektiert.

Diese Proben entstammen einer klinischen Studie mit 9.332 HPA-1a negativen Müttern, welche die Prävalenz einer fetomaternalen HPA-1 Inkompatibilität in Neugeborenen als Risikofaktor für eine FNAIT untersucht hat (Castro et al., 2007).

4.3.5 HPA-1a Alloantikörper von FNAIT Patienten können nicht Komplement C1q binden

Als weitere Hypothese einer klinisch schweren Thrombozytopenie in der FNAIT wurde die alloantikörpervermittelte Aktivierung der klassischen C1q-Komplementkaskade untersucht.

Die Fähigkeit von plättchenreaktiven Antikörpern zur Komplementbindung konnte *in vitro* für Medikament-abhängige Antikörper und Autoantikörper (Kiefel et al., 1989a), in Ausnahmefällen auch für Alloantikörper beobachtet werden (Cines and Schreiber, 1979; Schreiber et al., 1979).

Im Fall der eben beschriebenen HPA-1a Alloantikörper mit einer schwachen Affinität (Fall 1.1, 1.2 und 2.1) könnte eine komplementvermittelte Lyse möglicherweise die fetale und neonatale Thrombozytenzerstörung verstärken.

Die Komplementfixierung durch HPA-1a Alloantikörper wurde zunächst in einem funktionellen Test, dem Mikrokomplementbindungstest (MKBR), analysiert. HPA-1 typisierte Plättchen (HPA-1aa und HPA-1bb) 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 (s. Abb. 4.21).

Es wurde für das Serum eines gesunden Spenders (Normalhumanserum) keine Komplementfixierung beobachtet, erkennbar an der Totalhämolyse (Abb. 4.21A). Als positive Kontrolle wurden im MKBR HPA-1a Alloantikörper von drei PTP Patienten eingesetzt, welche in diesem Test bekanntermaßen durch ihre Komplementbindung die Erythrozytenlyse vollständig hemmen (s. Abb. 4.21E).

Im FNAIT Fall der Mutter 1 ist vermutlich weder in der ersten Schwangerschaft (1.1), noch in der zweiten Schwangerschaft (1.2, 1.3) die Komplementaktivierung in die Pathogenese der Erkrankung involviert (s. Abb. 4.21B-D).

Die Befunde der maternalen Seren der FNAIT Mutter 2 (2.1 und 2.2) waren im MKBR nicht eindeutig interpretierbar (s. Abb. 4.21F-G). Die beobachteten antigenunspezifischen, positiven Testergebnisse könnten durch die Anwesenheit von IgM Antikörpern im Serum oder durch die Expression von komplementbindenden Rezeptoren und komplementregulatorischen Proteinen auf der Oberfläche der Plättchenmembran beeinflusst werden (Peerschke et al., 2006).

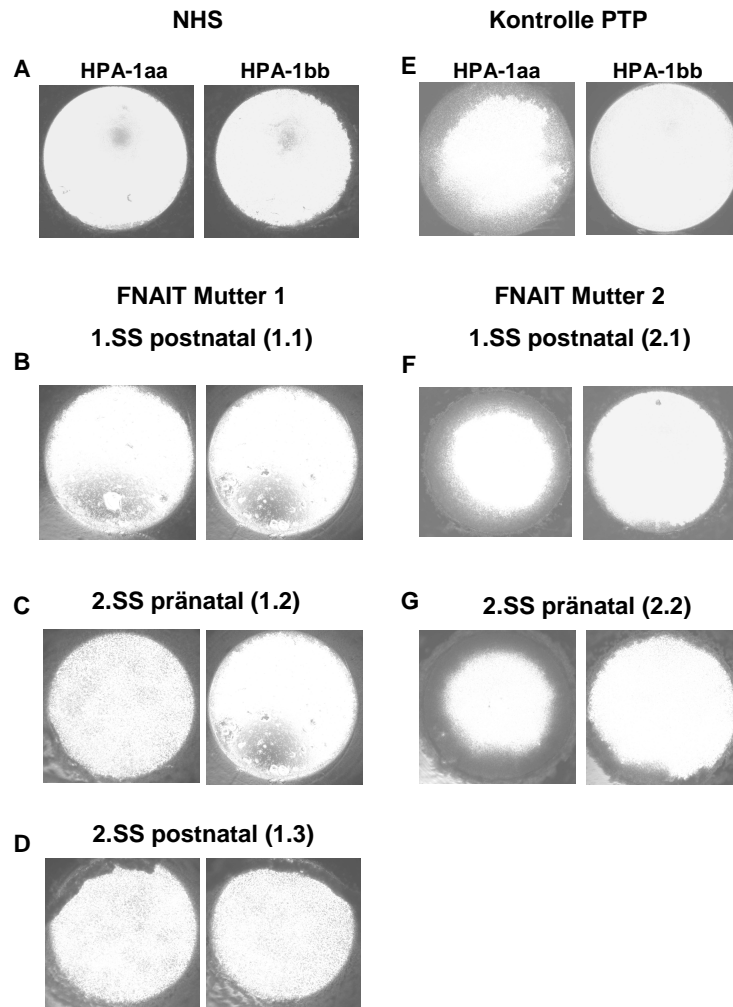


Abb. 4.21: Funktionelle Analyse im Mikrokomplementbindungstest (MKBR) zeigt, dass HPA-1a Alloantikörper von PTP Patienten Komplement C1q binden, von FNAIT Patienten hingegen nicht. Die Komplementfixierung der HPA-1a Alloantikörper wurde über den Hemmgrad der Erythrozytenlyse mikroskopisch beurteilt: Grad 4: > 80 % Hämolyse, keine Komplementfixierung (B, C, D) oder keine Antikörper (A); Grad 3: 50 – 75 % Hämolyse, schwache Alloantikörperreaktivität; Grad 2: 25 – 50 % Hämolyse, moderate Alloantikörperreaktivität; Grad 1: < 10 % Hämolyse, starke Antikörperreaktivität; Grad 0: keine Hämolyse (Ringbildung), sehr starke Antikörperreaktivität (E, F, G). Zusätzlich schwache Hämolyse (1) im Ansatz mit HPA-1bb Plättchen (F und G) reflektiert unspezifische Reaktionen.

Die Aktivierung der klassischen Komplementkaskade wird über die Bindung der Komplementkomponente C1q im C1-Komplex an zellassoziierte Antigen-Antikörper Komplexe getriggert.

Um die alloantikörpervermittelte C1q Bindung direkt zu analysieren, habe ich ein neues auf antigenbeschichteten Partikeln basierendes Testverfahren entwickelt. Aus Plättchenkonzentraten isoliertes α IIb β 3 Protein (HPA-1a oder HPA-1b Isoform) wurde über N-Hydroxy-Succinimido-LC-Biotin an Streptavidin-beschichtete Partikel gekoppelt. Partikel mit immobilisiertem HPA-1a oder HPA-1b Antigen wurden mit inaktivierten Antiseren und Komplement inkubiert. Zur Evaluation der Methode wurden AB-Serum und humanes gereinigtes C1q in Konzentrationen von 2.5 und 5 μ g als Komplementquelle ausgetestet. Eine Konzentration von 2.5 μ g der Reinsubstanz C1q war optimal, um die Reaktionen der komplementfixierenden Antikörper (PTP 1 und PTP 2) von denen der negativen Kontrolle (NHS) zu differenzieren (s. Abb. 4.22A).

Die Spezifität der Antikörper- und Komplementbindung wurde mit Seren von PTP Patienten (1 und 2), welche bekannte komplementfixierende HPA-1a Alloantikörper enthalten, überprüft und validiert. Es wurde eine HPA-1a spezifische Komplementbindung beobachtet (s. Abb.4.22B, C).

Die HPA-1a Alloantikörper der untersuchten maternalen Antiseren (n = 14) reagierten alle spezifisch mit immobilisiertem HPA-1a, aber nicht mit HPA-1b Antigen (s. Abb. 4.22B). HPA-1a Alloantikörper waren in den ausgewählten FNAIT Fällen nicht zur Komplementfixierung fähig (s. Abb. 4.22C).

Mithin besteht kein Hinweis auf eine Aktivierung der klassischen Komplementkaskade und somit eine mögliche Verstärkung der Phagozytose und Elimination von Plättchen im Fall einer maternalen HPA-1 Immunisierung, auch nicht Fall einer schwachen HPA-1a Alloantikörperaffinität (FNAIT Mütter 1 und 2) (s. Abb.4.22C).

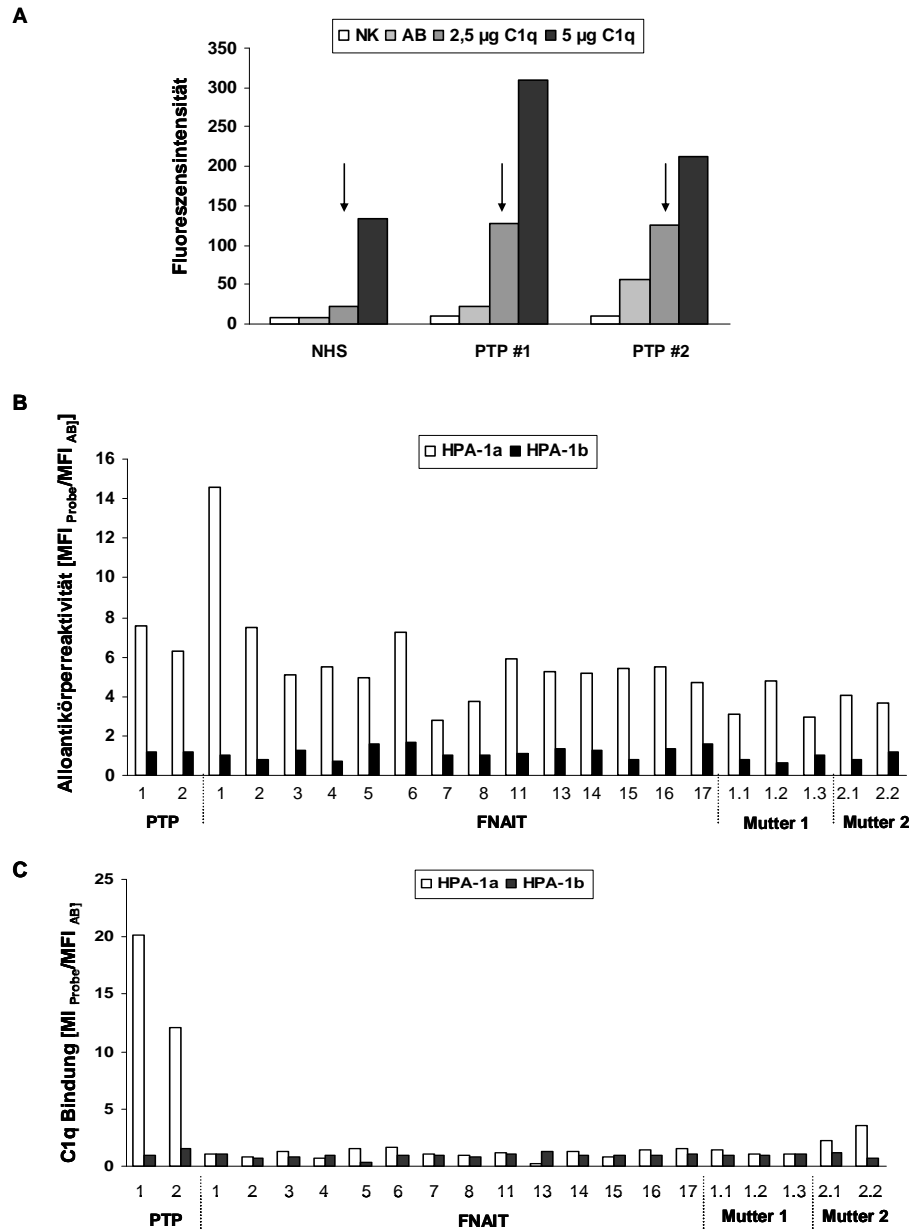


Abb. 4.22: Durchflusszytometrische Analyse detektiert Komplement C1q Bindung durch HPA-1 Alloantikörper von PTP Patienten, von FNAIT Patienten hingegen nicht.

(A) HPA-1a beschichtete Partikel wurden mit inaktiviertem Normalhumanserum (NHS) und HPA-1a Alloantikörpern der PTP Patienten (1 und 2) in Abwesenheit (NK) oder Anwesenheit von Komplement (AB-Serum, 2,5 oder 5 µg humanes gereinigtes Komplement C1q) inkubiert und die Komplementbindung über einen FITC-konjugierten anti-human C1q Antikörper detektiert. Humanes gereinigtes C1q (2,5 µg) erwies sich gegenüber AB-Serum als die effektivere Komplementquelle.

(B) Die Reaktion der HPA-1a Alloantikörper wurde mit einem FITC-konjugierten anti-Human IgG Antikörper detektiert und die Fluoreszenzintensität (MFI) auf den MFI der Negativkontrolle (NHS) normalisiert.

(C) Die C1q Bindung wurde nach Inkubation mit 2,5 µg C1q durch einen FITC-konjugierten anti-Human C1q Antikörper detektiert und die Fluoreszenzintensität (MFI) auf den MFI der Negativkontrolle normalisiert.

4.3.6 NOD/SCID Mausmodell zur Analyse der HPA-1a alloantikörpervermittelten Elimination humaner Plättchen: in vivo Modell der FNAIT

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurde ein Echtzeitanalyseverfahren zur Charakterisierung der HPA-1 Alloantikörperbindung entwickelt, welches nicht nur die Spezifität der Interaktion, sondern auch die relative Konzentration und Affinität polyklonaler HPA-1 Antikörper ermittelt. Erste Hinweise zeigen, dass die Antikörperaffinität möglicherweise ein prädiktiver Parameter für die zu erwartende Blutungskomplikation ist (s. Abb. 4.19B).

Hier wurde in Kooperation mit dem *Blood Research Institute*/Milwaukee/USA die Eignung eines neuen *NOD/SCID* (*nonobese diabetic/ immune-deficient*) Mausmodells zur funktionellen Analyse der Effekte plättchenreaktiver Alloantikörper auf humane Plättchen überprüft. Eine *in vivo* Simulation der FNAIT könnte neue Aspekte zur Aufklärung der verschiedenen Antikörperspezifitäten im Zusammenhang zu ihrer klinischen Bedeutung eröffnen.

Das *NOD/SCID* Mausmodell wurde jüngst von der Newman Arbeitsgruppe (*Blood Research Institute*) erfolgreich zur Analyse der Wirksamkeit von therapeutischen anti-thrombozytären Agenzien (GPVI-spezifische murine monoklonale Antikörper) etabliert (Boylan et al., 2006).

Die hier präsentierten experimentellen Daten wurden von Dr. Brian Boylan (*Blood Research Institute*) erhoben. Die in den Versuchen eingesetzten *NOD/SCID* Mäuse sind durch einen Immundefekt anfällig für die Entwicklung eines insulinabhängigen Typ-I Diabetes. Diese Immunschwäche ermöglicht eine Zirkulation humaner Plättchen im Maussystem über einen Zeitraum von 24 h. Plättchenreiches Plasma (PRP) von HPA-1 typisierten, gesunden Spendern wurde schonend, ohne die Plättchen zu aktivieren, isoliert und 200 µl dieses PRP konzentriert via dem retro-orbitalen Plexus in die Mäuse injiziert. Nach 30 min wurden 200 µg gereinigtes humanes IgG (MelonTM Gel IgG Spin Purification Kit, s. Kapitel 4.3.2) aus den Seren von FNAIT und PTP Patienten mit humanen HPA-1a Alloantikörpern bzw. gesunden Spendern (Blutgruppe AB) intraperitoneal injiziert. Den Mäusen wurde das Blut unmittelbar nach der IgG Injektion (Zeitpunkt t = 0) und nach 1, 2, 4 und 24 h entnommen und der Anteil der humanen Plättchen an der Gesamtpopulation nach Inkubation mit dem anti- α IIb β 3 spezifischen mAK AP2 durchflusszytometrisch gemessen. In der Tabelle 4.8 sind die klinischen Patientendaten und die experimentell ermittelten Daten aus der Echtzeitanalyse und den *in vivo* Versuchen zusammen dargestellt.

Die Injektion von gereinigtem IgG einer Patientin mit posttransfusioneller Purpura (PTP) führte zu einer raschen und starken Elimination von heterozygoten HPA-1ab Plättchen (Clearance nach 24 h: 100 %) (s. Abb. 4.23A).

Im Vergleich dazu wurde bei mit humanem Normal (Nh)-IgG gesunder Spender behandelten Mäusen eine Überlebenskurve für Plättchen beobachtet, welche eine der Plättchenalterung charakteristische Kinetik reflektiert (Clearance nach 24 h: ca. 20 – 25 %) (s. Abb. 4.23A).

Von besonderem Interesse ist für uns die Analyse der IgG Fraktionen der beiden FNAIT Mütter 1 und 2 (s. Kapitel 4.3.4) aus den verschiedenen Schwangerschaften (Fall #1.1, 1.2, 1.3; 2.1, 2.2) gewesen. Es konnte hier demonstriert werden, dass auch die HPA-1a Alloantikörper aus der ersten Schwangerschaft (Fall 1.1 und 2.1) mit einer niedrigen Antikörperaffinität eine Elimination von humanen Plättchen verursachen (Clearance nach 24 h: 75 % und 40 %) (s. Abb. 4.23B). Durch HPA-1a Alloantikörper der zweiten Schwangerschaft (Fall 2.2), für welche in der Echtzeitanalyse eine Zunahme der Alloantikörperaffinität detektiert wurde, wurde eine deutlich erhöhte Plättchenelimination beobachtet (Clearance nach 24 h: 77 %) (s. Abb. 4.23B). Im Fall der FNAIT Mutter 1 konnte die entsprechende IgG Probe (1.3) aufgrund einer starken HLA-Immunsierung nicht *in vivo* untersucht werden.

Tab. 4.8: Minimale Thrombozytenzahl von FNAIT und PTP Patienten mit Darstellung der Antikörperreaktivität im MAIPA Assay, SPR-Verfahren und alloantikörpervermittelten Wirkung auf die Elimination humaner Plättchen in *NOD/SCID* Mäusen.

IgG	Blutabnahme	Plättchenzahl (*10 ⁹ /L)	MAIPA Assay	SPR [§]	Elimination humaner Plättchen nach 24 h
1.1	Postnatal nach 1. SS	4	negativ	0	75 %
1.3	Postnatal nach 2.SS	3	positiv	84	nicht untersucht wg. HLA-AK
2.1	Postnatal nach 1.SS	2	negativ	0	40 %
2.2	Pränatal während 2.SS	unbekannt	positiv	19	77 %
PTP	Thrombozytopenische Phase	unbekannt	positiv	100	100 %

Die IgG Fraktion von FNAIT (Fall 1.1; 1.3; 2.1; 2.2; siehe auch Fallberichte im Anhang) und PTP Patienten wurde mittels einer MelonTM IgG Spin Purification Column isoliert. Die Interaktion der HPA-1a Alloantikörper mit gereinigtem α IIb β 3 Protein (HPA-1a) aus humanen Plättchen wurde in der Surface Plasmon Resonance (SPR) Technologie (§: Prozent gebundener AK nach 150 s Dissoziation) von mir analysiert. Parallel wurde am Blood Research Institute in Milwaukee dieselbe IgG Fraktion in *NOD/SCID* Mäuse injiziert und die alloantikörpervermittelte Elimination humaner Plättchen durchflusszytometrisch analysiert (nach 24 h).

NOD/SCID: *nonobese diabetic/immune-deficient*; SS: Schwangerschaft;

FNAIT: fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie; PTP: posttransfusionelle Purpura;

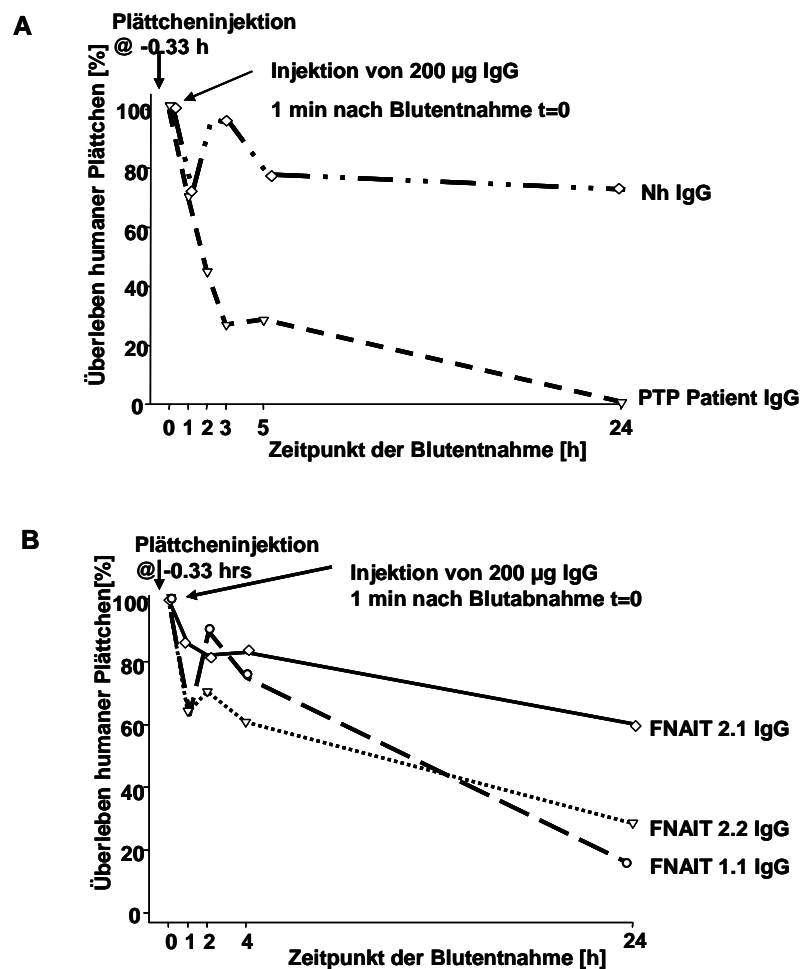


Abb. 4.23: Injektion der IgG Fraktion von anti-HPA-1a Seren führt zu spezifischer Elimination von HPA-1a positiven Plättchen in *NOD/SCID* Mäusen.

(A) Überleben humaner HPA-1 positiver Plättchen (HPA-1ab) über 24 h nach Injektion von Normal-IgG (Nh), und IgG eines PTP Patienten.

(B) Überleben humaner HPA-1a positiver Plättchen (HPA-1ab) nach Injektion der IgG-Fractionen von den maternalen anti-HPA-1a Seren der ersten Schwangerschaft (1.1, 2.1) und der zweiten Schwangerschaft (2.1).

NOD/SCID: *nonobese diabetic/ immune-deficient*

FNAIT: fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie; PTP: posttransfusionelle Purpura;

Diese Daten zeigen, dass HPA-1a Alloantikörper in *NOD/SCID* Mäusen eine Elimination von humanen Plättchen verursachen. Die Effizienz dieser Plättchenelimination könnte im Zusammenhang zur Antikörperaffinität stehen.

4.3.7 Immunisierung während PTP führt zur Bildung HPA-1a spezifischer Alloantikörper mit hoher Antikörperaffinität

In dem folgenden Abschnitt wurden die Antikörpereigenschaften von HPA-1a Alloantikörpern einer Patientin mit einer akuten posttransfusionellen Purpura (PTP) in der SPR Technik charakterisiert, um neue Einblicke in den Pathomechanismus dieser Erkrankung zu gewinnen.

Untersucht wurde hier die IgG Fraktion einer 79-jährigen Patientin, bei welcher sieben Tage nach erfolgter Transfusion von vier Erythrozytenkonzentraten postoperativ eine posttransfusionelle Purpura auftrat. Zur Behandlung ihrer Thrombozytopenie wurden zwei Plättchenkonzentrate transfundiert. Die Patientin zeigte nach Plättchensubstitution kein Inkrement. Am Tag 9 war die Plättchenzahl $< 9 \cdot 10^9/L$. Im Universitätsklinikum Rostock/Transfusionsmedizin (Dr. Kiefel) wurde durch serologische Diagnostik ein hochtitriger Antikörper gegen HPA-1a als Ursache der Thrombozytopenie im MAIPA Assay verifiziert (Kiefel et al., 2005). Die autologen Plättchen wurden HPA-1bb genotypisiert. Im indirekten MAIPA Assay wurden freie Serumantikörper gegen GPIIb/IIIa (Integrin α IIb β 3), welche spezifisch mit HPA-1a positiven Plättchen reagierten, nachgewiesen. Paradoxe Weise wurden im direkten MAIPA Assay auf den autologen HPA-1a negativen Plättchen der Patientin Antikörper gegen GPIIb/IIIa detektiert. Das Säureeluat der autologen Plättchen reagierte ebenfalls stark positiv mit HPA-1a positiven Plättchen (s. Abb. 4.24A). Interessanterweise wurden im Eluat der PTP Patientin nach Adsorption des Serums an allogene HPA-1a und HPA-1b positive Spenderplättchen Antikörper detektiert, welche nicht nur mit HPA-1a positiven, sondern auch schwach mit HPA-1a negativen Plättchen reagierten (s. Abb.4.24B). Plättchenspezifische Antikörper gegen GPIb/IX/V oder GPIa/IIa konnten ausgeschlossen werden (s. Abb. 4.24A).

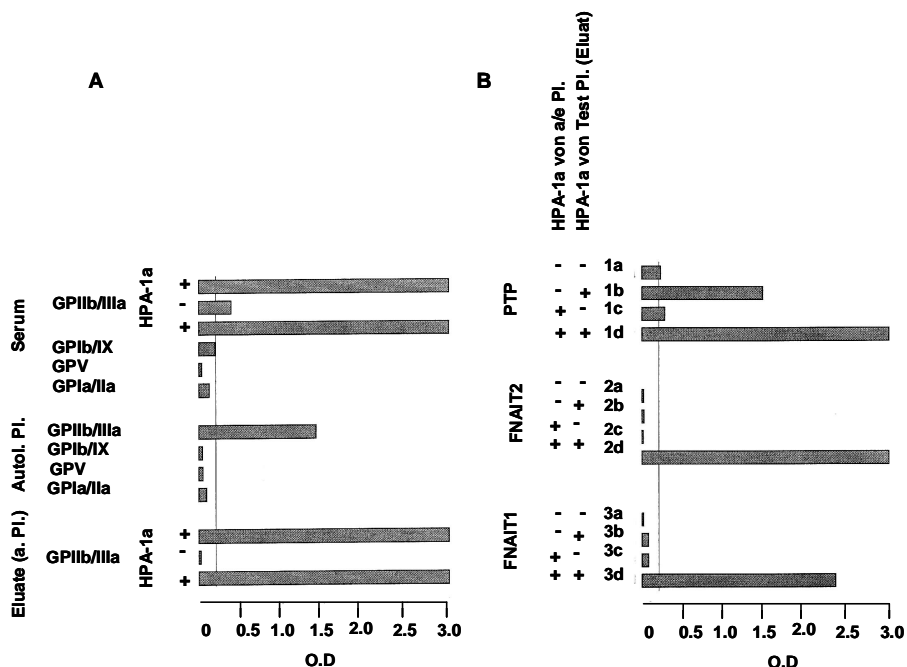


Abb. 4.24: MAIPA Ergebnisse einer Patientin mit posttransfusioneller Purpura aus Rostock. Abb. aus (Kiefel et al., 2005).

(A) Autol. Pl., a. Pl.: autologe Plättchen der Patientin

(B) HPA-1a von a/e Pl.: HPA-1a Typisierung von Plättchen zur Adsorption und Elution

Es wurde in Rostock vermutet, dass während der Immunisierung der Patientin ein kreuzreaktiver Antikörper gegen GPIIb/IIIa gebildet wurde, welcher nicht nur zur Elimination der transfundierten HPA-1a positiven Plättchen, sondern auch der autologen HPA-1a negativen Plättchen führt (Kiefel et al., 2005).

Die Existenz von Antikörpern, welche mit den autologen Plättchen kreuzreagieren, wird bereits seit langer Zeit dem Pathomechanismus der PTP zugrunde gelegt (Mueller-Eckhardt, 1986).

Zur weiteren Aufklärung des Pathomechanismus einer PTP wurde die IgG Fraktion aus dem Serum der PTP Patientin (#1) isoliert und die Interaktion des Antikörpers an HPA-1a und HPA-1b in der Oberflächenplasmonresonanz Technologie unter Echtzeitbedingungen analysiert.

Entgegen der Vermutung (s. oben) konnte ich in der Echtzeitanalyse keine pseudoreaktiven Autoantikörper gegen α IIB β 3 nachweisen. Nach erfolgter Injektion wurde eine schnelle und starke Interaktion der Antikörper an HPA-1a beobachtet, verdeutlicht durch einen steilen Anstieg und ein hohes Resonanzsignal (490.8 RU) nach einer Assoziationszeit von 150 s. Hingegen wurde keine Reaktion mit HPA-1b detektiert. Die Antigen-Antikörperkomplexe blieben auch unter Dissoziationsbedingungen nach 150 s vollständig bestehen (100 % gebundenes IgG) (s. Abb. 4.25A). Diese Beobachtungen reflektieren die hohe Antikörpertiter und die Antikörperaffinität, welche für die PTP postuliert wurden. Eine HPA-1a spezifische Interaktion wurde auch bei der Analyse von zwei weiteren Antiseren von PTP Patienten (#2 und 3) aus einer thrombozytopenischen Phase detektiert (s.Tab. 4.9).

Tab. 4.9: Reaktionen von PTP HPA-1a Alloantikörpern im MAIPA, PAIFT und SPR.

PTP Patient	PAIFT	MAIPA OD [490nm]	SPR§	
			Resonanzsignal [RU] nach 150 s Ass.	% IgG nach 150 s Diss.
1	4+	3.0	490.3	100
2	4+	3.05	132.4	84
3	3+	2.89	110.8	100

Die IgG Fraktionen von Patienten mit posttransfusionelle Purpura (PTP) aus einer thrombozytopenischen Phase, deren HPA-1a Alloantikörper nachweislich stark positiv in konventionellen Testverfahren (PAIFT, MAIPA Assay) reagieren, wurden in der Surface Plasmon Resonance (SPR) Technologie untersucht. Die Interaktion der Antikörper an immobilisiertes α IIB β 3 Protein (HPA-1a) wurde über einen Zeitraum von 300 sec (Assoziation und Dissoziation) gemessen. Die Signalstärke am Ende der Assoziationsphase [RU] reflektiert die relative Antikörpermenge, die Menge an % gebundene IgG nach 150 s Dissoziation die Antikörperaffinität.

Darüber hinaus reagierte die IgG Fraktion eines Patienten mit einer Autoimmunthrombozytopenie (AITP), dessen Serum freie Autoantikörper gegen α Ib β 3 enthielt, sowohl mit α Ib β 3 der HPA-1a, als auch der HPA-1b Isoform. Das verdeutlicht, dass das immobilisierte α Ib β 3 Protein vermutlich α Ib β 3 Autoepitope exprimiert (s. Abb. 4.25B). Die Beobachtungen der Echtzeitanalyse geben Anlass zu der Annahme, dass bei der untersuchten Patientin keine pseudospezifischen Autoantikörper gegen α Ib β 3 vorliegen. Eine Säureelution von allogenen Plättchen könnte möglicherweise nicht nur plättchenspezifische Antikörper, sondern auch andere plättchenassoziierte Proteine oder Immunkomplexe eluieren und ein falsch positives Testergebnis verursachen.

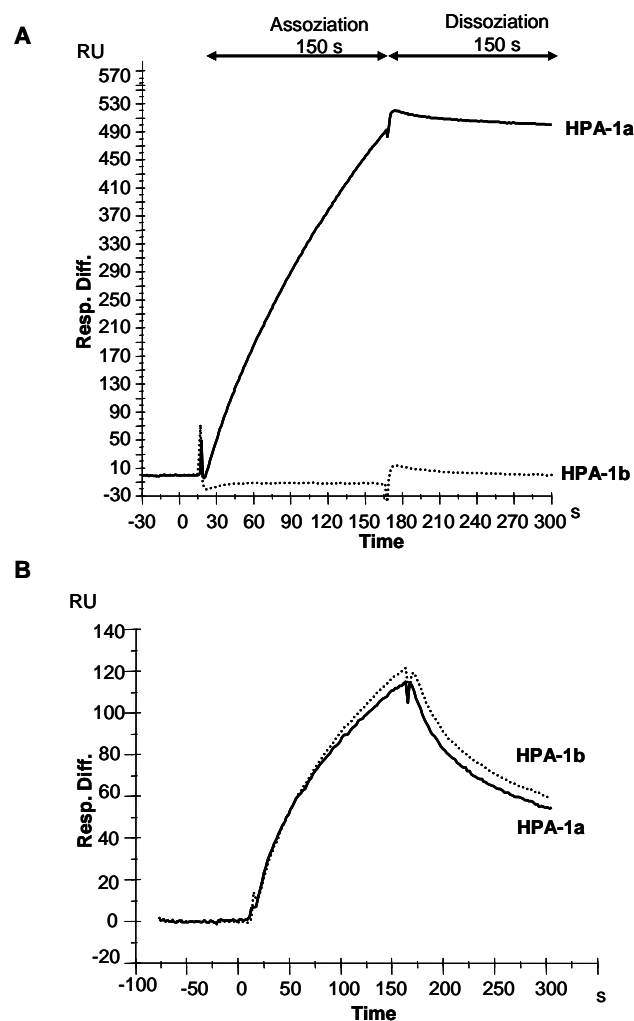


Abb. 4.25: Surface Plasmon Resonance (SPR) Analyse von anti-HPA-1a Alloantikörpern aus Patienten mit posttransfusioneller Purpura (PTP) und α Ib β 3-spezifischen Autoantikörpern.

Die Bindungskinetik (Assoziation und Dissoziation) wurde im Sensorgramm aufgezeichnet: relativer Responseunterschied (Resonanz Units, RU) vs. Zeit (s). Das aufgereinigte IgG (25 - 50 μ g) wurde seriell bei einer Flussgeschwindigkeit von 10 μ l/min injiziert. Nach einer Assoziationsphase von 150 s wurde Probenpuffer über die Flusszellen geführt und die Dissoziation für 150 s verfolgt. Die bestehen gebliebenen Antigen-Antikörper-Komplexe wurde ermittelt als prozentualer Anteil der relativen Response zu Beginn und zum Ende der Dissoziationszeit.

(A) HPA-1a spezifische Interaktion der IgG Fraktion einer PTP Patientin aus einer thrombozytopenischen Phase.
 (B) α Ib β 3-spezifische Interaktion der IgG Fraktion einer Patientin mit Autoimmunthrombozytopenie (AITP).

Die hier dargestellten Befunde sind mit der Hypothese vereinbar, dass eine Adsorption von Fragmenten transfundierter HPA-1a positiver Plättchen oder zirkulierender Immunkomplexe an autologe Plättchen der Patientin eine Elimination der HPA-1a negativen Patientenplättchen bewirkt (Kickler et al., 1986; Shulman et al., 1961).

4.4 Heterogenität von HPA-3 Alloantikörpern und deren Auswirkungen auf die Diagnostik von Alloimmunthrombozytopenien

Eine Immunisierung gegen das Plättchenalloantigen HPA-3a auf der α Ib Untereinheit des α Ib β 3 Integrins ist für ca. 2 % aller FNAIT Fälle verantwortlich (Glade-Bender et al., 2001; Kroll et al., 2005b). HPA-3a Alloantikörper verursachen erhebliche Schwierigkeiten in der serologischen Diagnostik (Harrison et al., 2003). Es wird vermutet, dass die Relevanz der HPA-3 Alloantikörper, welche meist mit einer sehr schweren fetalen und neonatalen Thrombozytopenie assoziiert sind, weit unterschätzt wird. Daher wurde in diesem Projekt retrospektiv die Reaktivität von 12 HPA-3a und 2 HPA-3b Alloantikörpern von Patienten mit FNAIT (n = 12) und PTP (n = 2) (s. Tab. 4.10) durch serologische (MAIPA Assay, Durchflusszytometrie) und immunochemische (Immunpräzipitation, Immunoblot) Methoden untersucht. Der Einfluss von Reduktion, Plättchenalterung, Lagerungsbedingungen und Sialinsäuren wurde analysiert.

Tab. 4.10: Klinische Daten der FNAIT und PTP Fälle durch anti-HPA-3a und -3b Antikörper.

Patient Nr.	Thrombozytenzahl *10 ⁹ /L	Positive Familienanamnese	Blutungs-Komplikation	Behandlung
FNAIT Fälle				
1	40	ja	HB	PLT Tx (M), IVIG pränatal
2	7	Erstimmunisierung	keine	PLT Tx (R), IVIG, Steroide
3	9	nein	HB	PLT Tx (R, M)
4	7	Erstimmunisierung	HB	PLT Tx (R), IVIG, Steroide
5	3	nein	nein	unbekannt
6	10	ja	nein	Nabelschnurvenenthrombose, fatal
7	14	unbekannt	unbekannt	unbekannt
8	unbekannt	ja	nein	keine
9	13	nein	HB	IVIG, Steroide
10	1	ja	nein	PLT Tx (M) pränatal
11	9	Erstimmunisierung	HB	PLT Tx (R), IVIG
12	6	Erstimmunisierung	HB, IB	IVIG
PTP Fälle				
13	30		keine, MDS	keine
14	5		HB	PLT Tx, IVIG, Steroide

Blutungskomplikationen: Hautblutung (HB), intrakranielle Blutung (IB). Therapie: Transfusion von Plättchenkonzentraten (PLT Tx), random (R) oder maternal (M); intravenöse Gabe von Immunglobulinen (IVIG), und Steroide. MDS: myelodysplastisches Syndrom.

4.4.1 Die Reaktivität von HPA-3 Alloantikörpern ist abhängig von der HPA-3 Gendosis und der komplexspezifischen α Ib β 3 Präsentation

Um eine in folgenden Abschnitten beschriebene Charakterisierung von HPA-3 Alloantikörpern unter homogenen Bedingungen vorzunehmen, wurde zunächst in Experimenten der Einfluss von HPA-3 Phänotypen und monoklonalen Antikörpern (mAK) auf die Antigenpräsentation evaluiert.

Die Reaktivität von HPA-3 Alloantikörpern wurde mit frischen Blutplättchen (Tag 0 nach Plättchenisolierung) von 7 gesunden Thrombozytenspendern im MAIPA Assay analysiert. Die Selektion der Spender erfolgte blutgruppenabhängig (BGO), um eine Kreuzreaktivität mit ABH Antigenen auf der Plättchenoberfläche auszuschließen (Mollicone et al., 1988; Santoso et al., 1991). Das Kollektiv umfasst 2 HPA-3aa, 2 HPA-3ab und 2 HPA-3bb Individuen.

Die HPA-3 Alloantikörperbindung zeigte einen deutlichen, Gendosis-abhängigen Effekt, d.h. die anti-HPA-3 Seren reagierten wesentlich stärker mit homozygoten (HPA-3a oder HPA-3b) im Vergleich zu heterozygoten Plättchen (s. Abb. 4.26A). Es ist anzumerken, dass für 5 schwach reaktive anti-HPA-3 Seren (#5, 6, 7, 11 und 12) eine Extinktion (O.D.) unterhalb der Testnachweisgrenze mit HPA-3ab Phänotypen gemessen wurde.

Glykoproteinspezifische mAK können die Bindung des Humanantikörpers an sein korrespondierendes Antigen kompetitiv inhibieren, wenn die Epitope angrenzend sind (Morel-Kopp et al., 1996).

Daher wurde die HPA-3 Alloantikörperreaktivität mit mAK gegen verschiedene Epitope auf α Ib β 3 mit HPA-3 homozygoten Plättchen im MAIPA Assay analysiert. Unter Verwendung des α Ib β 3-komplexspezifischen mAK Gi5 waren alle anti-HPA-3 detektierbar, mit dem mAK P2 (α Ib β 3-Komplex) bis auf eine Ausnahme auch. Hingegen konnten die mAK SZ21 (β 3-Untereinheit) und SZ22 (α Ib-Untereinheit) HPA-3 Alloantikörper nicht zuverlässig nachweisen (s. Abb. 4.26B).

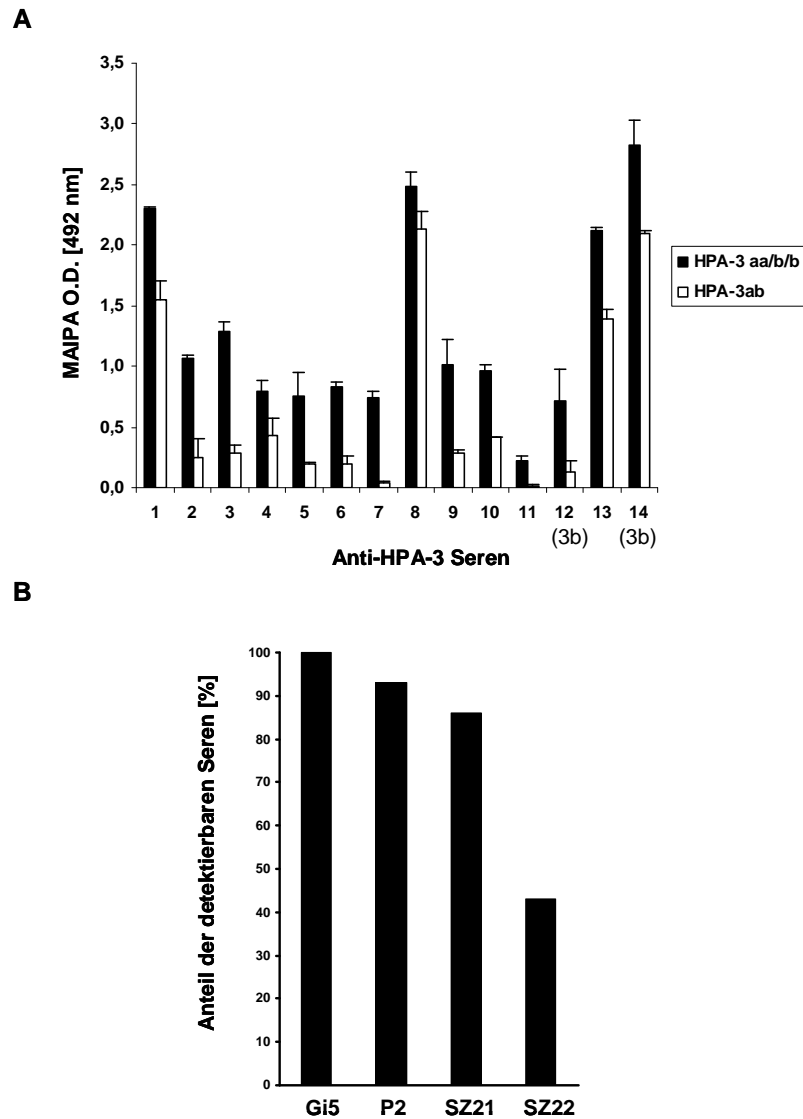


Abb. 4.26: Reaktivität von HPA-3 Alloantikörpern in Abhängigkeit vom Phänotyp der Plättchen und der Spezifität mAK gegen α IIb β 3 im MAIPA Assay. Die Serumnummern beziehen sich auf Tab. 4.10.

(A) Homozygote (HPA-3aa und HPA-3bb) und heterozygote (HPA-3ab) Plättchen wurden mit den Antiseren und dem α IIb β 3-spezifischen mAK Gi5 inkubiert und nach dem Waschen lysiert. Die gebundenen Humanantikörper wurden über einen Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper in einer chromogenen Enzym-Substrat Reaktion nachgewiesen. Eine positive Reaktion wird definiert als die Differenz der Extinktion (O.D.) gegenüber nicht-gecoateten Vertiefungen der Mikrotiterplatte > 0.2.

(B) Prozentualer Anteil der nachgewiesenen HPA-3 Alloantikörper unter Verwendung von homozygoten Plättchen und verschiedenen mAK gegen α IIb β 3: Gi5 (α IIb β 3-Komplex), P2 (α IIb β 3-Komplex), SZ21 (β 3-Untereinheit) und SZ22 (α IIb Untereinheit).

Diese Daten deuten darauf hin, dass sich HPA-3 Epitope optimal mit α IIb β 3-komplexspezifischen mAK darstellen lassen.

4.4.2 Sequenzanalyse bestätigt den HPA-3 Dimorphismus

Um einen Einfluss hypothetischer α IIb Polymorphismen auf die Konformation von HPA-3 Epitopen auszuschließen, wurde eine 1457 Basenpaare große Region (1604 - 3061) der α IIb cDNA aller HPA-3aa und HPA-3bb Individuen, welche den HPA-3 Dimorphismus (T2621G) beinhaltet, sequenziert.

Kohlenhydratstrukturen sind möglicherweise an der Expression von HPA-3 Epitopen beteiligt (Calvete and Muniz-Diaz, 1993; Djaffar et al., 1993; Goldberger et al., 1991). Daher wurden alle potentiellen N- und O-Glykosylierungsstellen auf dem α IIb Integrin in die Sequenzanalyse mit eingeschlossen.

Die aus Plättchen isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben, eine 1457 Basenpaare große Region von α IIb in einer geschachtelten PCR amplifiziert (s. Abb. 4.27A), die spezifischen Fragmente (I: 1604 - 2149; II: 1895 - 2424; III: 2474 - 3061) in einer präparativen Gelelektrophorese konzentriert und nach Aufreinigung mit spezifischen Primern sequenziert. Es wurde mit Ausnahme des HPA-3 assoziierten Ile843Ser Dimorphismus keine zusätzliche Mutation entdeckt (s. Abb. 4.27B). Alle in dieser Studie eingeschlossenen Plättchenspender sind hinsichtlich ihrer HPA-3a oder HPA-3b Allelform identisch.

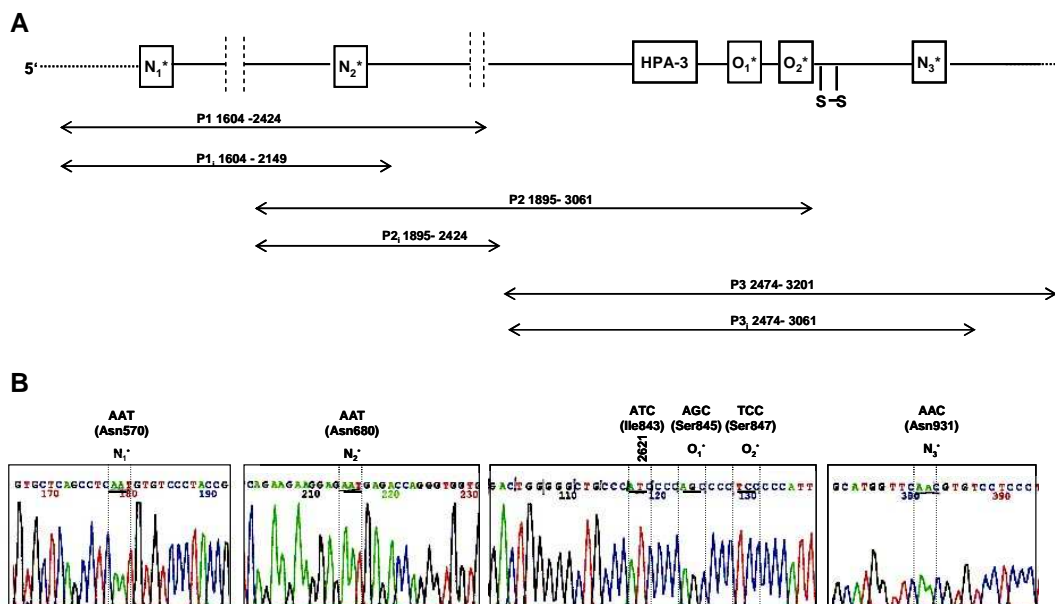


Abb. 4.27: Sequenzierung einer 1457 pb großen Region auf der α IIb cDNA von typisierten HPA-3 Spendern detektiert keine zusätzlichen Mutationen.

(A) Sequenzierungsstrategie. Die α IIb cDNA wurde in einer geschachtelten PCR amplifiziert (Primersequenzen, s. Tab. 2.1) und die PCR-Produkte aus der zweiten PCR sequenziert. Fragment I (1604 - 2149): potentielle N₁*-Glykosylierung, Fragment II (1895 - 2424): potentielle N₂*-Glykosylierung, Fragment III (2474 - 3061): HPA-3 Polymorphismus, potentielle O₁* und O₂*-Glykosylierung und N₃*-Glykosylierung

(B) Sequenzierung am Beispiel eines HPA-3aa Spenders. Es wurden keine neuen Mutationen in der α IIb cDNA (1604-3061) Sequenz gefunden.

4.4.3 HPA-3 Alloantikörper unterscheiden sich in ihrem Bindungsverhalten mit gelagerten Plättchen

Zur Analyse der HPA-3 Antigenstabilität wurden Testplättchen von HPA-3aa und HPA-3bb Individuen isoliert und bei 4 °C gelagert. Die HPA-3 Alloantikörperreaktivität wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen sequentiell im MAIPA Assay untersucht.

Alle Antiseren waren mit frisch isolierten Plättchen (Tag 0) reaktiv, d.h. die im MAIPA Assay erforderliche Plättchenlyse beeinträchtigt nicht die Konformation der HPA-3 Antigene. Interessanterweise wurde unter den gewählten Lagerungsbedingungen eine kontinuierliche Abnahme der HPA-3 Alloantikörperreaktivität beobachtet. Am Tag 14 waren drei verschiedene Reaktionstypen von anti-HPA-3 Antikörpern zu differenzieren: A. vollständiger Reaktionsverlust (n = 6), B. starke Verminderung der Reaktivität (Abnahme $\geq 50\%$, n = 3) und C. geringer Reaktionsverlust (Abnahme $\leq 40\%$, n = 5) (s. Abb. 4.28).

Im Vergleich war die Reaktivität eines anti-HPA-1a Alloantikörpers über den gesamten Zeitraum stabil (s. Abb. 4.28A).

Das Reaktionsvermögen mit gelagerten Plättchen (Typ A, B, C) war nicht mit dem Serumtiter assoziiert (p = 0.227, Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks) (s. Abb.4.28 Legende).

Diese Ergebnisse demonstrieren, dass HPA-3 Alloantikörper hinsichtlich ihrer Reaktivität mit gelagerten Plättchen heterogen sind. Einige HPA-3 Alloantikörper reagieren mit „lagerungsempfindlichen“ Epitopen, während andere mit „lagerungsstabilen“ Epitopen reagieren.

Die weiteren serologischen und immunchemischen Untersuchungen wurden durchgeführt, um die strukturelle Heterogenität von HPA-3 Epitopen aufzuklären und einen möglichen Zusammenhang zu den hier beschriebenen Reaktionstypen (Typ A, B, C) zu finden. Zur Übersicht sind in der Tabelle 4.11 alle in folgenden Kapiteln dargestellten Ergebnisse zusammengefasst.

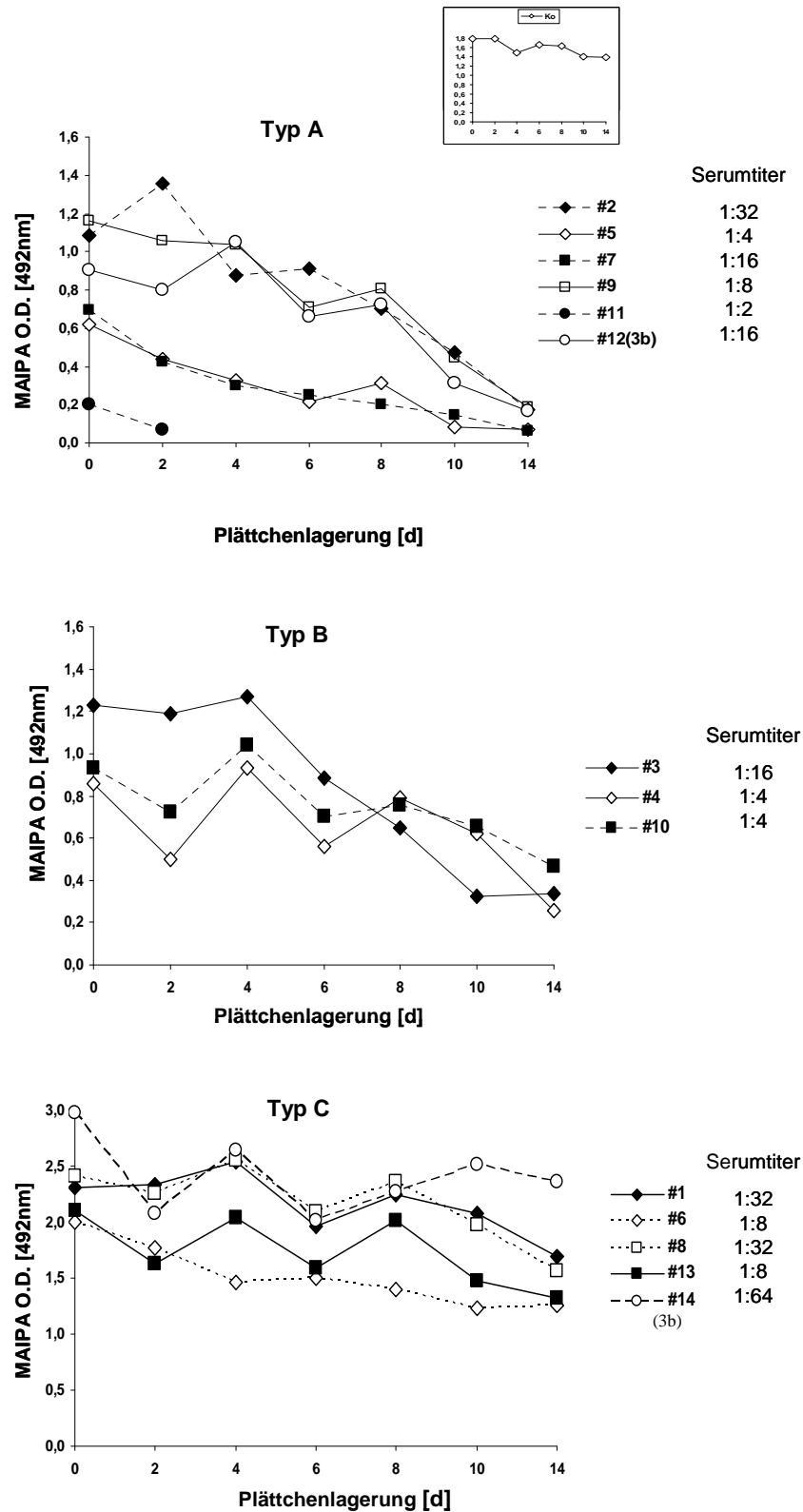


Abb.4.28: Analyse der HPA-3 Alloantikörperreaktivität während einer Lagerungsperiode von 14 Tagen (d) im MAIPA enthüllt bestimmte HPA-3 Alloantikörper mit einer Spezifität gegen „lagerungsinstabile“ HPA-3 Epitope. Die Serumnummern beziehen sich auf Tab. 4.10.

Die Reaktionsstärke von HPA-3 Alloantikörpern wurde kontinuierlich (alle 2 Tage) mit Gi5 als Fangantikörper im MAIPA Assay gemessen. 3 Reaktionstypen von HPA-3 Alloantikörpern wurden beobachtet: Typ A (vollständiger Reaktionsverlust nach 14 d), Typ B (stark verminderte Reaktivität, $\geq 50\%$) und Typ C (geringer Verlust der Reaktivität, $\leq 40\%$). Eine O.D. > 0.2 wurde als positive Reaktion beurteilt.

Einige Studien haben gezeigt, dass der Nachweis von HPA-3 Alloantikörpern in Bindungstests mit intakten Plättchen gegenüber den glykoproteinspezifischen Immunoassays, welche eine Plättchenlyse erfordern, sensitiver ist (Harrison et al., 2003).

Maternale HLA Antikörper gegen HLA Klasse-I Antigene, welche häufig während der Schwangerschaft gebildet werden, erschweren jedoch eine Differenzierung von spezifischen plättchenreaktiven Alloantikörpern in solchen Bindungstests.

Die Reaktivität von 9 anti-HPA-3 Seren ohne HLA-Antikörperreaktivität wurde durchflusszytometrisch unter Verwendung von frischen HPA-3 homozygoten Plättchen untersucht (s. Abb. 4.29). Alle anti-HPA-3a Alloantikörper (Typ A und Typ B), welche gegen „lagerungsinstabile“ Epitope gerichtet sind, konnten mit intakten Plättchen detektiert werden. Das anti-HPA-3a Serum (#6) der Reaktivität Typ C konnte spezifisch nachgewiesen werden, jedoch obgleich seiner starken Reaktivität im MAIPA Assay durchflusszytometrisch nur mit geringer Fluoreszenzintensität. Das anti-HPA-3b Serum (#12), welches ein „lagerungsinstabiles“ Epitop erkennt (Typ A) zeigte ebenso eine schwache Reaktivität.

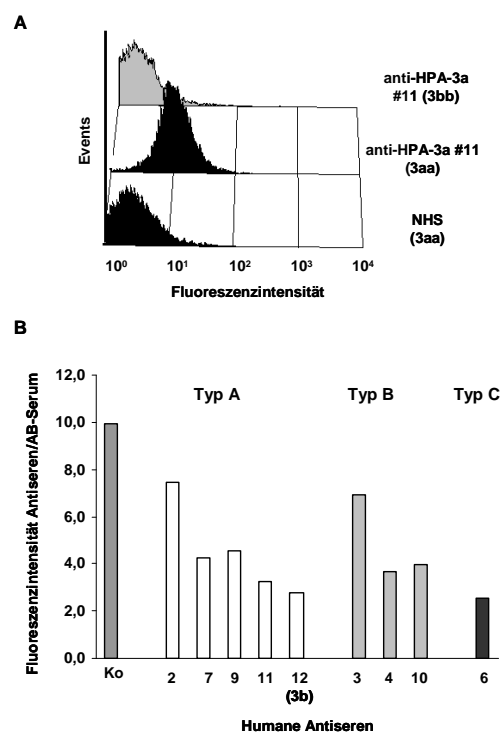


Abb. 4.29: Anti-HPA-3 lassen sich mit frischen intakten Plättchen durchflusszytometrisch detektieren. HPA-3 Antiseren wurden mit frischen HPA-3 homozygoten (HPA-3aa und HPA-3bb) Plättchen inkubiert und die gebundenen Humanantikörper über einen FITC-konjugierten Sekundärantikörper gemessen. (A) HPA-3 Alloantikörper reagierten spezifisch mit ihrem korrespondierenden Antigen. (B) Die Fluoreszenzintensität ist als Geomean angegeben. Die Reaktivität der HPA-3 Alloantikörper wurde auf die der negativen Kontrolle (AB-Serum) normalisiert. Typ A, B und C beziehen sich auf Abb. 4.28.

Dies bedeutet, dass einige HPA-3 Epitope lagerungsinstabil sind und zur Epitoppäsentation frische HPA-3a bzw. - 3b homozygote Plättchen erforderlich sind.

Tab. 4.11: Serologische Beobachtungen mit anti-HPA-3a und anti-HPA-3b Alloantikörpern.

Serumnr.	Durchflusszytometrie 1)	MAIPA Assay 2)					Immunchemische Analysen		
		HLA abs	Frische PLT Titer (d = 0)	Gelagerte PLT (d = 14)	N2 PLT	CHO Zellen 3)	IB	IP	
1	n. u.	+	1:32	++++	++++	++++	++	+	α Ib
2	7.44	-	1:32	+++	-	++++	-	+	α Ib
3	6.9	-	1:16	++++	+	+	++	-	α Ib β 3
4	3.64	-	1:4	+++	+	++	+	-	α Ib β 3
5	n.u.	+	1:4	++	-	-	++	-	α Ib β 3
6	2.53	-	1:8	++++	++++	+++	n. u.	-	α Ib β 3
7	4.25	-	1:16	++	-	+	-	-	α Ib β 3
8	n. u.	+	1:32	++++	++++	++++	++++	-	α Ib β 3
9	4.53	-	1:8	+++	-	++	-	-	-
10	3.98	-	1:4	+++	++	++	+++	-	α Ib β 3
11	3.25	-	1:2	+	-	-	-	-	-
12 (3b)	2.78	-	1:16	+++	-	++++	+++	-	-
13	n. u.	+	1:8	++++	++++	++++	n. u.	n. u.	n. u.
14 (3b)	n. u.	+	1:64	++++	++++	++++	n. u.	n. u.	n. u.

1) Fluoreszenzintensität in der Durchflusszytometrie: Der Geomean der anti-HPA-3 Seren wurde auf die Reaktivität des Normalserums (AB)

2) Klassifikation der Reaktionsstärken (O.D.) im MAIPA Assay: < 0.2 (-), 0.2 – 0.4 (+), 0.4 – 0.8 (++) , 0.8 – 1.2 (+++) und > 1.2 (++++).

3) CHO: Chinese hamster ovary, HPA-3a oder HPA-3b Varianten wurden für die entsprechenden Seren eingesetzt. IB: Immunoblot, normalisiert. IP: Immunpräzipitation. n.u. = nicht untersucht

4.4.4 Rekombinante Proteine aus CHO Zellen exprimieren keine HPA-3 Epitope

Eine tägliche Akquirierung von Thrombozytenspendern zur Isolierung von frischen HPA-3 homozygoten Plättchen, welche zur Diagnostik von anti-HPA-3 FNAIT Verdachtsfällen erforderlich wären, ist nur in Ausnahmefällen möglich.

In den folgenden Experimenten wurde analysiert, ob sich stabile CHO-Zelllinien, welche die allelspezifischen α IIb Isoformen Ile843 (HPA-3a) und Ser843 (HPA-3b) exprimieren, zum Nachweis von anti-HPA-3 Alloantikörpern im MAIPA Assay eignen.

Es wurden nur maternale Antiseren analysiert, da eine Heterogenität der HPA-3 Alloantikörperreaktivität mit gelagerten Plättchen nur in FNAIT Fällen beobachtet wurde.

Sechs der untersuchten anti-HPA-3a Seren reagierten spezifisch mit rekombinantem HPA-3a, und nicht mit HPA-3b. Vier der HPA-3a Antiseren erkannten auf CHO-Transfektanten exprimiertes HPA-3a nicht. Interessanterweise zeigen alle diese HPA-3a Antiseren eine Typ A Reaktion, d.h. sie reagieren mit lagerungsempfindlichen Epitopen. Das anti-HPA-3b Serum konnte spezifisch mit rekombinantem HPA-3b nachgewiesen werden (s. Abb. 4.30).

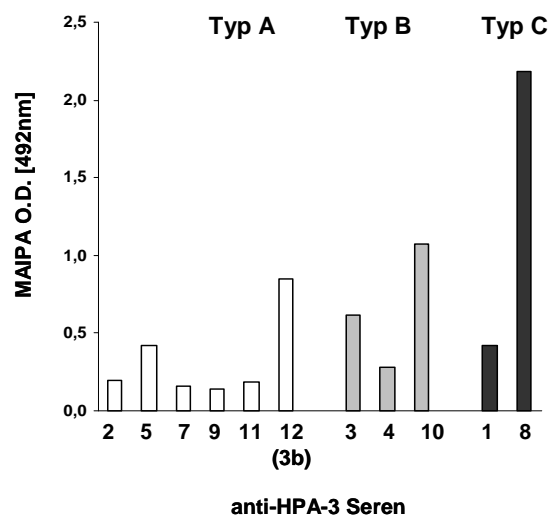


Abb. 4.30: Rekombinante Proteine aus CHO-Zellen (α IIb-Ile843, -Ser843) exprimieren nur bestimmte HPA-3 Epitope.

CHO K1-Zellen, welche mit allelspezifischen β 3 (Leu33) und α IIb (Ile843 und Ser843) Konstrukten kotransfiziert wurden, wurden mit anti-HPA-3 Seren und α IIb β 3-komplexspezifischen mAK Gi5 inkubiert und gewaschen. Nach der Lyse wurden die gebundenen Humanantikörper mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper in einer chromogenen Enzym-Substrat-Reaktion nachgewiesen. (Typ A, B und C beziehen sich auf Abb. 4.28)

Dies bedeutet, dass HPA-3 Epitope nicht durch rekombinante Proteine aus CHO Zellen dargestellt werden können.

4.4.5 Sialinsäuren beeinflussen die Konformation von HPA-3 Epitopen

Da einige HPA-3a Antiseren nicht mit α IIB β 3 auf CHO-Transfektanten reagierten, wurde weitergehend untersucht, ob die Glykosylierung zur Bildung des HPA-3a Epitops beiträgt. Aus der Literatur ergeben sich Hinweise auf einen Einfluss von Sialinsäuren (Santoso et al., 1993b; Take et al., 1990).

Um nachzuweisen, ob die Bindung von HPA-3a Alloantikörpern Sialinsäure-abhängig ist, wurden HPA-3a Antiseren an Neuraminidase-behandelte (N+) und unbehandelte (N-) Plättchen absorbiert. Die Adsorbate wurden im MAIPA Assay mit frischen (Tag 0) HPA-3a homozygoten Plättchen und unter Verwendung des α IIB β 3-spezifischen mAK Gi5 absorbiert. Es ergeben sich folgende Ansätze: verdünntes Serum ohne Vorabsorption (OD_{max}), verdünntes Serum nach Vorabsorption (OD_{test}) und AB-Serum (OD_{blank}).

Der prozentuale Anteil der Absorption wurde im Verhältnis zum unabsorbierten Serum wie folgt ermittelt:

$$Absorption (\%) = \left(1 - \frac{OD_{test} - OD_{blank}}{OD_{max} - OD_{blank}}\right) \times 100\%$$

In 7 Fällen wurden anti-HPA-3a Alloantikörper sowohl durch Neuraminidase-behandelte (N+) und durch unbehandelte (N-) Plättchen absorbiert, d.h. diese Antikörper erkennen Sialinsäure-unempfindliche Epitope. Im Gegensatz dazu wurde für 4 HPA-3a Alloantikörper keine (#11) oder eine verminderte Absorption (#2, 3, 7) durch Neuraminidase-behandelte (1.5 - 26.7 %) im Vergleich zu unbehandelten Plättchen (38.2 - 56.5 %) beobachtet (s. Abb. 4.31).

Die HPA-3a Alloantikörperreaktivität nach Neuraminidaseverdau war mit dem Reaktionsverhalten (Typ A, B, C) nach Plättchenlagerung assoziiert. HPA-3a Alloantikörper, welche gegen „lagerungsstabile“ Epitope (Typ C) gerichtet sind, erkennen Neuraminidase-unempfindliche Epitope, während die Mehrheit der Antikörper gegen „lagerungsempfindliche“ HPA-3a Epitope (Typ A und B) auch Neuraminidase-empfindlich sind.

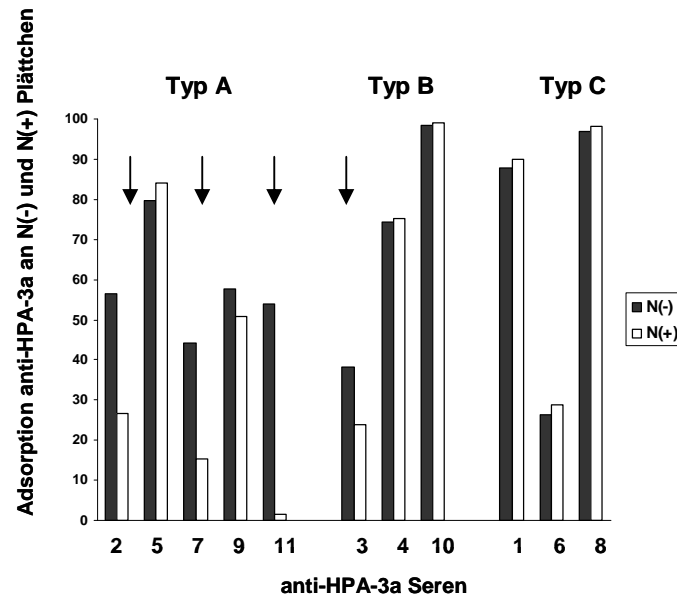


Abb. 4.31: Bestimmte HPA-3a Alloantikörper erkennen Neuraminidase-empfindliche HPA-3 Epitope, die instabil während einer Plättchenlagerung bei 4°C sind.

Die HPA-3a Alloantikörperreaktivität wurde nach Vorabsorption mit HPA-3a positiven, Neuraminidase-behandelten (N+) und unbehandelten (N-) Plättchen im MAIPA Assay mit frischen HPA-3a homozygoten Plättchen analysiert.

Die Ergebnisse sind als % Adsorption angegeben. Neuraminidase-empfindliche Seren sind durch einen Pfeil gekennzeichnet (reduzierte Adsorption an N+ gegen N-). Typ A, B und C beziehen sich auf Abb. 4.28.

Diese Beobachtungen wurden mit Immunoblot-reaktiven HPA-3a Alloantikörpern (s. 4.4.6) bestätigt. HPA-3a homozygote Plättchen wurden unmittelbar nach der Isolierung mit Neuraminidase verdaut oder für 14 Tage bei 4 °C gelagert. Die Plättchen wurden lysiert und die Reaktivität mit α Ib- (SZ22) und β 3-spezifischen (SZ21) mAK oder HPA-3a Antiseren (#1 und 2) analysiert. Der Sialinsäureverlust nach Neuraminidasebehandlung war deutlich durch eine Verschiebung des α Ib-Molekulargewichts von 145 auf 138 KDa erkennbar. Im Kontrollexperiment wurde keine Veränderung des β 3-Molekulargewichts beobachtet (s. Abb. 4.32A). Das anti-HPA-3a Serum #1 (Typ C) zeigte eine unveränderte Reaktivität mit α Ib sowohl nach Neuraminidaseverdau, als auch nach Plättchenlagerung. Im Vergleich reagierte das anti-HPA-3a Serum #2 (Typ A) nicht mit desialyliertem α Ib und stark vermindert mit gelagerten Plättchen (s. Abb. 4.32B). Die Veränderungen in der α Ib-Glykosylierung nach Neuraminidase-Verdau und Plättchenlagerung (14 Tage) wurden in Versuchen mit dem Lektin-bindenden Protein (WGA) überprüft (s. Abb. 4.32C).

Dies bedeutet, dass Sialinsäuren zur Expression von HPA-3 Epitopen beitragen. Die Empfindlichkeit von HPA-3 Epitopen gegenüber Sialinsäuren steht im Zusammenhang zur beobachteten Lagerungsinstabilität.

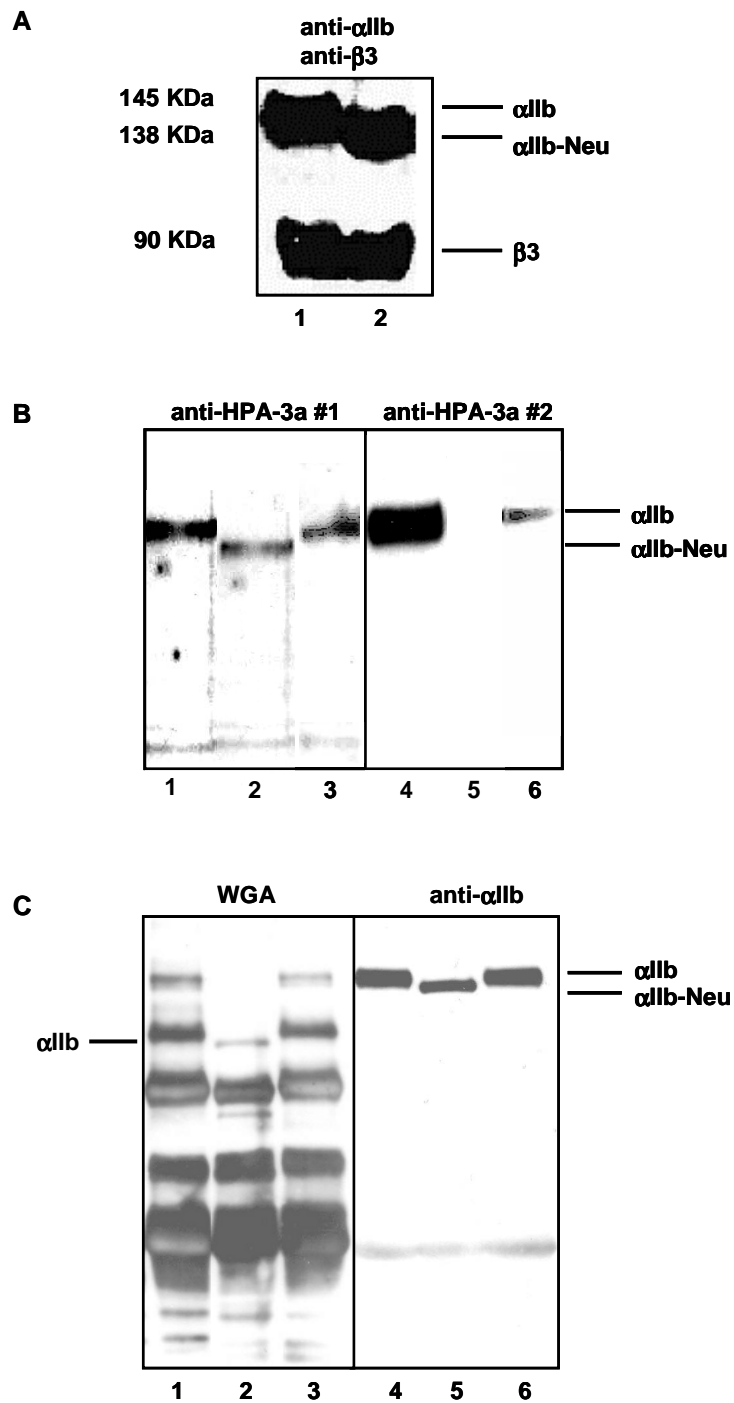


Abb. 4.32: Immunchemische Analyse zeigt eine Empfindlichkeit von bestimmten HPA-3 Alloantikörpern gegenüber desialyliertem α IIb.

Nach Lyse wurden die Plättchenproteine in einer 7.5 % SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und die Reaktivität von anti- α IIb und - β 3 spezifischen Antikörper durch Chemilumineszenz visualisiert.

(A) Die Reaktivität der α IIb (SZ22)- und β 3 (SZ21)-spezifischen mAK wurde mit unbehandelten (1) und Neuraminidase-verdauten (2) Plättchenproteinen analysiert.

(B) Die Reaktivität von anti-HPA-3a Serum 1 (Typ C) und 2 (Typ A) mit unbehandelten (1, 4), Neuraminidase-verdauten (2, 5) und gelagerten (3, 6) Plättchen. Typ A, C beziehen sich auf Abb. 4.28.

(C) Die Plättchenproteine wurden mit einem Lektin-bindenden Protein aus Weizenkeimen (WGA) inkubiert.

α IIb-Neu (desialyliertes α IIb)

4.4.6 HPA-3a Alloantikörper erkennen α Ib β 3-komplexspezifische Epitope

Um den Einfluss der α Ib β 3 Integrinstruktur auf die Konformation von HPA-3 Epitopen zu analysieren, wurden die anti-HPA-3 Seren im Immunoblot und in der Immunpräzipitation charakterisiert. Unter den denaturierenden Bedingungen im Immunoblot reagierten nur die anti-HPA-3a Seren #1 und #2 mit der α Ib-Untereinheit, alle anderen anti-HPA-3a (z.B. #4) und -3b hingegen nicht (s. Abb. 4.33A). Dies deutet darauf hin, dass beide Integrinuntereinheiten an der HPA-3 Epitopkonformation beteiligt sind.

Um diese Beobachtungen zu bestätigen, wurde eine Immunpräzipitation in Abwesenheit von EDTA durchgeführt. In der Abb. 4.33 (links) ist zu sehen, dass der mAK Gi5 (anti- α Ib β 3 Komplex) die α Ib- und β 3-Untereinheit gleich stark präzipitierte, hingegen die mAK SZ21 (anti- β 3) und SZ22 (anti- α Ib) bevorzugt die β 3- bzw. α Ib-Untereinheit. Eine Immunpräzipitation frisch isolierter HPA-3aa Plättchenlysate enthüllte zwei unterschiedliche Reaktionstypen von HPA-3a Alloantikörpern. Die anti-HPA-3a Seren #1 und #2 präzipitierten vorzugsweise die α Ib-Untereinheit, während die anderen anti-HPA-3a Seren (z.B. #4) das α Ib β 3 Heterodimer erkannten (s. Abb. 4.33B, s. Tab. 4.11). Um einen konzentrationsabhängigen Effekt der Antikörper auszuschließen, wurden verschiedene Serumverdünnungen (unverdünnt, 1:2 und 1:5) ausgetestet. Es wurden keine Unterschiede im Reaktionsmuster beobachtet. Die Tatsache, dass das verdünnte Serum #1 (1:5) nur die α Ib-Untereinheit präzipitierte, bestätigt die Spezifität dieses Antikörpers gegen freies α Ib, eher als gegen den α Ib β 3-Komplex.

Dies bedeutet, dass die Dissoziation von α Ib β 3 wahrscheinlich für die Integrität von einigen HPA-3 Epitopen bedeutsam ist.

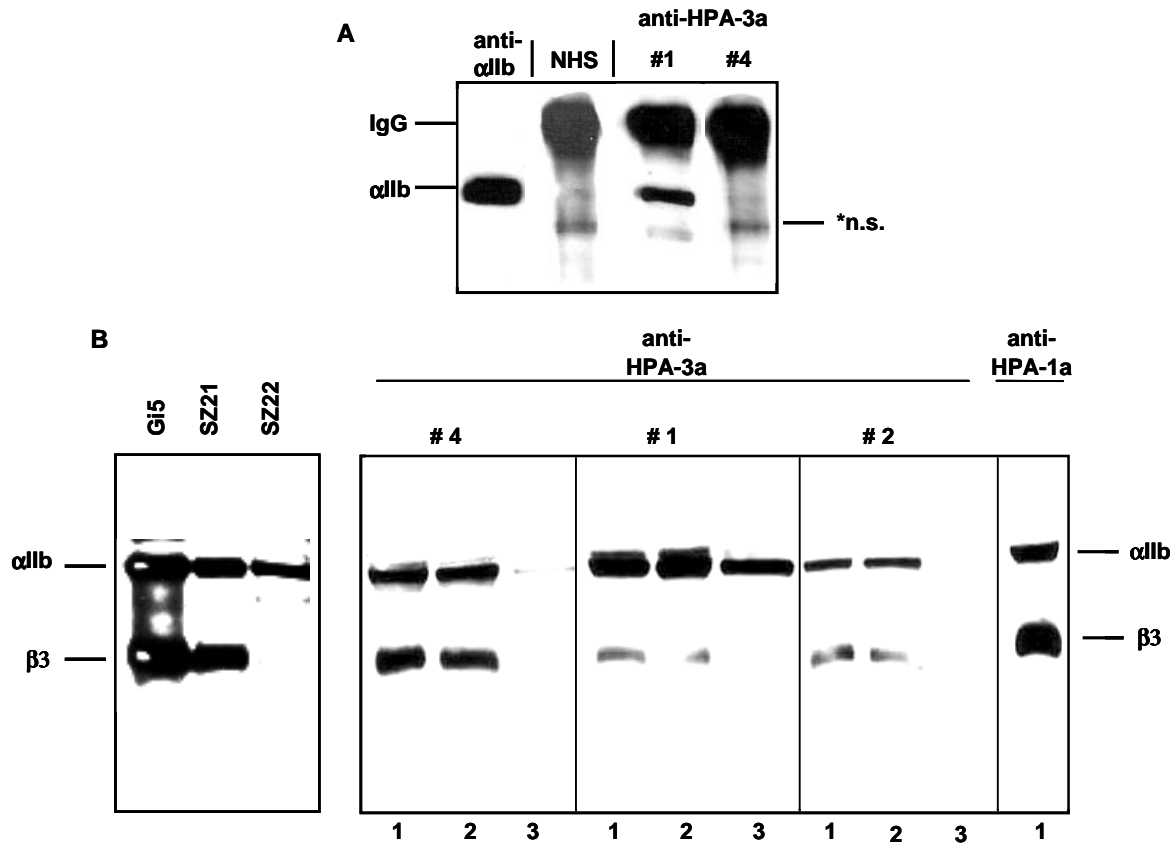


Abb. 4.33: Immunchemische Analyse von monoklonalen Antikörpern und HPA-3a Alloantikörpern demonstriert Antikörperspezifität gegen die α Ib-Untereinheit oder den α Ib β 3-Komplex.

(A) Immunoblot. HPA-3aa Plättchen wurden lysiert und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Blotten wurden die Proteine mit einem mAK gegen α Ib (Gi16), einem humanen Normalserum (NHS), einem anti-HPA-3a #1 (Typ C) und anti-HPA-3a #4 (Typ B) Serum inkubiert.

(B) Immunpräzipitation. Proteine von biotinylierten HPA-3aa Plättchen wurden immunpräzipitiert mit den monoklonalen Antikörpern Gi5 (anti- α Ib β 3), SZ21 (anti- β 3), SZ22 (anti- α Ib) und 3 verschiedenen HPA-3a Alloantikörpern (#1, 2 und 4) in unterschiedlichen Verdünnungen (Banden 1: unverdünnt, Banden 2: 1:2 Verdünnung; Banden 3: 1:5 Verdünnung). Die Immunpräzipitate wurden in einer SDS Page unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Zwei Reaktionstypen wurden beobachtet: 1. bevorzugte Präzipitation von α Ib (anti-HPA-3a #1 und 2) und 2. Präzipitation von α Ib β 3-Heterodimer (anti-HPA-3a #4). Die Ergebnisse aller Seren sind in der Tabelle 4.11 zusammengefasst. Im Kontrolllexperiment mit einem anti-HPA-1a Alloantikörper ist die bevorzugte Präzipitation der β 3-Untereinheit zu erkennen.

Typ A, B und C beziehen sich auf Abb. 4.28. *n.s. (non specific binding).

4.4.7 Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff kann die Integrität von HPA-3 Epitopen bewahren

In nachfolgenden Versuchen wurde analysiert, ob eine Plättchenlagerung in flüssigem Stickstoff die Integrität der α Ib β 3 Integrinkonformation und von Sialinsäure-abhängigen HPA-3 Epitopen schützen kann. Um einen adäquaten Vergleich der lagerungsbedingten Effekte auf thrombozytäre Glykoproteinkomplexe vornehmen zu können, wurden Plättchen von HPA-3 homozygoten Spendern direkt nach der Isolation in einem Medium aus RPMI/Tris (3:1)/10%DMSO/3.2 mM L-Glutamin/10% AB-Serum über eine Zeitdauer von 14

Tagen kryokonserviert. Nach Reaktivierung der Plättchen wurde die HPA-3 Alloantikörperreaktivität im MAIPA Assay analysiert.

Durch den Einsatz von kryokonservierten Plättchen konnten 66 % der Typ A HPA-3 Alloantikörper, welche unter Lagerungsbedingungen bei 4 °C mit Plättchen nicht reagierten, nachgewiesen werden (s. Abb. 4.34). Für Typ A Antikörper mit niedrigen Antikörperkonzentrationen (s. auch Abb. 4.28) wurde durch Kryokonservierung keine verbesserte Reaktivität erzielt. HPA-3 Alloantikörper der Reaktivität Typ B und C waren in allen Fällen sicher detektierbar (s. Abb. 4.34).

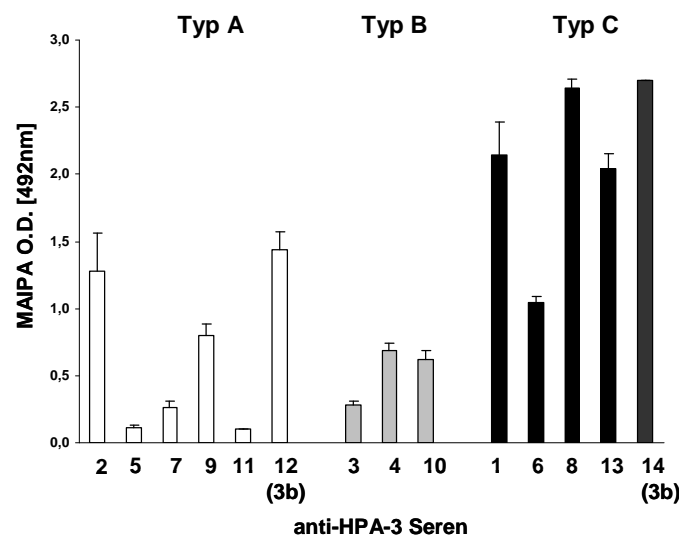


Abb. 4.34: HPA-3 Alloantikörper können mit kryokonservierten Plättchen besser nachgewiesen werden. Antiseren gegen HPA-3a und HPA-3b wurden mit kryokonservierten HPA-3a bzw. HPA-3b homozygoten Plättchen (#12 und #14) inkubiert und die gebundenen Humanantikörper im MAIPA Assay analysiert. Typ A Antikörper mit niedrigen Antikörperkonzentrationen (# 5 und 11) konnten nicht detektiert werden. Typ A, B und C beziehen sich auf Abb. 4.28.

Dies bedeutet, dass kryokonservierte Plättchen begrenzt eine verbesserte Diagnostik von HPA-3 Alloantikörpern ermöglichen können. Eine Lagerung in flüssigem Stickstoff ist für die Integrität der α IIb β 3 Konformation und von HPA-3 Epitopen vorteilhaft.

4.4.8 Der Einsatz von frischen Spenderzellen ermöglicht eine verbesserte Diagnostik in FNAIT Verdachtsfällen mit fetomaternaler HPA-3 Inkompatibilität

Weitergehend wurden retrospektiv die maternalen Antiseren in FNAIT Verdachtsfällen mit bestehender fetomaternaler HPA-3 Inkompatibilität für die Plättchenantigene HPA-3a (Kollektiv A, n = 26) und HPA-3b (Kollektiv B, n = 31), in welchen initial keine plättchenreaktiven Antikörper detektiert wurden, untersucht. Zur Beurteilung der

Thrombozytopenie wurde die postpartal minimal vorliegende Thrombozytenzahl herangezogen. Die Ausprägung der Blutungsneigung ist in der Mehrheit der Fälle unbekannt. Im dem Kollektiv A waren 9 der Neugeborenen postpartal durch eine schwere Thrombozytopenie mit minimalen Thrombozytenwerten $< 40 \cdot 10^9/L$ ($8 - 35 \cdot 10^9/L$, Median $16.8 \cdot 10^9/L$) betroffen. 19 der Neugeborenen waren postpartal von einer milden Thrombozytopenie mit Thrombozytenwerten $> 40 \cdot 10^9/L$ ($51 - 90 \cdot 10^9/L$, Median $86 \cdot 10^9/L$) begleitet.

Im Kollektiv B waren 14 der Neugeborenen postpartal durch eine schwere Thrombozytopenie mit minimalen Thrombozytenwerten $< 40 \cdot 10^9/L$ ($1 - 37 \cdot 10^9/L$, Median $21.7 \cdot 10^9/L$) betroffen. 17 der Neugeborenen waren postpartal von einer milden Thrombozytopenie mit Thrombozytenwerten $> 40 \cdot 10^9/L$ ($44 - 73 \cdot 10^9/L$, Median $61.3 \cdot 10^9/L$) begleitet.

Die maternalen Antiseren beider Kollektive wurden im MAIPA Assay mit frischen HPA-3a und HPA-3b homozygoten Plättchen ($d = 0$) unter Verwendung von dem $\alpha IIb\beta 3$ -komplexspezifischen mAK Gi5 unter Standardbedingungen analysiert. Darüber hinaus wurde durch Analyse mit dem $\beta 2$ -Mikroglobulin-spezifischen Antikörper B1G6 eine HLA-Klasse I Antikörperreaktivität ausgeschlossen.

Mit frisch isolierten Plättchen konnten jetzt im Kollektiv A in einem (anti-HPA-3a # 1) der 26 Seren HPA-3a Alloantikörper nachgewiesen werden, welche für eine schwere Thrombozytopenie des Neugeborenen ($9 \cdot 10^9/L$) verantwortlich waren (s. Tab. 4.12). In allen anderen maternalen Seren war der Antikörpernachweis weiterhin negativ.

Auch in dem Kollektiv B bestätigte sich ein FNAIT Verdachtsfall mit nachweisbaren HPA-3b Alloantikörpern (anti-HPA-3b #17). Das Neugeborene war intrauterin von schweren, intrakraniellen Blutungskomplikationen betroffen (s. Tab. 4.12).

Tab. 4.12: Serologische Verifizierung von HPA-3 Alloantikörpern in 2 FNAIT Fällen mit frischen Plättchen.

Plättchen [d =0]	O.D. [492nm] mit Gi5	
	Anti-HPA-3a (#1)	Anti-HPA-3b (#17)
HPA-3aa	0.466 (+/-0.05)	0.064 (+/-0.03)
HPA-3bb	0.122 (+/-0.02)	0.47 (+/-0.101)

Frisch isolierte Plättchen (HPA-3aa bzw. -3bb) wurden mit anti-HPA-3a bzw. -3b Seren und dem mAK Gi5 (anti- $\alpha IIb\beta 3$) inkubiert, gewaschen und lysiert. Nach der Lyse wurden die gebundenen Humanantikörper mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper in einer chromogenen Enzym-Substrat-Reaktion nachgewiesen. In den Seren der FNAIT Patienten #1 (Kollektiv A) und #17 (Kollektiv B) wurden ein anti-HPA-3a bzw. anti-HPA-3b nachgewiesen.

Die Spezifität der Reaktion konnte in beiden Fällen mit entsprechenden Antigen-negativen Plättchen gezeigt werden.

Dies bestätigt, dass kryokonservierte Plättchen einen Nachweis von anti-HPA-3 Antikörpern ermöglichen.

4.4.9 SPR-Analyse der HPA-3 Alloantikörperbindung

Das hier entwickelte SPR-Verfahren kann anti-HPA-1a Alloantikörper vermutlich mit einer höheren Sensitivität als konventionelle Testverfahren (MAIPA Assay, PAIFT) nachweisen (s. Kapitel 4.3.4). Daher wurde die Eignung dieses Testsystems zur HPA-3 Alloantikörperdetektion repräsentativ für ein lagerungsstabiles anti-HPA-3a Serum #1 (Typ C) und ein lagerungsempfindliches anti-HPA-3a Serum #2 (Typ A) mit immobilisiertem α IIb β 3 Protein (HPA-1aa, HPA-3aa) (s. Kapitel 4.3.1) getestet. Die Messung erfolgte unter den im Kapitel 4.3.2 angegebenen Bedingungen. Es konnte jedoch für keines der beiden anti-HPA-3a Seren eine Interaktion beobachtet werden (s. Abb. 4.35). Diese Befunde verdeutlichen, dass gereinigtes α IIb β 3 Protein keine aktiven HPA-3 Epitope exprimiert.

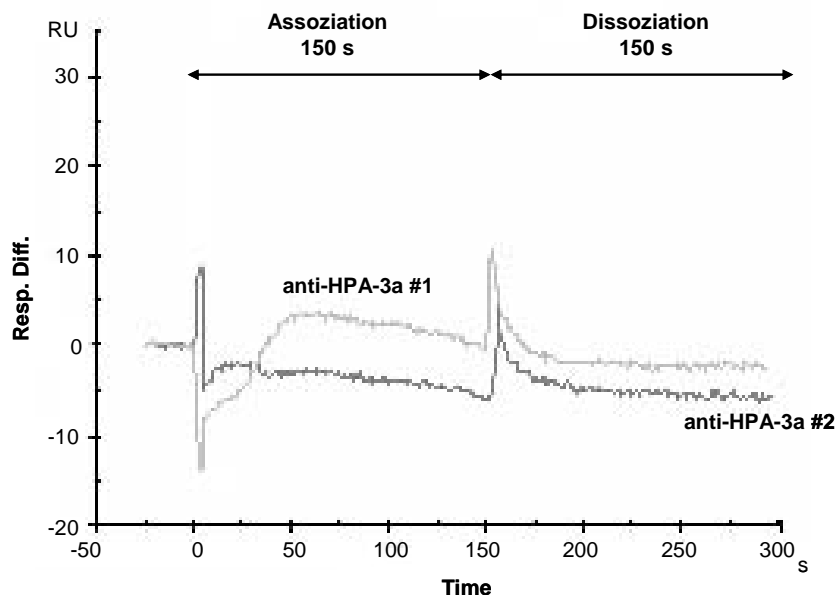


Abb. 4.35: HPA-3a Alloantikörper lassen sich mit gereinigtem α IIb β 3 (HPA-3aa) Protein in der Surface Plasmon Resonance (SPR) Technologie nicht detektieren.

Die Bindungskinetik (Assoziation und Dissoziation) wurde im Sensorgramm aufgezeichnet: relativer Responseunterschied (Resonanz Units, RU) vs. Zeit (s). Das aufgereinigte IgG (25-50 μ g) (s. Kapitel 3.3.2) wurde seriell bei einer Flussgeschwindigkeit von 10 μ l/min injiziert. Nach einer Assoziationsphase von 150 s wurde Probenpuffer über die Flusszellen geführt und die Dissoziation für 150 s verfolgt.

Es konnte weder für das anti-HPA-3a Serum #1 (Typ C), noch für das anti-HPA-3a Serum #2 (Typ A) eine Interaktion mit HPA-3a detektiert werden.

5 Diskussion

Die Alloantikörper gegen Humane Plättchenalloantigene (HPA) spielen eine bedeutende Rolle bei der fetalen und neonatalen Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT) und der posttransfusionellen Purpura (PTP).

Bei einer fetomaternalen Inkompatibilität zwischen Mutter und Kind sind insbesondere HPA-1a und HPA-3a, welche auf dem thrombozytären Fibrinogenrezeptor $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ lokalisiert sind, für das Auftreten einer prä- oder postnatalen schweren Thrombozytopenie des Neugeborenen verantwortlich (Glade-Bender et al., 2001; Mueller-Eckhardt et al., 1989). Obwohl die Diagnostik der Alloantikörper in vielen Fällen mittels etablierter Techniken möglich ist, ist ein direkter Zusammenhang zwischen der Anwesenheit der Antikörper und der klinischen Ausprägung dieser Erkrankung unklar. Das Entstehen schwerer Blutungskomplikationen ist offensichtlich nicht mit einer hohen Konzentration des Antikörpers assoziiert.

Neue Befunde deuten darauf hin, dass Alloantikörper gegen HPA-1a und HPA-3a sich hinsichtlich ihrer Erkennungsstellen (Epitope) und auch ihrer funktionellen Eigenschaften unterscheiden (Goldberger et al., 1991; Harrison et al., 2003; Kroll et al., 2005a; Take et al., 1990; Valentin et al., 1995). Neben dieser Antikörperheterogenität wurde kürzlich eine variable Anzahl von Tandem Repats (VNTR) im Promotor des diaplazentaren IgG Transporters FcRn entdeckt (Sachs U.J, Socher I., Braeunlich C.G., Kroll H., Bein G., Santoso S., 2006). Die interindividuelle Natur des maternalen Antikörpers und das Ausmaß seines Transfers in die fetale Zirkulation könnten einen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf der FNAIT haben.

In der vorliegenden Dissertation wurden daher diese Aspekte in der Pathogenese der FNAIT studiert, mit dem Ziel prädiktive Parameter zu evaluieren, welche eine Vorhersage über die Blutungsneigung erlauben. Mit der Kenntnis dieser Parameter sollte die gegenwärtige Diagnostik optimiert werden. Eine sichere und frühzeitige Antikörperdiagnostik wird die Entscheidung zu risikobehafteten pränatalen Maßnahmen erleichtern und damit den Verlauf des Krankheitsbildes verbessern.

5.1 Der Einfluss eines FcRn Polymorphismus als prädiktiver Parameter für FNAIT

Der neonatale Fc Rezeptor (FcRn) ist von großer Bedeutung für den Immunglobulintransport über die Plazentaschranke hinweg (Antohe et al., 2001; Ellinger et al., 2005; Firan et al., 2001; Simister et al., 1996). Er spielt jedoch auch eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der IgG Hämöstate (Ober et al., 2004; Ward et al., 2003). Vor kurzem wurde gezeigt, dass die Effektivität der intravenösen Immunglobulingabe zur Therapie der Immunthrombozytopenie FcRn-abhängig ist (Hansen and Balthasar, 2002). Es liegt daher nahe zu spekulieren, dass eine genetische Variabilität im FcRn Gen die Bindungsaffinität dieses Rezeptors verändern könnte.

Jüngst wurde im Labor ein VNTR-Polymorphismus in der Promotorregion des FcRn Rezeptors identifiziert (Sachs U.J, **Socher I.**, Braeunlich C.G., Kroll H., Bein G., Santoso S., 2006). Dieser Polymorphismus besteht aus einem 37 bp langen Grundmotiv, welches ein bis zu fünf mal wiederholt wird (VNTR1-5 Allel). Daten einer Genotypisierung von 427 Individuen haben gezeigt, dass diese fünf Allele in der kaukasischen Bevölkerung mit Allelfrequenzen von 0.1, 7.5, 92.0, 0.2 und 0.2 % (VNTR1, VNTR2, VNTR3, VNTR4 und VNTR5) auftreten.

In der kodierenden Region (5 Exone) des FcRn Allels wurde hingegen keine Missense-Mutation detektiert, sondern nur eine heterozygote stille Mutation (C3646T) im Exon 2 bei 2 von 20 Individuen. Diese Beobachtung deutet daraufhin, dass eine Fehlkodierung im FcRn Gen vermutlich äußerst selten vorkommt, zumindest unter Kaukasiern.

Das Ziel dieser Arbeit war es die These zu überprüfen, ob die beiden häufigsten Allele VNTR2 (7.5 %) und VNTR3 (92 %) eine unterschiedliche Expression des FcRn Rezeptors bewirken und diese mit der Schwere der Thrombozytopenie bzw. der Blutungsneigung bei FNAIT Patienten assoziiert ist.

In Reportergen-Assays fand ich, dass das VNTR3 Allel im Vergleich zum VNTR2 Allel dazu führte, dass das Reportergen zweifach effektiver transkribiert wurde (s. Abb.4.2). Die biologische Signifikanz des VNTR-Polymorphismus konnte weiterhin dadurch gezeigt werden, dass Monozyten von VNTR3/3 homozygoten Individuen 1.66-fach signifikant mehr FcRn als Monozyten von VNTR3/2 heterozygoten Individuen exprimieren (s. Tab. 4.1).

Darüber hinaus war die IgG Bindungskapazität von Monozyten VNTR2/3 heterozygoter Individuen im Vergleich zu VNTR3/3 Homozygoten bei einem sauren pH-Wert von 6.0 signifikant niedriger (s. Abb. 4.3) (Sachs U.J, **Socher I.**, Braeunlich C.G., Kroll H., Bein G., Santoso S., 2006). Meine Daten sind in Übereinstimmung mit denen einer *in vitro* Studie, die gezeigt hat, dass die Affinität des FcRn Rezeptors für IgG in neutralem Milieu (pH 7.0) gegenüber saurem Milieu (pH 6.0) um den Faktor 2 reduziert ist (Raghavan et al., 1995).

Zusammenfassend bedeutet dies, dass die Unterschiede in der Promotorregion des FcRn Rezeptors zur Folge hatten, dass in dem Fall, in welchem 3 statt 2 der Repeats vorhanden waren, mehr und höher affine Rezeptoren für Fc-Teile von Immunglobulinen exprimiert wurden.

Aus diesen *in vitro* Beobachtungen kann geschlossen werden, dass im Plazentagewebe eine solche unterschiedliche IgG Bindungskapazität des FcRn-Rezeptors den diaplazentaren IgG Transport beeinflussen könnte. Bei einer Alloimmunisierung könnten unterschiedliche Mengen an maternalen Antikörpern in die fetale Zirkulation transportiert werden, die das Risiko einer schweren fetalen Thrombozytopenie erhöhen könnten. Diese Hypothese wird von der klinischen Beobachtung unterstützt, dass Mütter mit einem hohen Serumspiegel an anti-D Antikörpern, aber einem ineffektiven IgG Transfer, gesunde Kinder zur Welt gebracht haben (Chevalier et al., 2001; Dooren and Engelfriet, 1993).

Alle Träger des VNTR2 Allels weisen zusätzlich im Exon 2 die stille Mutation C3646T auf. Interessanterweise konnte in einer Studie mit 19 verschiedenen Rinderpopulationen gezeigt werden, dass stille Mutationen im FcRn Gen mit einem niedrigen fetalen IgG-Spiegel assoziiert sind (Laegreid et al., 2002). Diese Beobachtung gibt Anlass zu der Spekulation, dass diese stillen Mutationen auch genetisch mit einem Promotorpolymorphismus im FcRn Gen verbunden sind. Diese Möglichkeit wurde von den Autoren jedoch nicht in Betracht gezogen.

In der Literatur sind zahlreiche Beispiele an VNTR Promotorpolymorphismen zu finden, welche transkriptionsabhängig zur Ausprägung funktionell unterschiedlicher Phänotypen führen (Chevalier et al., 2001; Sabol et al., 1998; Tovar et al., 2003). Bisher sind die biologischen Mechanismen dieser Polymorphismen ungeklärt, jedoch ist offensichtlich eine definierte Länge der regulatorischen Region für eine optimale Gentranskription von Bedeutung.

Um die Rolle dieses VNTR Polymorphismus bei der FNAIT zu untersuchen, wurden 104 FNAIT Patienten von mir untersucht. In der hier präsentierten Assoziationsstudie wurde kein

signifikanter Zusammenhang zwischen dem VNTR Genotyp des FcRn Rezeptors und der Schwere der Thrombozytopenie gefunden (s. Abb.4.5). Eine Tendenz zu geringeren minimalen fetalen bzw. neonatalen Plättchenzahlen wurde jedoch bei VNTR3 homozygoten Individuen gefunden.

Ungeachtet dieser Tatsache nehme ich aufgrund der geringen Frequenz des VNTR2 Allels an, dass die differentielle Expression von FcRn keinen entscheidenden Einfluss auf die klinische Heterogenität dieser Erkrankung hat.

5.2 Der Einfluss von Epitopen als prädiktiver Parameter in der FNAIT

Der thrombozytäre Fibrinogenrezeptor α IIb β 3 gehört zu der großen Familie der Integrine, die für die Adhäsion von Zellen an Matrixproteine und untereinander essentiell sind (Hynes, 2002; Shattil and Newman, 2004). In unserer Bevölkerung finden wir zwei unterschiedliche Isoformen der β 3-Untereinheit, die sich nur um einen einzigen Aminosäureaustausch an der Position 33 (Leucin oder Prolin) unterscheiden. HPA-1a Individuen tragen die Aminosäure Leucin33, HPA-1b Individuen exprimieren hingegen die Aminosäure Prolin33 (Newman et al., 1989). In über 75 % aller serologisch bestätigten FNAIT Fälle werden Alloantikörper gegen HPA-1a als Ursache der Blutungskomplikation nachgewiesen (Kroll et al., 2005b; Mueller-Eckhardt et al., 1989).

Kürzlich wurde von unserem Kooperationspartner eine weitere β 3-Isoform mittels der Lightcyclertechnik identifiziert, die an der Position 33 weder die Aminosäure Leucin (HPA-1a) noch Prolin (HPA-1b), sondern die Aminosäure Valin trägt (Santoso S., Kroll H., Andrei-Selmer C.L., **Socher I.**, Rankin A., Kretzschmar E., Watkins N.A., 2006). Diese Aminosäuresubstitution wird durch die Nukleotidsubstitution C175G SNP im ITGB3 Gen hervorgerufen, welche sich in unmittelbarer Nachbarschaft zum HPA-1 Dimorphismus (T176C) befindet. Dieses neue HPA-1 Allel (ITGB3*001.1) ist durch ein zweites Mutationsereignis des Ursprungsallels ITGB3*001 (HPA-1a) des β 3-Integrin entstanden (s. Abb. 5.1).

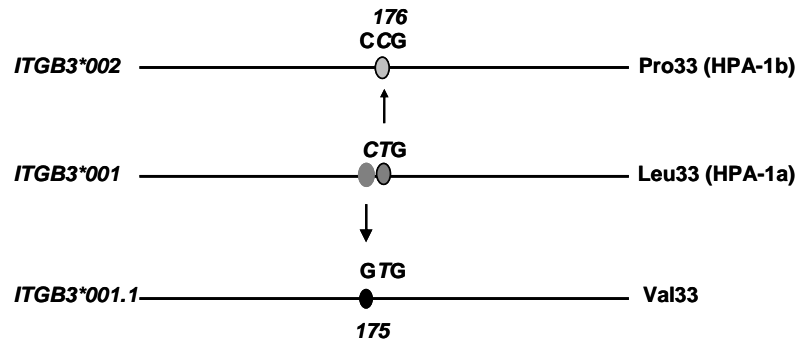


Abb. 5.1: Evolutionäre Verwandtschaft der HPA-1 Allele. Eine C>G Mutation des β 3-Integrins an der Position 175 des Ursprungsallels ITGB3*001 (β 3-Leu33; HPA-1a) führt zur Bildung der neuen Allelvariante ITGB3*001.1 (β 3-Val33). Die T>C Mutation an der Position 176 kodiert das ITGB3*002 Allel (β 3-Pro33; HPA-1b). Abb. modifiziert aus (Santos et al., 2006).

Durch die Anwendung von konventionellen DNA-basierten Typisierungsmethoden (PCR-SSP; PCR-RFLP) könnte die β 3-Val33 Mutation leicht als HPA-1a Variante fehl typisiert werden. Durch die direkte Nachbarschaft zu dem C176T Dimorphismus könnten allelspezifische HPA-1a Primer falsch anlagern. In ähnlicher Weise könnte das Restriktionsenzym bei der RFLP-Technik diese Variante nicht von HPA-1a unterscheiden. Eine bisher unentdeckte hohe Frequenz dieses neuen HPA-1a Allels könnte eine Ursache für die hohe Anzahl von FNAIT Verdachtsfällen ohne korrespondierende maternale Antikörper sein. In einem großen Kollektiv von 2950 Blutspendern wurde im Labor aber mittels der TaqMan Methode nur ein einziges zusätzliches heterozygotes β 3-Val33 Individuum identifizieren (Santos S., Kroll H., Andrei-Selmer C.L., Socher I., Rankin A., Kretzschmar E., Watkins N.A., 2006).

In der vorliegenden Dissertation wurde untersucht, ob die Punktmutation Leu33Val die tertiäre Struktur des α Ib β 3 Integrins verändert und ein Ziel von bestimmten Alloantikörpern gegen HPA-1a sein kann. Es wurde außerdem die These überprüft, ob die Epitopspezifität von HPA-1a Alloantikörpern ein prädiktiver Faktor für eine verstärkte Blutungsneigung des Neugeborenen sein kann.

Meine serologischen Studien mit rekombinanten humanen (rhu) monoklonalen und polyklonalen anti-HPA-1a Antikörpern haben gezeigt, dass die β 3-Val33 Mutation eine unterschiedliche HPA-1a Alloantikörperreaktivität bedingt. Während HPA-1a Alloantikörper von PTP Patienten mit rekombinanten β 3-Val33 auf CHO-Zellen reagierten, erkannte die Mehrheit der anti-HPA-1a von FNAIT Patienten diese β 3-Isoform nicht (Santos S., Kroll H.,

Andrei-Selmer C.L., Socher I., Rankin A., Kretzschmar E., Watkins N.A., 2006). Die Länge des Seitenkettenrestes der Aminosäure Leucin scheint kritisch für die Expression des HPA-1a Epitopes zu sein. Der Aminosäureaustausch von Leu nach Val führt zu deren Reduktion um eine einzelne CH₂-Gruppe, welche die Interaktion von HPA-1a Alloantikörpern mit dem α IIb β 3 Integrin beeinträchtigt.

Eine Heterogenität von thrombozytären HPA-1a Alloantikörpern konnte unlängst durch Untersuchung strukturell veränderter rekombinanter Thrombozytenmembranproteine nachgewiesen werden (Valentin et al., 1995). Das Epitop einiger polyklonaler anti-HPA-1a Antikörper wird durch eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten 13 und 435 (Xiao et al., 2004) im β 3-Integrin kontrolliert. Eine Analyse von verschiedenen anti-HPA-1a Seren mit β 3-Ala-435 transfizierten Zellen hat gezeigt, dass einige HPA-1a Alloantikörper dennoch mit ihrem Epitop reagieren (Typ I Antikörper), während für andere (Typ II Antikörper) ein Reaktionsverlust beobachtet wurde.

Diese Beobachtungen geben Anlass zu der Hypothese, dass Typ I HPA-1a Antikörper ein Epitop erkennen, welches allein durch die PSI-Domäne im β 3-Integrin definiert wird, während Typ II Antikörper gegen eine komplexe antigene Determinante bestehend aus der PSI-, Hybrid- und möglicherweise den beiden benachbarten EGF-Domänen gerichtet sind.

Es gibt verschiedene Gründe für die hier beobachteten Unterschiede im Bindungsprofil der HPA-1a Alloantikörper.

Die Heterogenität der rhu monoklonalen HPA-1a Alloantikörper (s. Abb. 4.8) ist nicht in einer unterschiedlichen Bindungsaffinität zu ihrem korrespondierenden Antigen begründet, da für CamTran007 und 19-7 in dieser Arbeit ähnliche Dissoziationskonstanten ($K_D = 6.00 \cdot 10^{-8}$ M vs. $3.97 \cdot 10^{-8}$ M) ermittelt wurden (s. Abb.4.9).

Dieses Phänomen ist vielmehr auf die Unterschiede der Art und Häufigkeit der Antigenexposition der zugrunde liegenden Erkrankung und die Sequenz ihrer variablen Antikörperdomäne zurückzuführen.

Der rhu Klon CamTran007, welcher den B-Zellen einer HPA-1a negativen FNAIT Mutter entstammt, erkannte die β 3-Val33 Mutation nicht. Hingegen wurde die Reaktivität der Klone 19-7 und 23-15 aus den B-Zellen von PTP Patienten durch die β 3-Val33 Mutation nicht beeinflusst (Garner et al., 2000; Griffin and Ouwehand, 1995; Proulx et al., 1997). Die wiederholte Exposition der Frau gegenüber dem Alloantigen bei der PTP führt zu somatischer Hypermutation in den variablen Domänen der schwere Kette (VH) im Gegensatz zu der

initialen Erstantwort in der FNAIT, welche im Fall einer Erstschwangerschaft vorliegt. Daher ist das Ausmaß der somatischen Mutationen in den variablen Domänen der Klone 19-7 und 23-15, welche aus den B-Zellen von PTP-Patienten isoliert wurden, weitaus höher als in denen von CamTran007 aus den B-Zellen einer FNAIT Patientin.

Im Gegensatz zur $\beta 3$ -Val33 Punktmutation wurde vor kurzem eine natürliche Arg93Gln Mutation im $\beta 3$ -Integrin beschrieben, welche die Bindungsstelle von allen rhu mAK unabhängig von ihrem Ursprung zerstört (Watkins et al., 2002a). Im $\beta 3$ -Integrin ist die Aminosäure Arginin an der Position 93 hoch konserviert und von zentraler Bedeutung für die Rigidität der Hybrid-PSI Interphase. Ein Austausch des positiv geladenen Arginins gegen Glutamin bedingt höchstwahrscheinlich drastische Konformationsänderungen in der PSI und Hybriddomäne, welche das Epitop auch für die mAK 23-15 und 19-7 unzugänglich werden lässt.

Erste Analysen mit zufällig ausgewählten Antiseren von je 4 FNAIT und PTP Patienten zeigen, dass die Antikörperheterogenität nicht allein auf rhu mAK beschränkt ist. Polyklonale PTP HPA-1a Alloantikörper erkennen die $\beta 3$ -Val33 Variante, hingegen FNAIT Alloantikörper nicht (s. Abb. 4.10). Diese Beobachtungen bestätigen die oben aufgestellte Hypothese, dass das unterschiedliche Bindungsverhalten an das $\alpha IIb\beta 3$ -Integrin durch das Ausmaß somatischer Hypermutationen in den variablen Domänen der schweren Kette bestimmt wird. Bei der PTP wird im Vergleich zur FNAIT eine größere Diversität an polyklonalen Antikörpern in wesentlich höheren Konzentrationen generiert.

Nachfolgend bin ich der Fragestellung nachgegangen, ob die beobachtete HPA-1a Alloantikörperheterogenität mit $\beta 3$ -Val33 einen diagnostischen Parameter für den zu erwartenden Schweregrad der Thrombozytopenie darstellt. In einer erweiterten Untersuchung mit einem Kollektiv von 40 FNAIT Patienten reagierten 29 der maternalen Antiseren nicht mit $\beta 3$ -Val33, während in 11 Fällen das HPA-1a Epitop nicht oder nur geringfügig beeinflusst wurde (s. Tab.4.4). Dieses Reaktionsmuster ist statistisch nicht signifikant mit der Ausprägung der Blutungsneigung (Hirnblutung) bei den Neugeborenen assoziiert ($p = 0.451$). Patienten mit $\beta 3$ -Val33 sensitiven HPA-1a Alloantikörpern zeigen aber eine Tendenz zu niedrigeren postnatalen Plättchenzahlen ($p = 0.057$).

Die Fehltypisierung des $\beta 3$ -Val33 Allels wird zwar selten auftreten, kann aber dennoch von klinischer Relevanz in der Pränataldiagnostik sein. Es ist ein Fall denkbar, in dem ein Neugeborenes aufgrund eines vom Vater geerbten HPA-1a Allels, welcher die $\beta 3$ -Leu33Val33 Variante trägt, von einer verstärkten Blutung betroffen wird. In einer Folgeschwangerschaft erbt der Fetus die $\beta 3$ -Val33 Isoform und die HPA-1a Alloantikörper reagieren vielleicht nicht. Dies könnte eine milde Thrombozytopenie des Neugeborenen erklären, obwohl in der vorhergehenden Schwangerschaft die FNAIT in ihrem Verlauf sehr schwer gewesen ist (Birchall et al., 2003).

Bislang wurden aber noch keine natürlichen Alloantikörper gegen die $\beta 3$ -Val33 Isoform gefunden.

Das Beispiel der Leu33Val Mutation zeigt eindrucksvoll, dass HPA-1a Alloantikörper gegen unterschiedliche Epitope gerichtet sind.

Die Struktur eines Epitopes könnte maßgeblich die Bindungskinetik der Antigen-Antikörper-Reaktion beeinflussen. Eine solche Interaktion kann sowohl durch die Menge (Konzentration), als auch durch die Affinität von Antikörpern bestimmt werden. Diese beiden Parameter könnten theoretisch die Pathogenität der Antikörper determinieren.

Das Auftreten einer schweren Thrombozytopenie des Neugeborenen bei nachweislich geringen maternalen Antikörperkonzentrationen lässt vermuten, dass in solchen Fällen eine hohe Antikörperaffinität für den klinischen Verlauf der Erkrankung verantwortlich sein könnte. Daher wird im Folgenden die Bedeutung der Antikörperaffinität als prädiktiver Parameter in der FNAIT diskutiert.

5.3 Der Einfluss der Antikörperaffinität auf den Schweregrad der FNAIT

Annäherungsweise 2 % der Kaukasier sind homozygot für das HPA-1b Allel (Kjeldsen-Kragh et al., 2007; Williamson et al., 1998). Die HPA-1a Alloimmunisierung ist stark mit dem HLA Klasse-II DRB3*0101 (DR52a) Allotyp (Decary et al., 1991; Kjeldsen-Kragh et al., 2007; Williamson et al., 1998) assoziiert. Jedoch werden innerhalb dieser Riskogruppe nur in 10 - 12 % der Fälle maternale HPA-1a Alloantikörper detektiert (Kjeldsen-Kragh et al., 2007; Williamson et al., 1998). Die Beobachtung einer klinisch relevanten FNAIT bei Neugeborenen ist ungleich höher (ca. 15 %) (Bussel et al., 2005).

Die Bedeutung der Patientendiagnostik ist bei der FNAIT insbesondere dadurch gegeben, dass bei diesem Krankheitsbild im Gegensatz zur hämolytischen Neugeborenenenerkrankung bereits in über 50 % aller Fälle die Erstgeborenen betroffen sind. Diese könnte darauf basieren, dass unsere heutigen Testmethoden nicht sensitiv genug sind.

Daher konzentrierten sich meine Bemühungen auf die Entwicklung eines Testverfahrens, welches die Nachteile der konventionellen Standardmethoden zur Antikörperdetektion umgeht, um eine weitere Charakterisierung der klinischen Relevanz der HPA-1 Antikörperbindung zu ermöglichen.

In dieser Arbeit wurde mittels der Oberflächenplasmonresonanz-Technologie zum ersten Mal gezeigt, dass HPA-1a Alloantikörper mit unterschiedlicher Affinität an ihr Epitop binden und dieser Parameter auf den Schweregrad der FNAIT hinweist. Mit dieser Technik konnte die Existenz von HPA-1a Alloantikörper mit einer sehr niedrigen Affinität demonstriert werden, welche in konventionellen Testverfahren (MAIPA, PAIFT) vermutlich einer Abdissoziation vom Antigen unterliegen. Solche Antikörper können für eine schwere Thrombozytopenie in der ersten Schwangerschaft verantwortlich sein und können im Verlauf der FNAIT eine Reifung der Antikörperaffinität durchlaufen.

Gegenwärtig wird der Nachweis von anti-thrombozytären Alloantikörpern mit Hilfe von einem glykoproteinspezifischen Test durchgeführt. In diesem Verfahren wird die Sensitivität des Testsystems durch die Anwendung selektierter mAK limitiert (Minchinton et al., 1996), da die Bindung des mAKs theoretisch die Bindungsstelle des Humanantikörpers kompetitiv inhibieren könnte. Erhebliche Schwierigkeiten bereitet bei der Selektion der mAK die Heterogenität der Epitopstruktur (Valentin et al., 1995). Seltene Alloantigene könnten vielleicht mangels geeigneter mAK übersehen werden (Kroll et al., 2005b). Darüber hinaus ist denkbar, dass die häufigen Waschprozeduren in glykoproteinspezifischen Immunoassays (z.B. MAIPA Assay) in einer Abdissoziation schwacher Antikörperbindung resultieren können.

Eigene Analysen der im Labor dokumentierten FNAIT Fälle zeigen, dass sich in 22.9 % aller Verdachtsfälle durch fetomaternalen HPA-1 Inkompatibilität keine maternalen Alloantikörper im MAIPA Assay detektieren lassen (s. Tab.4.7). Interessanterweise lassen sich einige HPA-1a Alloantikörper (5.6 %) nur im Plättchen-Adhäsions-Immunfluoreszenztest (PAIFT) nachweisen.

Um diese Probleme aufzuheben, wurde die Surface Plasmon Resonance (SPR)-Technologie angewandt. In dieser Arbeit wurde die SPR-Technik zur Messung der Bindungseigenschaften von rhu mAK gegen gereinigtes α Ib β 3 Integrin eingesetzt (Santoso S., Kroll H., Andrei-Selmer C.L., **Socher I.**, Rankin A., Kretzschmar E., Watkins N.A., 2006) (**Socher I.**, Kroll H., Santoso S., 2006).

Durch eine sorgfältige Analyse mit mAK gegen die α Ib- und die β 3-Untereinheit konnte ich die immunologische Aktivität der HPA-1a und HPA-1b Epitope von auf dem Chip immobilisiertem α Ib β 3-Integrin sichern. Die Charakterisierung mit dem mAK AP3 gegen die β 3-Untereinheit zeigte, dass eine Proteinmenge von 20 μ g minimal zur Immobilisierung eingesetzt werden muss, um eine Antikörperbindung in ausreichender Signalstärke (Resonanzsignal in RU) im Sensorgramm detektieren zu können (s. Abb.4.16B). Eine Analyse des mAK SZ21 gegen ein strukturell verwandtes HPA-1a Epitop zeigte wie erwartet, dass SZ21 eine stärkere Bindung mit HPA-1a als mit HPA-1b eingeht ($K_D = 4.08 \cdot 10^{-7}$ M vs. $1.29 \cdot 10^{-6}$ M).

Die errechnete K_D (Langmuir 1:1 Modell) weicht von dem Literaturwert mit HPA-1a homozygoten Plättchen ab ($K_D = 0.826 \cdot 10^{-9}$), da bei einer Antigenimmobilisierung keine homogene 1:1 Bindungskinetik vorliegt. Der K_D -Wert aus einer umgekehrten Versuchsanordnung mit dem mAK SZ21 als Ligand und α Ib β 3 Protein als Analyt stimmte jedoch mit der publizierten K_D überein ($K_D = 0.948 \cdot 10^{-9}$). Die Signalstärke für die beiden HPA-1 Varianten waren ähnlich, so dass offensichtlich auf dem HPA-1a und dem HPA-1b Antigen dieselbe Quantität an aktiven Epitopen zur Verfügung steht (s. Abb.4.16A).

Die Spezifität der SPR-Methode wurde mit dem mAK CamTran007 gegen HPA-1a (Garner et al., 2000; Griffin and Ouwehand, 1995) evaluiert. Dieser mAK zeigte eine starke und spezifische Interaktion mit HPA-1a, die sich in seinem hohen Resonanzsignal und der minimalen Dissoziationsrate widerspiegelt; aber es wurde keine Reaktion mit HPA-1b beobachtet (s. Abb.4.16D).

Mittlerweile wird die SPR Technologie in der Immunhämatologie zur schnellen Quantifizierung von IgG anti-A/-B Antikörpern aus den Plasmen von Patienten, denen zuvor ABO-inkompatible Organe transplantiert wurden, eingesetzt (Kimura et al., 2005).

Im Gegensatz dazu musste hier zur Analyse einer polyklonalen HPA-1 Alloantikörperbindung gereinigtes IgG der Patienten eingesetzt werden, da das α Ib β 3 Integrin als Fibrinogenrezeptor mit einer Vielzahl von Serumfaktoren interagieren kann.

Mit Hilfe dieser neuen SPR Technologie habe ich Hinweise darauf gefunden, dass HPA-1 Alloantikörper hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität heterogen sind. Während bestimmte HPA-1a Alloantikörper schwach mit ihrer antigenen Determinante reagieren, binden andere sehr stark.

Von einigen Autoren wurde untersucht, ob die maternale Antikörperkonzentration eine Ursache für die Schwere der fetalen Thrombozytopenie sein kann. Diese retrospektiven Studien resultierten in widersprüchlichen Beobachtungen (Bessos et al., 2005; Jaegtvik et al., 2000; Proulx et al., 1994; Williamson et al., 1998). Jüngst veröffentlichte Daten einer norwegischen Studie belegen jedoch eine Abhängigkeit der postnatalen Thrombozytopenie ($< 50 \cdot 10^9/L$) von hohen maternalen Antikörperkonzentrationen (Killie et al., 2007). Da auch bei geringen maternalen Antikörperkonzentrationen eine schwere Thrombozytopenie beobachtet wird, ist die Pathogenität in solchen Fällen möglicherweise durch eine hohe Affinität determiniert.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Antikörperaffinität möglicherweise eine Aussage über die zu erwartende Blutungsneigung beim Neugeborenen zulässt. Bis auf eine Ausnahme waren alle untersuchten FNAIT Fälle mit einer schweren Thrombozytopenie des Neugeborenen ($< 50 \cdot 10^9/L$) assoziiert, welche sich aber in einer individuell verschieden ausgeprägten Blutungen präsentierte (s. Tab.4.6).

Interessanterweise wurde in diesem Kollektiv eine Tendenz ($p = 0.304$) zu höheren Antikörperaffinitäten beim Auftreten schwerer Blutungen (gastrointestinale Blutung, Hirnblutung) im Vergleich zu Fällen mit einer milden (Hautblutungen) oder ausbleibenden Blutung festgestellt (s. Abb.4.19B). Darüber hinaus war die relative Antikörperkonzentration (Stärke des Resonanzsignals) signifikant ($p = 0.037$) mit dem Blutungsrisiko korreliert. Neugeborene mit einer isolierten Thrombozytopenie weisen die geringsten Konzentrationen an Antikörpern auf (s. Abb.4.19A). Im Fall einer Hautblutung wurden zwar etwas höhere Konzentrationen an HPA-1a Alloantikörpern als bei Hirnblutungen gemessen, jedoch ist deren Antikörperaffinität höher. Diese Beobachtungen verdeutlichen, dass die Analyse der Antikörperaffinität ein sehr wichtiger Parameter für die Pränataldiagnostik sein könnte.

Entgegen dieser Befunde habe ich auch die Existenz plättchenreaktiver HPA-1a Alloantikörper mit einer sehr geringen Bindungsaffinität bei zwei HPA-1a negativen Müttern (Fall 1 und 2, siehe Anhang) nachgewiesen, welche wahrscheinlich für eine schwere Blutungskomplikation der Erstgeborenen verantwortlich sind (s. Abb. 4.20C). Andere Ursachen einer Thrombozytopenie als eine fetomaternale HPA-1 Inkompatibilität konnten aufgrund der Patientenanamnese ausgeschlossen werden (s. 4.3.4). Dennoch wurden während

der ersten Schwangerschaft die korrespondierenden Antikörper in den konventionellen Testverfahren (MAIPA, PAIFT) übersehen (s. Abb. 4.20A,B).

Die Bindungsanalyse im SPR zeigt, dass diese HPA-1a Alloantikörper mit einer weitaus geringeren Affinität binden im Vergleich zu denen, welche serologisch durch eine positive Reaktion definiert sind (s. Tab.4.5).

Bemerkenswerterweise wurde für beide FNAIT Fälle ein Wechsel der HPA-1a Alloantikörperaffinität von niedrig zu hoch während derer Folgeschwangerschaften detektiert (s. Abb.4.20C).

Während einer Sekundärimmunantwort erhöht sich die mittlere Affinität von Antikörpern im Vergleich zur Primärantwort, ein Prozess, welcher als Affinitätsreifung bekannt ist (Siskind and Eisen, 1965). Voraussetzung für die Affinitätsreifung sind die Wechselwirkung und Aktivierung antigenspezifischer B-Lymphozyten mit Helfer-T-Zellen und follikulären dendritischen Zellen in den Keimzentren der sekundären lymphatischen Organe (Kelsoe, 1996).

Die sich stark vermehrenden, aktivierten B-Lymphozyten weisen in den variablen Regionen der schweren und leichten Ketten der Antikörper eine stark erhöhte Mutationsrate auf (somatische Hypermutation), deren Abkömmlinge von dem auf den follikulären dendritischen Zellen dargebotenen Antigen auf die höchste Affinität hin selektiert werden (Allen et al., 1988; Griffiths et al., 1984; McKean et al., 1984; Milstein, 1987; Sablitzky et al., 1985; Weigert et al., 1970) (Berek, 1993). Wechselwirkungen mit Helfer-T-Zellen über verschiedene Rezeptoren bzw. Co-Rezeptoren führen dann zur Differenzierung in Gedächtnis- oder Plasmazellen, welche die hochaffinen Antikörper produzieren (Berek and Ziegner, 1993).

Die von den Helfer-T-Zellen gebildeten Zytokine legen den Isotyp der gebildeten Immunglobuline fest (Li et al., 2004; Liu et al., 1996b). Dieser sogenannte Klassenwechsel der Immunglobuline verläuft unabhängig von der Affinitätsreifung.

Es ist zu spekulieren, dass die hier beobachtete Zunahme der Antikörperaffinität eine Reifung der Immunantwort im Verlauf der FNAIT reflektiert.

Des Weiteren wurde in der zweiten Schwangerschaft im Vergleich zur Ersten in der SPR-Technologie ein wesentliches höheres Resonanzsignal gemessen, vermutlich als Folge einer Produktion von Antikörpern mit hoher Affinität durch B-Gedächtniszellen.

Bertrand et al. (Bertrand et al., 2006) zeigten in ihrer Studie, dass in der Folgeschwangerschaft die Konzentration der maternalen anti-HPA-1a Antikörper sinkt (14/19 HPA-1a negativen Müttern). Diese Abnahme der Antikörperkonzentration könnte sich aus einer Zunahme der Antikörperaffinität erklären, die wir hier beobachten konnten.

Die Aussagekraft der Antikörperaffinität zur Vorhersage der Blutungsneigung sollte zukünftig in großen prospektiven Studien weiter untersucht werden. Darüber hinaus sollte die Antikörperaffinität auf einen Zusammenhang zur Ausprägung der Thrombozytopenie in einem Kollektiv von unselektierten Schwangeren überprüft werden. Die Verfügbarkeit der SPR-Technologie wird dazu beitragen, den gegenwärtigen Wissensstand über den Pathomechanismus der FNAIT wesentlich zu erweitern.

5.4 Die Aktivierung der klassischen Komplementkaskade bei der Elimination von Thrombozyten in der FNAIT

Die in dieser Arbeit vorgestellten SPR-Daten über die HPA-1a Alloantikörperbindung deuten darauf hin, dass die Antikörperaffinität Auswirkungen auf den klinischen Verlauf der FNAIT hat. Weitergehend hat sich die Frage gestellt, ob in den vorgefundenen FNAIT Fällen mit niedrig-affinen HPA-1a Alloantikörpern andere Faktoren blutungsfördernd wirken können.

In der Vergangenheit wurden hochtitrige Alloantikörper mit einer niedrigen Affinität für bestimmte Erythrozytenantigene beschrieben (Roli, 1989). Ferner konnte *in vivo* gezeigt werden, dass antierythrozytäre Autoantikörper ungeachtet ihrer geringen Affinität eine Autoimmunhämolytische Anämie (AIHA) in der Maus induzieren können.

Über die Relevanz von plättchenreaktiven Antikörpern mit niedriger Antikörperaffinität wurde bisher nur sehr wenig publiziert. Bis heute ist unklar, warum sich bei über 50 % der Patienten mit einer klinisch diagnostizierten Autoimmunthrombozytopenie (AITP) die relevanten Autoantikörper nicht nachweisen lassen (Kiefel et al., 1996). Einige Autoren postulieren die Existenz von Autoantikörpern mit schwachen Bindungseigenschaften, deren Bindung eine Stabilisation durch bestimmte lösliche Faktoren erfordert, z.B. Rheumafaktoren (RF) (Yang et al., 1999).

Die Hypothese, dass bestimmte Antikörper oder andere Faktoren während einer Immunantwort zur Verstärkung der Wechselwirkung zwischen Antikörper und korrespondierendem Antigen bzw. Idiotyp-anti-Idiotyp Antikörpern gebildet werden, ist weithin akzeptiert (Nemazee and Sato, 1982). Solche Interaktionen erhöhen die „scheinbare“ Antikörperaffinität und könnten vielleicht die beobachtete Affinitätsreifung der maternalen HPA-1a Alloantikörper erklären.

Aus vereinzelt Literaturberichten ist bekannt, dass anti-thrombozytäre Alloantikörper *in vitro* Komplement fixieren können (Cines and Schreiber, 1979; Kiefel et al., 1989a; Kurata et

al., 1985; Schreiber et al., 1979; Tsubakio et al., 1986). Hier wurde die These überprüft, ob solche lösliche Komplementfaktoren den Antigen-Antikörperkomplex stabilisieren können. Neueste Daten zeigten, dass Plättchen mit dem Komplementsystem direkt über Komplementrezeptoren auf der Plasmamembran (z.B. C1q Rezeptor, Komplementrezeptoren 2 und 4), oder rezeptorunabhängig durch Aktivierung des C5-9 Komplexes agieren können (Peerschke et al., 2006).

Daher kann eine pathologische Plättchenaktivierung durch zirkulierende Immunkomplexe (z.B. bei AITP) nicht allein über die antikörperabhängige, sondern auch über die C1qR-abhängige Aktivierung der klassischen Komplementkaskade *in vivo* eine Thrombose oder Thrombozytopenie auslösen.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Daten geben jedoch keinen Hinweis auf eine Beteiligung des Komplementsystems am Pathomechanismus der FNAIT (s. Abb.4.21, 4.22).

Die Fähigkeit plättchenreaktiver HPA-1a Alloantikörper im Zusammenspiel mit dem Komplementsystem eine Alloimmunthrombozytopenie auszulösen, beschränkt sich vermutlich auf das pathophysiologische Korrelat der posttransfusionellen Purpura (Cines and Schreiber, 1979; Kiefel et al., 1989a; Schreiber et al., 1979).

Darüber hinaus ist denkbar, dass IgM Antikörper, welche im Vergleich zu IgG aufgrund ihrer pentameren Struktur wesentlich effizienter C1q binden können, bei der AITP und PTP eine Komplementaktivierung fördern. Da IgM Antikörper nicht die Plazenta passieren können, ist deren Einfluss bei der FNAIT nicht von Bedeutung (Mueller-Eckhardt, 1990).

Im Fall der beiden untersuchten FNAIT Mütter erfolgt die Plättchenelimination vermutlich komplementunabhängig über den Weg der Fc-abhängigen Phagozytose durch Zellen des Endoplasmatischen Retikulums (ER).

5.5 Die Analyse von plättchenreaktiven HPA-1a Alloantikörpern *in vivo*

Gegenwärtige *in vitro* Diagnostikverfahren können die Spezifität eines Antikörpers nachweisen, erlauben jedoch keine direkte Aussage über deren pathogene Relevanz in der FNAIT.

Vor kurzem wurde ein *in vivo* Modell der FNAIT mit $\beta 3^{-/-}$ defizienten Mäusen entwickelt, deren $\beta 3^{+/-}$ Föten durch die Bildung maternaler anti- $\beta 3$ Antikörper eine schwere fetale Thrombozytopenie, Hirnblutungen und sogar einen Abort erleideten (Ni et al., 2005). Die

Ausprägung der Blutungsneigung war direkt von der maternalen Antikörperkonzentration abhängig. Dieses *in vivo* Modell der FNAIT unterscheidet sich von der Immunisierungsart der humanen FNAIT. Bei dieser werden Alloantikörper gegen polymorphe Strukturen des β 3-Integrins gebildet, welche sich in ihrer Epitopspezifität und möglicherweise in ihren funktionellen Eigenschaften voneinander unterscheiden können. Die murinen anti- β 3 Antikörper sind daher nicht mit den humanen Alloantikörpern vergleichbar. Um den Wissensstand über den Pathomechanismus der FNAIT zu erweitern, ist eine funktionelle Analyse der humanen Alloantikörperbindung erforderlich.

Jüngst konnte die Arbeitsgruppe von Newman mit Hilfe eines *NOD/SCID* (*nonobese diabetic/immune-deficient*) Mausmodells zeigen, dass monoklonale anti-GPVI Antikörper *in vivo* GPVI von der Plasmamembran humaner Plättchen eliminieren (Boylan et al., 2006). Aufgrund ihrer Immundefizienz können *NOD/SCID* Mäuse keine „heterophilen Antikörper“ generieren, so dass humane Blutplättchen in diesen Mäusen über einen Zeitraum von 24 h hinaus zirkulieren können.

Eine Voruntersuchung mit gereinigtem IgG eines PTP Serums in diesem Modell führte zu einer drastischen Elimination von HPA-1a positiven Plättchen innerhalb kürzester Zeit (Abb.4.23A). Diese Beobachtungen reflektieren vermutlich die schwere Blutungskomplikation bei der PTP Patientin während ihrer thrombozytopenischen Phase.

Mit Hilfe dieses Modells wurde von Dr. Brian Boylan darüber hinaus gezeigt, dass humane HPA-1a Alloantikörper von FNAIT Patienten eine spezifische Elimination von HPA-1a positiven Plättchen bewirken.

Meinen SPR-Daten zugrunde liegend könnte die Effektivität der Plättchenelimination von der Antikörperaffinität beeinflusst werden.

Es ist bemerkenswert, dass maternale HPA-1a Alloantikörper ungeachtet ihrer geringen Antikörperaffinität eine Plättchenelimination im Mausmodell verursachen, was ihre Pathogenität in beiden FNAIT Patienten beweist (s. Abb.4.23B, siehe Anhang). HPA-1a Alloantikörper der Folgeschwangerschaft induzierten eine stärkere Plättchenelimination, deren Ursache wahrscheinlich auf die im SPR detektierte Zunahme ihrer Antikörperaffinität zurückzuführen ist (s. Abb.4.20C).

Derzeit wird die Eignung dieses *NOD/SCID* Modells zur Simulation der FNAIT in weiteren Versuchen in Kooperationsarbeit mit dem Blood Research Institut in Milwaukee überprüft.

Die Möglichkeit einer *in vivo* Analyse könnte neue Aspekte zur Aufklärung der verschiedenen Antikörperspezifitäten und ihrer Bedeutung im Pathomechanismus der FNAIT eröffnen.

Zukünftig könnte eine solche funktionelle Charakterisierung von plättchenreaktiven Alloantikörpern zusammen mit einer Echtzeitanalyse ihrer Bindungseigenschaften im Rahmen einer Pränataldiagnostik bei Risikoschwangerschaften eingesetzt werden.

Die Ergebnisse dieser hier präsentierten Daten (Kapitel 5.3 - 5.5) sollen noch publiziert werden (**Socher I.**, Boylan B., Andrei-Selmer C.L., Bein G., Kroll H., Newman P.J., Santoso S. (2007) Severe neonatal alloimmune thrombocytopenia caused by low-affinity anti-HPA-1a alloantibodies. *Manuscript in preparation*).

5.6 Die Relevanz der HPA-3 Alloantikörperheterogenität in der serologischen Diagnostik der FNAIT

Eine fetomaternale HPA-3 Inkompatibilität ist aufgrund der ausgewogenen Allelfrequenzen von HPA-3a und HPA-3b (0.61 vs. 0.38) sehr häufig bei einer positiven Familienanamnese zu beobachten (Kiefel et al., 1993). In einer Studie mit 569 serologisch verifizierten FNAIT Erkrankungen wurden anti-HPA-3a lediglich in 1.8 % der Fälle evaluiert (Kroll et al., 2005b). Es wird daher angenommen, dass die Zahl der Neugeborenenenerkrankungen durch fetomaternale HPA-3 Inkompatibilität weit unterschätzt wird (Harrison et al., 2003).

Einige Autoren berichten, dass bestimmte HPA-3a Alloantikörper nur in Bindungstests mit intakten Plättchen reagieren, nicht aber in antigenspezifischen Assays, welche eine Lyse der Plättchen erfordern (Harrison et al., 2003). Kürzlich wurde auch ein ähnlicher FNAIT Fall durch anti-HPA-3b Alloantikörper beschrieben. Diese ließen sich ebenso nur mit strukturell unveränderten, nativen Plättchen detektieren (Kataoka et al., 2004). Es wird diskutiert, dass HPA-3 Epitope eine „labile Komponente“ beinhalten, welche möglicherweise während der Lyse zerstört wird.

Die vorliegende Dissertation präsentiert die bislang größte retrospektive Studie mit HPA-3a (n=12) und HPA-3b (n=2) Alloantikörpern von FNAIT und PTP Patienten, um HPA-3 Determinanten serologisch und immunchemisch näher zu charakterisieren und deren Auswirkung auf die Pränataldiagnostik aufzuklären. Alle untersuchten FNAIT Fälle waren

mit einer schweren Thrombozytopenie ($< 50 \cdot 10^9/L$) des Neugeborenen assoziiert (s. Tab. 4.10).

Diese Arbeit zeigt profunde Daten darüber, dass die Struktur von bestimmten HPA-3 Epitopen vom Glykosylierungsmuster, insbesondere der Sialylierung abhängig ist, und die Mehrheit der HPA-3 Antikörper die Integrität des $\alpha IIb\beta 3$ Komplexes erfordert. Diese Parameter bedingen eine Lagerungsinstabilität ($4^\circ C$) von HPA-3 Epitopen. Die Ergebnisse wurden in Mehrfachtestungen mit verschiedenen Spendern, die hinsichtlich ihrer HPA-3a oder HPA-3b Allelform identisch sind, verifiziert (s. Abb. 4.27) (Socher I., Zwingel C., Santoso S., Kroll H., 2007, accepted for publication in *Transfusion*, 14.08.2007).

Die Probleme in der Diagnostik von HPA-3 Alloantikörpern sind auf eine Vielzahl von Faktoren zurückzuführen. So reagierte die Mehrheit unserer HPA-3 Alloantikörper im MAIPA Assay deutlich stärker, wenn HPA-3 homozygote Testplättchen verwendet werden (s. Abb.4.26A). Dieser genodosisabhängige Effekt ist auch von anderen Plättchenantigenen bekannt (Ertel et al., 2005).

Von entscheidender Bedeutung sind unsere Befunde, dass eine Lagerung von Testplättchen bei $4^\circ C$ innerhalb von 14 Tagen zu einer signifikanten Reduktion der HPA-3 Reaktivität führt.

Eine Empfindlichkeit gegen Proteolyse konnte aber als Ursache ausgeschlossen werden. Ebenso lässt sich die Reaktivitätsabnahme nicht durch eine geringe Antikörperkonzentration im maternalen Serum erklären (s. Abb.4.28).

Diese Reduktion ist vermutlich auf eine Thrombozytenaktivierung durch Kälte während der Aufbewahrung bei $4^\circ C$ zurückzuführen. Bei Temperaturen unterhalb von $15^\circ C$ beobachtet man morphologische Veränderungen, die von einer Ausdehnung der Plättchenmembran mit Verlust der normalen diskoiden Plättchenform, einer Vakuolisierung und der Freisetzung von Granulainhaltstoffen begleitet sind (Sturk et al., 1982). Hervorgerufen werden diese kälteinduzierten Veränderungen durch die Bildung von Aktinfilamenten und dem Anstieg des zytosolischen Kalziums (Winokur and Hartwig, 1995).

Diese Kälteaktivierung und die Alterung der Plättchen während des Lagerungsprozesses könnten eine drastische Abnahme des Sialinsäuregehaltes bedingen, welche maßgeblich die Konformation und Funktion von Plättchenglykoproteinen beeinflussen können (Aakhus et al., 1990; Okumura et al., 1976) (Kovacs and Gorog, 1979) (Kotze et al., 1993; Steiner and Vancura, 1985).

Es liegen publizierte Daten vor, welche auf eine Rolle von Sialinsäuren auf manche HPA-3 Epitope hindeuten (Santoso et al., 1993b; Take et al., 1990).

Die hier dargelegten Ergebnisse legen zum ersten Mal einen kausalen Zusammenhang zwischen der Neuraminidaseempfindlichkeit und der Lagerungsinstabilität von HPA-3 Epitopen nahe (s. Abb.4.31; Abb.4.32). Während die Mehrheit der HPA-3a Alloantikörper gegen „lagerungsempfindliche“ Epitope nicht mit Neuraminidase-behandelten Plättchen im MAIPA reagierten, war die Reaktivität von anti-HPA-3a gegen „lagerungsstabile“ Epitope durch den Neuraminidaseverdau nicht beeinflusst.

Die Lagerung von Plättchen in flüssigem Stickstoff (-145 °C) schützt in der Gegenwart von Dimethylsulfoxid (DMSO) die Plättchen vor der Desialylierung und bewahrt damit ihre für die Hämostase wichtigen Funktionen (Rothwell et al., 2000; Stachecki et al., 1991). In Übereinstimmung zu diesen Daten zeigen unsere Untersuchungen mit kryokonservierten Plättchen, dass eine Lagerung in flüssigem Stickstoff die Integrität von HPA-3 Epitopen bewahren kann (s. Abb.4.34).

Seit kurzem stehen im Labor Hamster-Zelllinien (CHO) zur Verfügung, welche HPA-3a und -3b Alloantigene exprimieren (Kroll et al., 2005b). Rekombinante Glykoproteine aus Säugetierzellen weisen eine hohe Variabilität ihrer Oligosaccharidketten auf (Andersen and Goochee, 1994; Jenkins et al., 1994). Diese Heterogenität im Glykosylierungsmuster des α Ib β 3 Integrins auf CHO-Zellen beeinträchtigt möglicherweise die Detektion der HPA-3a Alloantikörper.

In meinen Analysen mit solchen Zelllinien zeigten die meisten HPA-3a Alloantikörper, welche „lagerungsinstabile“ HPA-3a Epitope erkennen, eine verminderte oder keine Reaktivität mit rekombinantem HPA-3a (s. Abb.4.30). Eine ähnliche Beobachtung wurde kürzlich von Petersen und Kollegen bei der Anwendung von CHO-Zelllinien für den Nachweis von HPA-9b Alloantikörpern beschrieben (Peterson et al., 2005).

Im Gegensatz zu bisherigen Beobachtungen (Goldberger et al., 1991; Take et al., 1990) wurden hier Hinweise darauf gefunden, dass die Mehrheit der HPA-3a Alloantikörper nicht allein gegen die α Ib-Untereinheit, sondern gegen den α Ib β 3-Komplex gerichtet ist (s. Tab.4.11; Abb.4.33A; Abb.4.33B). Meine experimentellen Daten weisen auf ähnliche biochemische Eigenschaften von HPA-3b Epitopen hin.

Vor kurzem haben Harrison und Mitarbeiter über einen FNAIT Fall durch „komplexspezifische“ anti-HPA-3a Alloantikörper berichtet, welche nur in einem

Bindungstest mit intakten Plättchen nachweisbar waren (Harrison et al., 2003). Diese Befunde unterstützen meine immunchemischen Analysen.

Die in dieser Arbeit neu gewonnenen Erkenntnisse über die strukturellen Erfordernisse von HPA-3 Epitopen haben auch praktische Konsequenzen. In der Routinediagnostik sollten frische, homozygote Testplättchen und α IIB β 3-komplexspezifische monoklonale Antikörper verwendet werden (s. Abb.4.26B). Dadurch lassen sich HPA-3 Epitope optimal präsentieren und eine Fehldiagnose der anti-HPA-3 induzierten FNAIT könnte vermieden werden. Die Zuverlässigkeit dieser Methode wurde retrospektiv an FNAIT Verdachtsfällen mit einer fetomaternalen HPA-3a (n = 26) bzw. HPA-3b (n = 31) Inkompatibilität ohne nachweisbare maternale Antikörper analysiert. Die Verifizierung von zwei weiteren FNAIT Fällen, einer durch anti-HPA-3a und ein weiterer durch anti-HPA-3b, welche mit einer schweren Thrombozytopenie der Neugeborenen assoziiert waren, verdeutlicht die Bedeutung dieser Daten (s. Kapitel 4.4.8).

Zurzeit werden im Labor neue Testverfahren zur Detektion plättchenreaktiver Antikörper entwickelt. Gereinigte humane und rekombinante Plättchenalloantigene werden an eine Festphase immobilisiert (Sensorchip, Polystyrenpartikel) und die Antikörperbindung direkt ohne Wasch- oder Markierungsschritte in der Oberflächenplasmonresonanz-Technologie (SPR) (Santoso S., Kroll H., Andrei-Selmer C.L., **Socher I.**, Rankin A., Kretzschmar E., Watkins N.A., 2006) (**Socher I.**, Kroll H., Santoso S., 2006) oder der Gelagglutinationstechnik (Bakchoul et al., 2007) nachgewiesen.

Erste Daten zeigen jedoch, dass diese Methoden aufgrund der strukturellen Anforderungen an das HPA-3 Epitop nicht zur Detektion seiner korrespondierenden Antikörper geeignet sind (Bakchoul et al., 2007) (s. Kapitel 4.4.9).

5.7 Die posttransfusionelle Purpura

Die posttransfusionelle Purpura (PTP) ist eine akute Transfusionsreaktion, welche nahezu stets mit hochtitrigen plättchenspezifischen HPA-1a Alloantikörpern assoziiert ist. Im Gegensatz zur FNAIT verursachen diese Alloantikörper meistens eine ausgeprägte Blutungskomplikation. Tödliche Blutungsfolgen wurden bei 7 von 75 Patienten (Mueller-Eckhardt, 1986) sowie bei 2 von 38 Patienten (Kroll et al., 1993) beobachtet.

Vor kurzem wurde in einer Studie gezeigt, dass anti-HPA-1a Antikörper von PTP Patienten *in vitro* eine schwere Hemmung der α IIB β 3-vermittelten Fibrinogenbindung induzieren können (Kroll et al., 2005a). Diese inhibierenden Eigenschaften der Alloantikörper könnten im Zusammenhang zu dem schweren Verlauf der PTP stehen.

Hier wurde beobachtet, dass die Epitopstruktur von PTP Alloantikörpern nicht von einem Aminosäureaustausch (Leu33Val) in der HPA-1a kodierenden Sequenz zerstört wird (Santoso S., Kroll H., Andrei-Selmer C.L., **Socher I.**, Rankin A., Kretzschmar E., Watkins N.A., 2006) (s. Abb.4.10.). Offensichtlich ist im Gegensatz zur FNAIT keine komplexe Struktur des α IIB β 3 Integrins zur Epitopexpression erforderlich, was sich ebenfalls in ihrer Stabilität gegenüber einer SDS-Denaturierung und einer Plättchenalterung (s. Tab. 4.11) widerspiegelt. Aus bisher publizierten und eigenen Erkenntnissen sind darüber hinaus Glykosylierungen nicht relevant. Diese Epitopintegrität widerspiegelt vermutlich die hohe Polyklonalität an Antikörpern, die während der sekundären Immunantwort der PTP gebildet werden.

Die Echtzeitanalyse im Biacore bestätigt die hohen Titer von PTP HPA-1 Alloantikörpern und deren hohe Affinität (s. Abb.4.25A), welche für dieses Syndrom postuliert wurden (Mueller-Eckhardt, 1986; Shulman et al., 1961). Es ist anzunehmen, dass insbesondere diese Antikörpereigenschaften für die hemmende Wirkung der Plättchenfunktion verantwortlich sind.

Entgegen den serologischen Daten (MAIPA Assay) einer PTP Patientin (Kiefel et al., 2005) wurden im SPR jedoch keine pseudospezifischen Autoantikörper gegen α IIB β 3, sondern spezifische anti-HPA-1a Alloantikörper detektiert. Eine HPA-1a spezifische Interaktion wurde auch bei zwei weiteren PTP Patienten aus einer thrombozytopenischen Phase gezeigt. Das immobilisierte α IIB β 3 Protein Autoepitope exprimiert, wurde am Beispiel von anti- α IIB β 3 Antikörpern einer Patientin mit Autoimmunthrombozytopenie demonstriert (s. Abb.4.25B).

Die beobachtete Reaktivität von PTP Alloantikörpern steht im Widerspruch zu der These, dass während der sekundären Immunreaktion bei der PTP ein zweiter autoreaktiver Antikörper gebildet wird (Kiefel et al., 2005; Mueller-Eckhardt, 1986). Andere Autoren haben gemutmaßt, dass es zur Adsorption von HPA-1a positiven Antigen-Antikörper

Komplexen (Shulman et al., 1961) oder löslichem transfundierten Alloantigen (Kickler et al., 1986) an die HPA-1a negativen Plättchen der Patienten kommt. Diese unterstützen meine Befunde und geben eine mögliche Erklärung für die spezifische Interaktion mit HPA-1a im SPR.

Diese Beobachtungen schließen jedoch die Existenz pseudospezifischer Autoantikörper als Ursache anderer PTP Fälle nicht aus. Kürzlich hat Watkins plättchenreaktive α Ib β 3 Autoantikörper im B-Zell Repertoire einer PTP Patientin nachgewiesen (Watkins et al., 2002b). Zudem wurden bei einigen PTP Patienten panreaktive Autoantikörper der GPIb/IX Spezifität während der thrombozytopenischen Phase und während der Phase mit normaler Thrombozytenzahl identifiziert (Taaning and Tonnesen, 1999).

Die hohe pathogene Relevanz von PTP Alloantikörpern wurde darüber hinaus von Dr. Brian Boylan in ersten *in vivo* Versuchen mit einem neuen NOD/SCID Mausmodell gezeigt (Boylan et al., 2006) (s. Abb.4.23). Dieses Modell wird wesentlich dazu beitragen, die Mechanismen der antikörpervermittelten und komplementvermittelten Plättchenelimination und -lyse im Pathomechanismus der PTP besser zu verstehen.

6 Zusammenfassung

Die fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT) wird durch eine fetomaternale HPA (Humane Plättchen Alloantigene)-Inkompatibilität zwischen Mutter und Kind mit maternaler Alloantikörperbildung verursacht. Die Feten bzw. Neugeborenen können schwere hämorrhagische Diathesen erleiden. Bei Kaukasiern sind in der Mehrheit der Erkrankungen Plättchenalloantigene des α IIb β 3 Fibrinogenrezeptors involviert, insbesondere HPA-1a und HPA-3a.

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung von einer variablen Anzahl von Tandem Repeats (VNTR) in der Promotorregion des diaplazentaren FcRn Rezeptors (Projekt 1), Epitopspezifität (Projekt 2), Affinität und Komplementbindungseigenschaften von Antikörpern (Projekt 3) als prädisponierende Faktoren auf die Schwere der FNAIT, sowie der Einfluss von unterschiedlichen Faktoren auf die Stabilität von HPA-3 Epitopen (Projekt 4) und die Effekte von Alloantikörpern auf humane Plättchen *in vivo* (Projekt 5) untersucht.

Im ersten Projekt wurde die Auswirkung der beiden häufigsten FcRn Allele VNTR2 (7.5 %) und VNTR3 (92 %) auf die Transkriptionsaktivität des FcRn Promotors und die Expression des FcRn Rezeptors auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Die Monozyten von VNTR3 homozygoten Individuen exprimieren das 1.66 Fache mehr an FcRn Transkript im Vergleich zu VNTR2/3 Heterozygoten ($p = 0.002$). In Übereinstimmung führt das VNTR3 Allel im Reporter-gen-Assay zu einer zweifach effektiveren Transkription des Reportergens ($p < 0.01$). Die geringere Menge an FcRn Transkript bei Trägern des VNTR2 Allels führt zu einer geringeren Rezeptordichte auf der Zelloberfläche von Monozyten, welche durch eine signifikant verminderte IgG Bindungskapazität ($p = 0.021$) reflektiert wird (Sachs U.J, **Socher I.**, Braeunlich C.G., Kroll H., Bein G., Santoso S., 2006). Eine Assoziationsstudie mit 104 FNAIT Patienten ergab jedoch keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem VNTR Genotyp und der Schwere der Thrombozytopenie. Es wird daher postuliert, dass aufgrund der geringen Frequenz des VNTR2 Allels die differentielle FcRn Expression keine entscheidende Bedeutung für die klinische Heterogenität der FNAIT hat.

Im zweiten Projekt wird die Epitopspezifität von HPA-1a Alloantikörpern am Beispiel der neutralen β 3-Leu33Val Punktmutation untersucht und mit der Ausprägung der Blutungsneigung assoziiert. Das Epitop der meisten HPA-1a Alloantikörper wird von der Länge des aliphatischen Seitenkettenrestes (CH₂-Gruppe) der Aminosäure Leu33 (HPA-1a)

kontrolliert, so dass ein Austausch der Aminosäure Leu gegen Val das HPA-1a Epitop zerstört. Nur in seltenen Fällen wird eine Kreuzreaktivität von HPA-1a Alloantikörpern mit der β 3-Val33 Variante beobachtet, die auf die Art und Häufigkeit der Antigenexposition und die Klonalität der Antikörper zurückzuführen ist. Die Anwesenheit solcher Antikörper kann mit einer schweren Thrombozytopenie des Neugeborenen assoziiert sein. Dies verdeutlicht die Immunogenität der neuen HPA-1 Variante, jedoch wurden bisher keine natürlichen β 3-Val33 Antikörper gefunden (Santoso S., Kroll H., Andrei-Selmer C.L., **Socher I.**, Rankin A., Kretzschmar E., Watkins N.A., 2006).

Die HPA-1a Alloantikörperheterogenität bereitet erhebliche Schwierigkeiten in gegenwärtigen *in vitro* Testverfahren (MAIPA Assay). Eigenen Beobachtungen zufolge werden in 22.9 % aller FNAIT Verdachtsfälle keine korrespondierenden maternalen HPA-1a Alloantikörper detektiert. **Im dritten Projekt** wurde ein neues Testverfahren (Surface Plasmon Resonance, SPR) zur Echtzeitanalyse der HPA-1 Alloantikörperbindung erfolgreich etabliert (**Socher I.**, Kroll H., Santoso S., 2006). Dieses kann HPA-1 Alloantikörper spezifisch diskriminieren und auch schwache HPA-1 Alloantikörperbindungen nachweisen, welche in bisherigen Methoden einer Dissoziation unterliegen. Neugeborene ohne Blutungszeichen zeigen signifikant geringere maternale Antikörperkonzentrationen ($p = 0.037$) im Vergleich zu Neugeborenen mit Blutungen. Schwere Blutungskomplikationen könnten ihre Ursache in einer erhöhten Antikörperaffinität haben ($p = 0.304$). Die Prädiktivität dieses Parameters muss jedoch weitergehend im Rahmen von Pränatalscreeningprogrammen überprüft werden. Die Alloantikörperaffinität nimmt von der ersten zur zweiten Schwangerschaft zu. Diese Beobachtung reflektiert vermutlich eine Reifung der Immunantwort im Verlauf der FNAIT. Es wurden keine Hinweise auf eine Aktivierung der klassischen Komplementkaskade in der FNAIT vorgefunden.

Im vierten Projekt konnte entgegen den bisherigen Befunden gezeigt werden, dass auch die HPA-3 Epitopexpression von der Struktur des α IIb β 3 Integrins abhängt. Die Mehrheit der HPA-3 Alloantikörper erkennt eine komplexe antigene Determinate, welche von der Struktur des α IIb β 3 Komplexes bestimmt wird. Neben der Integrinstruktur tragen Sialinsäuren maßgeblich zur Bildung von HPA-3 Epitopen bei. Beide Parameter bedingen offensichtlich die beobachtete Lagerungsinstabilität der HPA-3 Epitopexpression. Aufgrund der komplexen strukturellen Anforderungen des HPA-3 Epitopes ist die SPR Technologie mit gereinigtem Antigen nicht zur Detektion von HPA-3 Alloantikörpern geeignet. Diese können im MAIPA

Assay unter Verwendung von frischen HPA-3 homozygoten Plättchen (Tag 0 der Isolierung) oder alternativ kryokonservierten Plättchen mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen den α IIb β 3-Komplex zuverlässig nachgewiesen werden (**Socher I.**, Zwingel C., Santoso S., Kroll H., 2007, accepted for publication in Transfusion, 14.08.2007).

Im fünften **Projekt** wurde gezeigt, dass *NOD/SCID* Mäuse eine funktionelle *in vivo* Analyse der humanen Alloantikörperbindung mit Aussage über die pathogene Relevanz der Alloantikörper ermöglichen.

Eine Analyse plättchenreaktiver Alloantikörper im Mausmodell und *in vitro* durch SPR-Technologie könnte zukünftig helfen, das Risiko einer drastischen Blutungskomplikation für den Feten bzw. Neugeborenen und deren Sterblichkeit zu senken.

7 Summary

Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia (FNAIT) results from feto-maternal HPA (Human platelet alloantigen) incompatibility with maternal alloantibody formation. The fetuses and newborns can suffer from severe haemorrhagic syndromes. Among Caucasians, platelet alloantigens localized on the platelet fibrinogen receptor $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ are most common in this disease, particularly HPA-1a and HPA-3a.

In this study, the role of a variable number of tandem repeats (VNTR) polymorphism in the promoter region of the diaplacental FcRn receptor (project 1), epitop specificity (project 2), affinity and complement-fixing properties of alloantibodies (project 3) as predictable values for the severity of FNAIT, of different physical parameters on the stability of HPA-3 epitopes (project 4) and the effect of alloantibodies on human platelets *in vivo* (project 5) were analyzed.

The first presented study reveals the effect of the most common FcRn alleles VNTR2 (7.5 %) and VNTR3 (92 %) on the diaplacental IgG transfer by analyzing the transcriptional activity of the FcRn promoter and the receptor expression at the mRNA and protein level. Monocytes from VNTR3 homozygous individuals express 1.66 fold more FcRn transcript than do monocytes from VNTR3/2 heterozygotes ($p = 0.002$). In reporterplasmid assays the VNTR3 allele transcribes the reporter gene twice as effectively as does the VNTR2 allele ($p < 0.01$). Finally, cells of VNTR2 carriers express less FcRn on the cellular surface leading to significant diminished IgG-binding capacity under acidic conditions ($p = 0.021$) (Sachs U.J, **Socher I.**, Braeunlich C.G., Kroll H., Bein G., Santoso S., 2006). However, genotyping the VNTR alleles in a large cohort of 104 FNAIT cases revealed no significant association to the severity of FNAIT. Because of the low frequency of the VNTR2 allele I speculate that the differential FcRn expression has no significant meaning for the pathogenesis of FNAIT.

The second study demonstrates the different epitope specificity of HPA-1a alloantibodies by characterization of the neutral Leu33Val point mutation. Most HPA-1a alloantibodies recognize an epitope that is controlled by the length of the aliphatic amino acid Leu33 residue; the substitution of leucine into valine impairs the formation of HPA-1a epitope. Only some HPA-1a alloantibodies can cross-react with the new Val33 variant which can be referred to the origin and clonality of these alloantibodies. The presence of such alloantibodies might be responsible for severe thrombocytopenia of the newborn. This reflects the immunogenicity

of the new HPA-1 variant, however, naturally occurring antibodies against $\beta 3$ -Val33 have still not been found (Santoso S., Kroll H., Andrei-Selmer C.L., **Socher I.**, Rankin A., Kretzschmar E., Watkins N.A., 2006).

The heterogeneity of HPA-1a alloantibodies described in this study hampers our current platelet antibody testing. Regarding to observations in about 22.9 % of cases that are clinically highly suspicious for anti-HPA-1a FNAIT, no maternal alloantibodies were detected. **In the third project** I established successfully a new method allowing real-time analysis of platelet HPA-1a alloantibody binding by surface plasmon resonance (SPR) technology (**Socher I.**, Kroll H., Santoso S., 2006). By this technique it was possible to demonstrate the presence of low-affinity HPA-1a alloabs that were missed by standard antigen capture immunoassay, most probably by dissociation of antibody during washing processes. Newborns without bleedings show significant lower maternal antibody concentrations ($p = 0.037$) than in cases with haemorrhagic syndromes. Severe bleeding complications might be related to high antibody affinity ($p = 0.304$). However, the predictive value of this parameter should be further proved in prenatal screening programs. The observed increase in antibody affinity from the first to the second pregnancy may reflect a maturation process of the immune response in the course of FNAIT. The classical complement cascade seems not to be involved in the pathogenesis of FNAIT.

In contrast to previous studies this thesis presents evidence **in the fourth project** that the expression of the HPA-3 epitope critically depends on the α IIB β 3 integrin structure. The majority of HPA-3 alloantibodies recognize a more complex antigenic determinant comprising the α IIB β 3 heterodimer. Beside the importance of three-dimensional integrin structure, the presence of sialic acids is required for the stability of HPA-3 epitopes. These physical parameters seem to be related to a considerable instability of HPA-3 antigenic determinants observed during platelet storage at 4 °C. Unfortunately, SPR technology with purified antigen is not suitable for the detection of HPA-3 alloantibodies, probably due to the complexity of epitope requirements. Therefore, the usage of homozygous HPA-3 fresh platelets or alternatively cryopreserved platelets and the application of monoclonal antibodies against α IIB β 3-complex in MAIPA assay are inevitable for the characterization of HPA-3 alloantibodies (**Socher I.**, Zwingel C., Santoso S., Kroll H., 2007, accepted for publication in *Transfusion*, 14.08.2007).

In the fifth project it was demonstrated that a new *NOD/SCID* mouse model allows a functional analysis of alloantibody-mediated effects on human platelets with characterization of their pathogenic relevance *in vivo*.

The implementation of this *in vivo* analysis and *in vitro* analysis by the use of SPR technology in prenatal diagnostic may help in the future to reduce the number of cases with severe FNAIT-related complications.

8 Literatur

- Aakhus, A. M., P. Stavem, T. Hovig, T. M. Pedersen, and N. O. Solum, 1990, Studies on a patient with thrombocytopenia, giant platelets and a platelet membrane glycoprotein Ib with reduced amount of sialic acid: *Br J Haematol*, v. 74, p. 320-9.
- Abdiche, Y. N., and D. G. Myszka, 2004, Probing the mechanism of drug/lipid membrane interactions using Biacore: *Anal Biochem*, v. 328, p. 233-43.
- Allen, D., T. Simon, F. Sablitzky, K. Rajewsky, and A. Cumano, 1988, Antibody engineering for the analysis of affinity maturation of an anti-hapten response: *Embo J*, v. 7, p. 1995-2001.
- Andersen, D. C., and C. F. Goochee, 1994, The effect of cell-culture conditions on the oligosaccharide structures of secreted glycoproteins: *Curr Opin Biotechnol*, v. 5, p. 546-9.
- Anolik, J. H., N. Blumberg, J. Snider, and C. W. Francis, 2001, Posttransfusion purpura secondary to an alloantibody reactive with HPA-5a (Br(b)): *Transfusion*, v. 41, p. 633-6.
- Antohe, F., L. Radulescu, A. Gafencu, V. Ghetie, and M. Simionescu, 2001, Expression of functionally active FcRn and the differentiated bidirectional transport of IgG in human placental endothelial cells: *Hum Immunol*, v. 62, p. 93-105.
- Aster, R. H., and S. E. Enright, 1969, A platelet and granulocyte membrane defect in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: usefulness for the detection of platelet antibodies: *J Clin Invest*, v. 48, p. 1199-210.
- Bakchoul, T., O. Meyer, A. Agaylan, S. Bombard, G. Bein, U. J. H. Sachs, A. Salama, and S. Santoso, 2007, Rapid detection of HPA-1 alloantibodies by platelet antigens immobilized onto microbeads: *Transfusion*, v. in press.
- Balfour, A. H., and E. A. Jones, 1977, The binding of plasma proteins to human placental cell membranes: *Clin Sci Mol Med*, v. 52, p. 383-94.
- Barron-Casella, E. A., T. S. Kickler, O. C. Rogers, and J. F. Casella, 1994, Expression and purification of functional recombinant epitopes for the platelet antigens, P1A1 and P1A2: *Blood*, v. 84, p. 1157-63.
- Beadling, W. V., J. H. Herman, M. J. Stuart, M. Keashen-Schnell, and J. L. Miller, 1995, Fetal bleeding in neonatal alloimmune thrombocytopenia mediated by anti-P1A1 is not associated with inhibition of fibrinogen binding to platelet GPIIb/IIIa: *Am J Clin Pathol*, v. 103, p. 636-41.
- Beccati, D., K. M. Halkes, G. D. Batema, G. Guillena, A. Carvalho de Souza, G. van Koten, and J. P. Kamerling, 2005, SPR studies of carbohydrate-protein interactions: signal enhancement of low-molecular-mass analytes by organoplatinum(II)-labeling: *Chembiochem*, v. 6, p. 1196-203.
- Beer, J., and B. S. Coller, 1989, Evidence that platelet glycoprotein IIIa has a large disulfide-bonded loop that is susceptible to proteolytic cleavage: *J Biol Chem*, v. 264, p. 17564-73.
- Beiboer, S. H., T. Wieringa-Jelsma, P. A. Maaskant-Van Wijk, C. E. van der Schoot, R. van Zwieten, D. Roos, J. T. den Dunnen, and M. de Haas, 2005, Rapid genotyping of blood group antigens by multiplex polymerase chain reaction and DNA microarray hybridization: *Transfusion*, v. 45, p. 667-79.
- Berek, C., 1993, Somatic mutation and memory: *Curr Opin Immunol*, v. 5, p. 218-22.
- Berek, C., and M. Ziegner, 1993, The maturation of the immune response: *Immunol Today*, v. 14, p. 400-4.
- Berkowitz, R. L., J. B. Bussel, and J. G. McFarland, 2006, Alloimmune thrombocytopenia: state of the art 2006: *Am J Obstet Gynecol*, v. 195, p. 907-13.

- Bertrand, G., C. Martageix, V. Jallu, F. Vitry, and C. Kaplan, 2006, Predictive value of sequential maternal anti-HPA-1a antibody concentrations for the severity of fetal alloimmune thrombocytopenia: *J Thromb Haemost*, v. 4, p. 628-37.
- Bessos, H., M. Turner, and S. J. Urbaniak, 2005, Is there a relationship between anti-HPA-1a concentration and severity of neonatal alloimmune thrombocytopenia?: *Immunohematol*, v. 21, p. 102-9.
- Birchall, J. E., M. F. Murphy, C. Kaplan, and H. Kroll, 2003, European collaborative study of the antenatal management of feto-maternal alloimmune thrombocytopenia: *Br J Haematol*, v. 122, p. 275-88.
- Bithell, T. C., S. J. Parekh, and R. R. Strong, 1972, Platelet-function studies in the Bernard-Soulier syndrome: *Ann N Y Acad Sci*, v. 201, p. 145-60.
- Blumberg, R. S., T. Koss, C. M. Story, D. Barisani, J. Polischuk, A. Lipin, L. Pablo, R. Green, and N. E. Simister, 1995, A major histocompatibility complex class I-related Fc receptor for IgG on rat hepatocytes: *J Clin Invest*, v. 95, p. 2397-402.
- Borvak, J., J. Richardson, C. Medesan, F. Antohe, C. Radu, M. Simionescu, V. Ghetie, and E. S. Ward, 1998, Functional expression of the MHC class I-related receptor, FcRn, in endothelial cells of mice: *Int Immunol*, v. 10, p. 1289-98.
- Bowditch, R. D., P. H. Tani, C. E. Halloran, A. L. Frelinger, 3rd, R. McMillan, and M. H. Ginsberg, 1992, Localization of a PLA1 epitope to the amino terminal 66 residues of platelet glycoprotein IIIa: *Blood*, v. 79, p. 559-62.
- Boylan, B., M. C. Berndt, M. L. Kahn, and P. J. Newman, 2006, Activation-independent, antibody-mediated removal of GPVI from circulating human platelets: development of a novel NOD/SCID mouse model to evaluate the in vivo effectiveness of anti-human platelet agents: *Blood*, v. 108, p. 908-14.
- Brambell, F. W., 1966, The transmission of immunity from mother to young and the catabolism of immunoglobulins: *Lancet*, v. 2, p. 1087-93.
- Braud, V., D. Chevrier, A. Cesbron, J. D. Bignon, C. Kaplan, N. Valentin, and J. Y. Muller, 1994, Susceptibility to alloimmunization to platelet HPA-1a antigen involves TAP1 polymorphism: *Hum Immunol*, v. 41, p. 141-5.
- Bray, P. F., 1999, Integrin polymorphisms as risk factors for thrombosis: *Thromb Haemost*, v. 82, p. 337-44.
- Bray, P. F., Y. Jin, and T. Kickler, 1994, Rapid genotyping of the five major platelet alloantigens by reverse dot-blot hybridization: *Blood*, v. 84, p. 4361-7.
- Bright, N. A., and C. D. Ockleford, 1994, Heterogeneity of Fc gamma receptor-bearing cells in human term amniochorion: *Placenta*, v. 15, p. 247-55.
- Bright, N. A., and C. D. Ockleford, 1995, Cytotrophoblast cells: a barrier to maternofetal transmission of passive immunity: *J Histochem Cytochem*, v. 43, p. 933-44.
- Brown, P. J., and P. M. Johnson, 1981, Fc gamma-receptor activity of isolated human placental syncytiotrophoblast plasma membrane: *Immunology*, v. 42, p. 313-9.
- Bugert, P., S. McBride, G. Smith, A. Dugrillon, H. Kluter, W. H. Ouweland, and P. Metcalfe, 2005, Microarray-based genotyping for blood groups: comparison of gene array and 5'-nuclease assay techniques with human platelet antigen as a model: *Transfusion*, v. 45, p. 654-9.
- Burmeister, W. P., L. N. Gastinel, N. E. Simister, M. L. Blum, and P. J. Bjorkman, 1994a, Crystal structure at 2.2 Å resolution of the MHC-related neonatal Fc receptor: *Nature*, v. 372, p. 336-43.
- Burmeister, W. P., A. H. Huber, and P. J. Bjorkman, 1994b, Crystal structure of the complex of rat neonatal Fc receptor with Fc: *Nature*, v. 372, p. 379-83.
- Bussel, J. B., S. Zacharoulis, K. Kramer, J. G. McFarland, J. Pauliny, and C. Kaplan, 2005, Clinical and diagnostic comparison of neonatal alloimmune thrombocytopenia to non-immune cases of thrombocytopenia: *Pediatr Blood Cancer*, v. 45, p. 176-83.

- Calabi, F., J. Shroeder, L. Martin, and C. Milstein, 1987, Chromosomal mapping of CD1 genes: IN: *Leukocyte Typing III* (ed. by A.J. McMichael), v. Oxford University Press, p. 72.
- Calvete, J. J., and E. Muniz-Diaz, 1993, Localization of an O-glycosylation site in the alpha-subunit of the human platelet integrin GPIIb/IIIa involved in Baka (HPA-3a) alloantigen expression: *FEBS Lett*, v. 328, p. 30-4.
- Carl, B., H. Kroll, J. Bux, G. Bein, and S. Santoso, 2000, B-lymphoblastoid cell lines as a source of reference DNA for human platelet and neutrophil antigen genotyping: *Transfusion*, v. 40, p. 62-8.
- Castro, V., H. Kroll, A. F. Origa, M. A. Falconi, S. B. Marques, S. T. Marba, R. Passini, Jr., J. M. Annichino-Bizzacchi, F. F. Costa, S. Santoso, and V. R. Arruda, 2007, A prospective study on the prevalence and risk factors for neonatal thrombocytopenia and platelet alloimmunization among 9332 unselected Brazilian newborns: *Transfusion*, v. 47, p. 59-66.
- Chapman, J. F., M. F. Murphy, S. I. Berney, J. Ord, P. Metcalfe, J. A. Amess, and A. H. Waters, 1987, Post-transfusion purpura associated with anti-Baka and anti-PIA2 platelet antibodies and delayed haemolytic transfusion reaction: *Vox Sang*, v. 52, p. 313-7.
- Chevalier, D., C. Cauffiez, C. Bernard, J. M. Lo-Guidice, D. Allorge, F. Fazio, N. Ferrari, C. Libersa, M. Lhermitte, J. C. D'Halluin, and F. Broly, 2001, Characterization of new mutations in the coding sequence and 5'-untranslated region of the human prostacyclin synthase gene (CYP8A1): *Hum Genet*, v. 108, p. 148-55.
- Christie, D. J., D. N. Leja, D. L. Carlson, and C. D. Swinehart, 1993, Characterization of platelet activation induced by HLA antibodies associated with alloimmune thrombocytopenia: *J Lab Clin Med*, v. 121, p. 437-43.
- Christie, D. J., S. Pulkrabek, J. L. Putnam, M. L. Slatkoff, and K. D. Pischel, 1991, Posttransfusion purpura due to an alloantibody reactive with glycoprotein Ia/IIa (anti-HPA-5b): *Blood*, v. 77, p. 2785-9.
- Christie, D. J., and C. D. Swinehart, 1992, Human platelet activating antibodies: *Semin Thromb Hemost*, v. 18, p. 186-92.
- Cianga, P., C. Cianga, L. Cozma, E. S. Ward, and E. Carasevici, 2003, The MHC class I related Fc receptor, FcRn, is expressed in the epithelial cells of the human mammary gland: *Hum Immunol*, v. 64, p. 1152-9.
- Cines, D. B., and A. D. Schreiber, 1979, Effect of anti-PIA1 antibody on human platelets. I. The role of complement: *Blood*, v. 53, p. 567-77.
- Clancy, R., E. Jenkins, and B. Firkin, 1972, Qualitative platelet abnormalities in idiopathic thrombocytopenic purpura: *N Engl J Med*, v. 286, p. 622-6.
- Colombani, J., J. D'Amaro, B. Gabb, G. Smith, and A. Svejgaard, 1971, International agreement on a microtechnique of platelet complement fixation (Pl. C fix.): *Transplant Proc*, v. 3, p. 121-6.
- Cooling, L. L., K. Kelly, J. Barton, D. Hwang, T. A. Koerner, and J. D. Olson, 2005, Determinants of ABH expression on human blood platelets: *Blood*, v. 105, p. 3356-64.
- Curtis, B. R., and R. H. Aster, 2006, Expression of ABH antigens on platelets: *Blood*, v. 107, p. 842; author reply 842-3.
- Curtis, B. R., J. T. Edwards, M. J. Hessner, J. P. Klein, and R. H. Aster, 2000, Blood group A and B antigens are strongly expressed on platelets of some individuals: *Blood*, v. 96, p. 1574-81.
- Dancis, J., J. Lind, M. Oratz, J. Smolens, and P. Vara, 1961, Placental transfer of proteins in human gestation: *Am J Obstet Gynecol*, v. 82, p. 167-71.
- Dausset, J., and G. Malinvaud, 1954, [Influence of agitation on agglutination of blood platelets; its usefulness in research on thrombo-agglutinins and in performance of the Coombs blood platelet test; preliminary technical note.]: *Sang*, v. 25, p. 847-51.

- De Marco, L., A. Girolami, T. S. Zimmerman, and Z. M. Ruggeri, 1986, von Willebrand factor interaction with the glycoprotein IIb/IIIa complex. Its role in platelet function as demonstrated in patients with congenital afibrinogenemia: *J Clin Invest*, v. 77, p. 1272-7.
- Decary, F., D. L'Abbe, L. Tremblay, and P. Chartrand, 1991, The immune response to the HPA-1a antigen: association with HLA-DRw52a: *Transfus Med*, v. 1, p. 55-62.
- Deckmyn, H., and S. De Reys, 1995, Functional effects of human antiplatelet antibodies: *Semin Thromb Hemost*, v. 21, p. 46-59.
- Deckmyn, H., K. Vanhoorelbeke, and K. Peerlinck, 1998, Inhibitory and activating human antiplatelet antibodies: *Baillieres Clin Haematol*, v. 11, p. 343-59.
- Detwiler, T. C., and E. B. McGowan, 1985, Platelet receptors for thrombin: *Adv Exp Med Biol*, v. 192, p. 15-28.
- Djaffar, I., D. Vilette, D. Pidard, J. L. Wautier, and J. P. Rosa, 1993, Human platelet antigen 3 (HPA-3): localization of the determinant of the alloantibody Lek(a) (HPA-3a) to the C-terminus of platelet glycoprotein IIb heavy chain and contribution of O-linked carbohydrates: *Thromb Haemost*, v. 69, p. 485-9.
- Dooren, M. C., and C. P. Engelfriet, 1993, Protection against Rh D-haemolytic disease of the newborn by a diminished transport of maternal IgG to the fetus: *Vox Sang*, v. 65, p. 59-61.
- Duncan, J. R., and W. F. Rosse, 1986, Alloantibody-induced platelet serotonin release is blocked by antibody to the platelet PLA1 antigen: *Br J Haematol*, v. 64, p. 331-8.
- Duquesnoy, R. J., D. J. Filip, P. A. Tomasulo, and R. H. Aster, 1977, Role of HLA-C matching in histocompatible platelet transfusion therapy of alloimmunized thrombocytopenic patients: *Transplant Proc*, v. 9, p. 1827-8.
- Durand-Zaleski, I., N. Schlegel, C. Blum-Boisgard, S. Uzan, M. Dreyfus, and C. Kaplan, 1996, Screening primiparous women and newborns for fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia: a prospective comparison of effectiveness and costs. Immune Thrombocytopenia Working Group: *Am J Perinatol*, v. 13, p. 423-31.
- Ehrlich, P., 1892, Über Immunität durch Vererbung und Säugung: *Z. Hyg. Infect. Kr.*, v. 12, p. 183-203.
- Ellinger, I., H. Reischer, C. Lehner, K. Leitner, W. Hunziker, and R. Fuchs, 2005, Overexpression of the human neonatal Fc-receptor alpha-chain in trophoblast-derived BeWo cells increases cellular retention of beta2-microglobulin: *Placenta*, v. 26, p. 171-82.
- Ertel, K., M. Al-Tawil, S. Santoso, and H. Kroll, 2005, Relevance of the HPA-15 (Gov) polymorphism on CD109 in alloimmune thrombocytopenic syndromes: *Transfusion*, v. 45, p. 366-73.
- Faull, R. J., X. Du, and M. H. Ginsberg, 1994, Receptors on platelets: *Methods Enzymol*, v. 245, p. 183-94.
- Ficko, T., V. Galvani, R. Ruprecht, T. Dovic, and P. Rozman, 2004, Real-time PCR genotyping of human platelet alloantigens HPA-1, HPA-2, HPA-3 and HPA-5 is superior to the standard PCR-SSP method: *Transfus Med*, v. 14, p. 425-32.
- Firan, M., R. Bawdon, C. Radu, R. J. Ober, D. Eaken, F. Antohe, V. Ghetie, and E. S. Ward, 2001, The MHC class I-related receptor, FcRn, plays an essential role in the maternofetal transfer of gamma-globulin in humans: *Int Immunol*, v. 13, p. 993-1002.
- Firth, J. A., and L. Leach, 1996, Not trophoblast alone: a review of the contribution of the fetal microvasculature to transplacental exchange: *Placenta*, v. 17, p. 89-96.
- Fitzgerald, L. A., B. Steiner, S. C. Rall, Jr., S. S. Lo, and D. R. Phillips, 1987, Protein sequence of endothelial glycoprotein IIIa derived from a cDNA clone. Identity with platelet glycoprotein IIIa and similarity to "integrin": *J Biol Chem*, v. 262, p. 3936-9.

- Flug, F., R. Espinola, L. X. Liu, C. SinQuee, R. DaRosso, M. Nardi, and S. Karpatkin, 1991, A 13-mer peptide straddling the leucine33/proline33 polymorphism in glycoprotein IIIa does not define the PLA1 epitope: *Blood*, v. 77, p. 1964-9.
- Flug, F., M. Karpatkin, and S. Karpatkin, 1994, Should all pregnant women be tested for their platelet PLA (Zw, HPA-1) phenotype?: *Br J Haematol*, v. 86, p. 1-5.
- Fujiwara, K., K. Tokunaga, K. Isa, M. Miyamoto, L. Wang, T. Akaza, K. Tadokoroo, Y. Shibata, and T. Juji, 1995, DNA-based typing of human platelet antigen systems by polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism method: *Vox Sang*, v. 69, p. 347-51.
- Furihata, K., D. J. Nugent, A. Bissonette, R. H. Aster, and T. J. Kunicki, 1987, On the association of the platelet-specific alloantigen, Pena, with glycoprotein IIIa. Evidence for heterogeneity of glycoprotein IIIa: *J Clin Invest*, v. 80, p. 1624-30.
- Garner, S. F., P. A. Smethurst, Y. Merieux, C. Aeby, G. Smith, K. L. Armour, M. L. Scott, L. M. Williamson, P. Metcalfe, A. H. Goodall, M. R. Clark, D. Rigal, M. Schawaller, and W. H. Ouwehand, 2000, A rapid one-stage whole-blood HPA-1a phenotyping assay using a recombinant monoclonal IgG1 anti-HPA-1a: *Br J Haematol*, v. 108, p. 440-7.
- Giltay, J. C., H. J. Brinkman, A. Vlekke, V. Kiefel, J. A. van Mourik, and A. E. von dem Borne, 1990, The platelet glycoprotein Ia-IIa-associated Br-alloantigen system is expressed by cultured endothelial cells: *Br J Haematol*, v. 75, p. 557-60.
- Giltay, J. C., H. J. Brinkman, A. E. von dem Borne, and J. A. van Mourik, 1989, Expression of the alloantigen Zwa (or P1A1) on human vascular smooth muscle cells and foreskin fibroblasts: a study on normal individuals and a patient with Glanzmann's thrombasthenia: *Blood*, v. 74, p. 965-70.
- Giltay, J. C., O. C. Leeksa, A. E. von dem Borne, and J. A. van Mourik, 1988, Alloantigenic composition of the endothelial vitronectin receptor: *Blood*, v. 72, p. 230-3.
- Gitlin, D., and A. Biasucci, 1969, Development of gamma G, gamma A, gamma M, beta IC-beta IA, C 1 esterase inhibitor, ceruloplasmin, transferrin, hemopexin, haptoglobin, fibrinogen, plasminogen, alpha 1-antitrypsin, orosomucoid, beta-lipoprotein, alpha 2-macroglobulin, and prealbumin in the human conceptus: *J Clin Invest*, v. 48, p. 1433-46.
- Gitlin, D., J. Kumate, J. Urrusti, and C. Morales, 1964, The Selectivity of the Human Placenta in the Transfer of Plasma Proteins from Mother to Fetus: *J Clin Invest*, v. 43, p. 1938-51.
- Glade-Bender, J., J. G. McFarland, C. Kaplan, L. Porcelijn, and J. B. Bussel, 2001, Anti-HPA-3A induces severe neonatal alloimmune thrombocytopenia: *J Pediatr*, v. 138, p. 862-7.
- Goldberger, A., M. Kolodziej, M. Poncz, J. S. Bennett, and P. J. Newman, 1991, Effect of single amino acid substitutions on the formation of the P1A and Bak alloantigenic epitopes: *Blood*, v. 78, p. 681-7.
- Griffin, H. M., and W. H. Ouwehand, 1995, A human monoclonal antibody specific for the leucine-33 (P1A1, HPA-1a) form of platelet glycoprotein IIIa from a V gene phage display library: *Blood*, v. 86, p. 4430-6.
- Griffiths, G. M., C. Berek, M. Kaartinen, and C. Milstein, 1984, Somatic mutation and the maturation of immune response to 2-phenyl oxazolone: *Nature*, v. 312, p. 271-5.
- Hansen, R. J., and J. P. Balthasar, 2002, Intravenous immunoglobulin mediates an increase in anti-platelet antibody clearance via the FcRn receptor: *Thromb Haemost*, v. 88, p. 898-9.
- Harrington, W. J., C. C. Sprague, V. Minnich, C. V. Moore, R. C. Aulvin, and R. Dubach, 1953, Immunologic mechanisms in idiopathic and neonatal thrombocytopenic purpura: *Ann Intern Med*, v. 38, p. 433-69.
- Harrison, C. R., B. R. Curtis, J. G. McFarland, R. W. Huff, and R. H. Aster, 2003, Severe neonatal alloimmune thrombocytopenia caused by antibodies to human platelet

- antigen 3a (Baka) detectable only in whole platelet assays: *Transfusion*, v. 43, p. 1398-402.
- Haymann, J. P., J. P. Levraud, S. Bouet, V. Kappes, J. Hagege, G. Nguyen, Y. Xu, E. Rondeau, and J. D. Sraer, 2000, Characterization and localization of the neonatal Fc receptor in adult human kidney: *J Am Soc Nephrol*, v. 11, p. 632-9.
- Helmberg, W., B. Folsch, T. Wagner, and G. Lanzer, 1997, Detection and differentiation of platelet-specific antibodies by flow cytometry: the bead-mediated platelet assay: *Transfusion*, v. 37, p. 502-6.
- Honda, S., Y. Honda, B. Bauer, C. Ruan, and T. J. Kunicki, 1995, The impact of three-dimensional structure on the expression of PIA alloantigens on human integrin beta 3: *Blood*, v. 86, p. 234-42.
- Hou, M., D. Stockelberg, L. Rydberg, J. Kutti, and H. Wadenvik, 1996, Blood group A antigen expression in platelets is prominently associated with glycoprotein Ib and IIb. Evidence for an A1/A2 difference: *Transfus Med*, v. 6, p. 51-9.
- Huber, A. H., R. F. Kelley, L. N. Gastinel, and P. J. Bjorkman, 1993, Crystallization and stoichiometry of binding of a complex between a rat intestinal Fc receptor and Fc: *J Mol Biol*, v. 230, p. 1077-83.
- Huizinga, T. W., M. Kerst, J. H. Nuyens, A. Vlug, A. E. von dem Borne, D. Roos, and P. A. Tetteroo, 1989, Binding characteristics of dimeric IgG subclass complexes to human neutrophils: *J Immunol*, v. 142, p. 2359-64.
- Hynes, R. O., 2002, Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines: *Cell*, v. 110, p. 673-87.
- Jaegtvik, S., A. Husebekk, B. Aune, P. Oian, L. B. Dahl, and B. Skogen, 2000, Neonatal alloimmune thrombocytopenia due to anti-HPA 1a antibodies; the level of maternal antibodies predicts the severity of thrombocytopenia in the newborn: *Bjog*, v. 107, p. 691-4.
- Jenkins, D. J., A. L. Jenkins, T. M. Wolever, V. Vuksan, A. V. Rao, L. U. Thompson, and R. G. Josse, 1994, Low glycemic index: lente carbohydrates and physiological effects of altered food frequency: *Am J Clin Nutr*, v. 59, p. 706S-709S.
- Johnson, P. M., and C. M. Molloy, 1983, Localization in human term placental bed and amniochorion of cells bearing trophoblast antigens identified by monoclonal antibodies: *Am J Reprod Immunol*, v. 4, p. 33-7.
- Jones, E. A., and T. A. Waldmann, 1972, The mechanism of intestinal uptake and transcellular transport of IgG in the neonatal rat: *J Clin Invest*, v. 51, p. 2916-27.
- Jonsson, U., L. Fagerstam, B. Ivarsson, B. Johnsson, R. Karlsson, K. Lundh, S. Lofas, B. Persson, H. Roos, I. Ronnberg, and et al., 1991, Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology: *Biotechniques*, v. 11, p. 620-7.
- Junghans, R. P., and C. L. Anderson, 1996, The protection receptor for IgG catabolism is the beta2-microglobulin-containing neonatal intestinal transport receptor: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 93, p. 5512-6.
- Kameda, T., M. Koyama, N. Matsuzaki, T. Taniguchi, F. Saji, and O. Tanizawa, 1991, Localization of three subtypes of Fc gamma receptors in human placenta by immunohistochemical analysis: *Placenta*, v. 12, p. 15-26.
- Kandil, E., M. Egashira, O. Miyoshi, N. Niikawa, T. Ishibashi, and M. Kasahara, 1996, The human gene encoding the heavy chain of the major histocompatibility complex class I-like Fc receptor (FCGRT) maps to 19q13.3: *Cytogenet Cell Genet*, v. 73, p. 97-8.
- Kaplan, C., 2002, Alloimmune thrombocytopenia of the fetus and the newborn: *Blood Rev*, v. 16, p. 69-72.
- Kaplan, C., 2007, Neonatal alloimmune thrombocytopenia: a 50-year story: *Immunohematol*, v. 23, p. 9-13.

- Kaplan, C., M. C. Morel-Kopp, H. Kroll, V. Kiefel, N. Schlegel, N. Chesnel, and C. Mueller-Eckhardt, 1991, HPA-5b (Br(a)) neonatal alloimmune thrombocytopenia: clinical and immunological analysis of 39 cases: *Br J Haematol*, v. 78, p. 425-9.
- Kaplan, C., L. Porcelijn, P. Vanlieferinghen, E. Julien, F. Bianchi, C. Martageix, G. Bertrand, and V. Jallu, 2005, Anti-HPA-9bw (Maxa) fetomaternal alloimmunization, a clinically severe neonatal thrombocytopenia: difficulties in diagnosis and therapy and report on eight families: *Transfusion*, v. 45, p. 1799-803.
- Karas, S. P., W. F. Rosse, and R. J. Kurlander, 1982, Characterization of the IgG-Fc receptor on human platelets: *Blood*, v. 60, p. 1277-82.
- Kataoka, S., H. Kobayashi, K. Chiba, M. Nakamura, S. Shinada, S. Morita, M. Lin, and Y. Shibata, 2004, Neonatal alloimmune thrombocytopenia due to an antibody against a labile component of human platelet antigen-3b (Bak b): *Transfus Med*, v. 14, p. 419-23.
- Keimowitz, R. M., J. Collins, K. Davis, and R. H. Aster, 1986, Post-transfusion purpura associated with alloimmunization against the platelet-specific antigen, Baka: *Am J Hematol*, v. 21, p. 79-88.
- Kelsoe, G., 1996, The germinal center: a crucible for lymphocyte selection: *Semin Immunol*, v. 8, p. 179-84.
- Kelton, J. G., J. W. Smith, P. Horsewood, M. N. Warner, T. E. Warkentin, R. W. Finberg, and C. P. Hayward, 1998, ABH antigens on human platelets: expression on the glycosyl phosphatidylinositol-anchored protein CD109: *J Lab Clin Med*, v. 132, p. 142-8.
- Kickler, T. S., P. M. Ness, J. H. Herman, and W. R. Bell, 1986, Studies on the pathophysiology of posttransfusion purpura: *Blood*, v. 68, p. 347-50.
- Kiefel, V., 1992, The MAIPA assay and its applications in immunohaematology: *Transfus Med*, v. 2, p. 181-8.
- Kiefel, V., D. Bassler, H. Kroll, B. Paes, G. Giers, J. Ditomasso, H. Alber, M. Berns, B. Wiebe, E. M. Quenzel, J. Hoch, and A. Greinacher, 2006, Antigen-positive platelet transfusion in neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT): *Blood*, v. 107, p. 3761-3.
- Kiefel, V., E. Freitag, H. Kroll, S. Santoso, and C. Mueller-Eckhardt, 1996, Platelet autoantibodies (IgG, IgM, IgA) against glycoproteins IIb/IIIa and Ib/IX in patients with thrombocytopenia: *Ann Hematol*, v. 72, p. 280-5.
- Kiefel, V., C. Konig, H. Kroll, and S. Santoso, 2001, Platelet alloantibodies in transfused patients: *Transfusion*, v. 41, p. 766-70.
- Kiefel, V., H. Kroll, J. Bonnert, K. Unkelbach, B. Katzmann, Z. Nebenführer, S. Santoso, and C. Mueller-Eckhardt, 1993, Platelet alloantigen frequencies in Caucasians: a serological study: *Transfus Med*, v. 3, p. 237-242.
- Kiefel, V., A. Salama, and C. Mueller-Eckhardt, 1989a, In vitro fixation of C3d and C5b-9 on platelets by human platelet reactive antibodies: *Blut*, v. 58, p. 33-7.
- Kiefel, V., S. Santoso, W. M. Glockner, B. Katzmann, W. R. Mayr, and C. Mueller-Eckhardt, 1989b, Posttransfusion purpura associated with an anti-Bak: *Vox Sang*, v. 56, p. 93-7.
- Kiefel, V., S. Santoso, M. Weisheit, and C. Mueller-Eckhardt, 1987, Monoclonal antibody--specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies: *Blood*, v. 70, p. 1722-6.
- Kiefel, V., I. Schonberner-Richter, and K. Schilf, 2005, Anti-HPA-1a in a case of post-transfusion purpura: binding to antigen-negative platelets detected by adsorption/elution: *Transfus Med*, v. 15, p. 243-7.
- Killie, M. K., A. Husebekk, C. Kaplan, E. Taaning, and B. Skogen, 2007, Maternal human platelet antigen-1a antibody level correlates with the platelet count in the newborns: a retrospective study: *Transfusion*, v. 47, p. 55-8.

- Kim, M., K. Park, E. J. Jeong, Y. B. Shin, and B. H. Chung, 2006, Surface plasmon resonance imaging analysis of protein-protein interactions using on-chip-expressed capture protein: *Anal Biochem*, v. 351, p. 298-304.
- Kimura, S., K. Yurugi, H. Segawa, J. Kuroda, K. Sato, M. Nogawa, T. Yuasa, H. Egawa, K. Tanaka, and T. Maekawa, 2005, Rapid quantitation of immunoglobulin G antibodies specific for blood group antigens A and B by surface plasmon resonance: *Transfusion*, v. 45, p. 56-62.
- King, B. F., 1982, Absorption of peroxidase-conjugated immunoglobulin G by human placenta: an in vitro study: *Placenta*, v. 3, p. 395-406.
- Kishore, U., and K. B. Reid, 2000, C1q: structure, function, and receptors: *Immunopharmacology*, v. 49, p. 159-70.
- Kjeldsen-Kragh, J., M. K. Killie, G. Tomter, E. Golebiowska, I. Randen, R. Hauge, B. Aune, P. Oian, L. B. Dahl, J. Pirhonen, R. Lindeman, H. Husby, G. Haugen, M. Gronn, B. Skogen, and A. Husebekk, 2007, A screening and intervention program aimed to reduce mortality and serious morbidity associated with severe neonatal alloimmune thrombocytopenia: *Blood*.
- Kluter, H., K. Fehlau, S. Panzer, H. Kirchner, and G. Bein, 1996, Rapid typing for human platelet antigen systems-1, -2, -3 and -5 by PCR amplification with sequence-specific primers: *Vox Sang*, v. 71, p. 121-5.
- Kotze, H. F., V. van Wyk, P. N. Badenhorst, A. D. Heyns, J. P. Roodt, and M. G. Lotter, 1993, Influence of platelet membrane sialic acid and platelet-associated IgG on ageing and sequestration of blood platelets in baboons: *Thromb Haemost*, v. 70, p. 676-80.
- Kovacs, I. B., and P. Gorog, 1979, Inhibition by N-acetyl neuraminic (sialic) acid of platelet aggregation induced by different stimuli: *Thromb Haemost*, v. 42, p. 1187-92.
- Kretzschmar, E., N. Von Ahsen, and H. Trobisch, 2001, Rapid genotyping of human platelet antigen 5 with fluorophore-labelled hybridization probes on the LightCycler: *Br J Haematol*, v. 114, p. 397-9.
- Kristoffersen, E. K., 1996, Human placental Fc gamma-binding proteins in the maternofetal transfer of IgG: *APMIS Suppl*, v. 64, p. 5-36.
- Kristoffersen, E. K., and R. Matre, 1996a, Co-localization of the neonatal Fc gamma receptor and IgG in human placental term syncytiotrophoblasts: *Eur J Immunol*, v. 26, p. 1668-71.
- Kristoffersen, E. K., and R. Matre, 1996b, Surface annexin II on placental membranes of the fetomaternal interface: *Am J Reprod Immunol*, v. 36, p. 141-9.
- Kristoffersen, E. K., E. Ulvestad, L. Bjorge, A. Aarli, and R. Matre, 1994, Fc gamma-receptor activity of placental annexin II: *Scand J Immunol*, v. 40, p. 237-42.
- Kristoffersen, E. K., E. Ulvestad, C. A. Vedeler, and R. Matre, 1990, Fc gamma receptor heterogeneity in the human placenta: *Scand J Immunol*, v. 32, p. 561-4.
- Kroll, H., B. Carl, S. Santoso, J. Bux, and G. Bein, 2001, Workshop report on the genotyping of blood cell alloantigens: *Transfus Med*, v. 11, p. 211-9.
- Kroll, H., V. Kiefel, and C. Mueller-Eckhardt, 1993, [Post-transfusion purpura: clinical and immunologic studies in 38 patients]: *Infusionsther Transfusionsmed*, v. 20, p. 198-204.
- Kroll, H., G. Penke, and S. Santoso, 2005a, Functional heterogeneity of alloantibodies against the human platelet antigen (HPA)-1a: *Thromb Haemost*, v. 94, p. 1224-9.
- Kroll, H., J. Yates, and S. Santoso, 2005b, Immunization against a low-frequency human platelet alloantigen in fetal alloimmune thrombocytopenia is not a single event: characterization by the combined use of reference DNA and novel allele-specific cell lines expressing recombinant antigens: *Transfusion*, v. 45, p. 353-8.
- Kuijpers, R. W., A. E. von dem Borne, V. Kiefel, C. M. Eckhardt, A. H. Waters, B. Zupanska, D. Barz, E. Taaning, A. Termijtelen, and W. H. Ouweland, 1992, Leucine33-proline33 substitution in human platelet glycoprotein IIIa determines HLA-DRw52a

- (Dw24) association of the immune response against HPA-1a (Zwa/PIA1) and HPA-1b (Zwb/PIA2): *Hum Immunol*, v. 34, p. 253-6.
- Kunicki, T. J., 1989, Platelet membrane glycoproteins and their function: an overview: *Blut*, v. 59, p. 30-4.
- Kunicki, T. J., S. Honda, B. Dawson, Y. Honda, C. Ruan, and R. H. Aster, 1995, The P1A alloantigen system is a sensitive indicator of the structural integrity of the amino-terminal domain of the human integrin beta 3 subunit: *Blood Cells Mol Dis*, v. 21, p. 131-41.
- Kurata, Y., J. G. Curd, J. D. Tamerius, and R. McMillan, 1985, Platelet-associated complement in chronic ITP: *Br J Haematol*, v. 60, p. 723-33.
- Kurlander, R. J., and J. Batker, 1982, The binding of human immunoglobulin G1 monomer and small, covalently cross-linked polymers of immunoglobulin G1 to human peripheral blood monocytes and polymorphonuclear leukocytes: *J Clin Invest*, v. 69, p. 1-8.
- Laegreid, W. W., M. P. Heaton, J. E. Keen, W. M. Grosse, C. G. Chitko-McKown, T. P. Smith, J. W. Keele, G. L. Bennett, and T. E. Besser, 2002, Association of bovine neonatal Fc receptor alpha-chain gene (FCGRT) haplotypes with serum IgG concentration in newborn calves: *Mamm Genome*, v. 13, p. 704-10.
- Leach, J. L., D. D. Sedmak, J. M. Osborne, B. Rahill, M. D. Lairmore, and C. L. Anderson, 1996, Isolation from human placenta of the IgG transporter, FcRn, and localization to the syncytiotrophoblast: implications for maternal-fetal antibody transport: *J Immunol*, v. 157, p. 3317-22.
- Leach, L., B. M. Eaton, J. A. Firth, and S. F. Contractor, 1991, Immunocytochemical and labelled tracer approaches to uptake and intracellular routing of immunoglobulin-G (IgG) in the human placenta: *Histochem J*, v. 23, p. 444-9.
- Legler, T. J., M. Kohler, W. R. Mayr, S. Panzer, H. Ohto, and G. F. Fischer, 1996, Genotyping of the human platelet antigen systems 1 through 5 by multiplex polymerase chain reaction and ligation-based typing: *Transfusion*, v. 36, p. 426-31.
- Leporrier, M., G. Dighiero, M. Auzemery, and J. L. Binet, 1979, Detection and quantification of platelet-bound antibodies with immunoperoxidase: *Br J Haematol*, v. 42, p. 605-11.
- Li, Z., C. J. Woo, M. D. Iglesias-Ussel, D. Ronai, and M. D. Scharff, 2004, The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination: *Genes Dev*, v. 18, p. 1-11.
- Linnet-Jepsen, P., F. Galatius-Jensen, and M. Hauge, 1958, On the inheritance of the Gm serum group: *Acta Genet Stat Med*, v. 8, p. 164-96.
- Liu, L. X., M. A. Nardi, J. F. Casella, and S. Karpatkin, 1996a, Inhibition of binding of anti-PLA1 antibodies to platelets with monoclonal antibody LK-4. Evidence for multiple PLA1 receptor sites on platelet GPIIIa: *Blood*, v. 88, p. 3601-7.
- Liu, Y. J., F. Malisan, O. de Bouteiller, C. Guret, S. Lebecque, J. Banchereau, F. C. Mills, E. E. Max, and H. Martinez-Valdez, 1996b, Within germinal centers, isotype switching of immunoglobulin genes occurs after the onset of somatic mutation: *Immunity*, v. 4, p. 241-50.
- Livak, K. J., and T. D. Schmittgen, 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method: *Methods*, v. 25, p. 402-8.
- Loos, M., 1982, The classical complement pathway: mechanism of activation of the first component by antigen-antibody complexes: *Prog Allergy*, v. 30, p. 135-92.
- Lubega, J., 1990, A kinetic study of human IgG binding to placental Fc gamma-receptor: *Mol Immunol*, v. 27, p. 45-55.
- Lucas, G. F., S. J. Pittman, S. Davies, T. Solanki, and K. Bruggemann, 1997, Post-transfusion purpura (PTP) associated with anti-HPA-1a, anti-HPA-2b and anti-HPA-3a antibodies: *Transfus Med*, v. 7, p. 295-9.

- Lyman, S., R. H. Aster, G. P. Visentin, and P. J. Newman, 1990, Polymorphism of human platelet membrane glycoprotein IIb associated with the Baka/Bakb alloantigen system: *Blood*, v. 75, p. 2343-8.
- Mackenzie, N. M., B. Morris, and R. Morris, 1983, Protein binding to brush borders of enterocytes from the jejunum of the neonatal rat: *Biochim Biophys Acta*, v. 755, p. 204-9.
- Makiya, R., and T. Stigbrand, 1992, Placental alkaline phosphatase has a binding site for the human immunoglobulin-G Fc portion: *Eur J Biochem*, v. 205, p. 341-5.
- Makiya, R., L. E. Thornell, and T. Stigbrand, 1992, Placental alkaline phosphatase, a GPI-anchored protein, is clustered in clathrin-coated vesicles: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 183, p. 803-8.
- Malmqvist, M., 1993, Biospecific interaction analysis using biosensor technology: *Nature*, v. 361, p. 186-7.
- Maslanka, K., M. Yassai, and J. Gorski, 1996, Molecular identification of T cells that respond in a primary bulk culture to a peptide derived from a platelet glycoprotein implicated in neonatal alloimmune thrombocytopenia: *J Clin Invest*, v. 98, p. 1802-8.
- Matre, R., G. Kleppe, and O. Tonder, 1981, Isolation and characterization of Fc gamma receptors from human placenta: *Acta Pathol Microbiol Scand [C]*, v. 89, p. 209-13.
- Matre, R., E. K. Kristoffersen, E. Ulvestad, and C. A. Vedeler, 1989, Purification of a functional 40 kD human placental Fc gamma-receptor using a monoclonal antibody: *Apmis*, v. 97, p. 733-7.
- McFarland, J. G., R. H. Aster, J. B. Bussel, J. G. Gianopoulos, R. S. Derbes, and P. J. Newman, 1991, Prenatal diagnosis of neonatal alloimmune thrombocytopenia using allele-specific oligonucleotide probes: *Blood*, v. 78, p. 2276-82.
- McKean, D., K. Huppi, M. Bell, L. Staudt, W. Gerhard, and M. Weigert, 1984, Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 81, p. 3180-4.
- McMillan, R., R. L. Longmire, M. Tavassoli, S. Armstrong, and R. Yelenosky, 1974, In vitro platelet phagocytosis by splenic leukocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura: *N Engl J Med*, v. 290, p. 249-51.
- McNabb, T., T. Y. Koh, K. J. Dorrington, and R. H. Painter, 1976, Structure and function of immunoglobulin domains. V. Binding, University of immunoglobulin G and fragments to placental membrane preparations: *J Immunol*, v. 117, p. 882-8.
- Menitove, J. E., J. Pereira, R. Hoffman, T. Anderson, W. Fried, and R. H. Aster, 1989, Cyclic thrombocytopenia of apparent autoimmune etiology: *Blood*, v. 73, p. 1561-9.
- Metcalf, P., N. A. Watkins, W. H. Ouweland, C. Kaplan, P. Newman, R. Kekomaki, M. De Haas, R. Aster, Y. Shibata, J. Smith, V. Kiefel, and S. Santoso, 2003, Nomenclature of human platelet antigens: *Vox Sang*, v. 85, p. 240-5.
- Meyer, O., A. Agaylan, S. Bombard, H. Kiesewetter, and A. Salama, 2006a, A novel antigen-specific capture assay for the detection of platelet antibodies and HPA-1a phenotyping: *Vox Sang*, v. 91, p. 324-30.
- Meyer, O., A. Agaylan, H. H. Borchert, T. Aslan, S. Bombard, H. Kiesewetter, and A. Salama, 2006b, A simple and practical assay for the antigen-specific detection of platelet antibodies: *Transfusion*, v. 46, p. 1226-31.
- Mikulska, J. E., L. Pablo, J. Canel, and N. E. Simister, 2000, Cloning and analysis of the gene encoding the human neonatal Fc receptor: *Eur J Immunogenet*, v. 27, p. 231-40.
- Milstein, C., 1987, Diversity and the genesis of high affinity antibodies: *Biochem Soc Trans*, v. 15, p. 779-87.
- Minchinton, R. M., B. Dawkins, L. Chynoweth, H. Pearson, J. A. Lown, and Y. Shibata, 1996, In pursuit of enigmatic platelet antibodies--anti-HPA-2b and anti-HPA-3a: *Transfus Med*, v. 6, p. 289-91.

- Mollicone, R., T. Caillard, J. Le Pendu, A. Francois, N. Sansonetti, H. Villarroja, and R. Oriol, 1988, Expression of ABH and X (Lex) antigens on platelets and lymphocytes: *Blood*, v. 71, p. 1113-9.
- Morel-Kopp, M. C., L. Daviet, J. McGregor, and C. Kaplan, 1996, Drawbacks of the MAIPA technique in characterising human antiplatelet antibodies: *Blood Coagul Fibrinolysis*, v. 7, p. 144-6.
- Mueller-Eckhardt, C., 1986, Post-transfusion purpura: *Br J Haematol*, v. 64, p. 419-24.
- Mueller-Eckhardt, C., 1990, Platelet Allo- and Autoantigens and their clinical Implications: In: Nance SJ, ed. *Transfusion Medicine in the 1990's*, v. Arlington, Va: American Association of Blood Banks, p. 63-93.
- Mueller-Eckhardt, C., and V. Kiefel, 1988, High-dose IgG for post-transfusion purpura-revisited: *Blut*, v. 57, p. 163-7.
- Mueller-Eckhardt, C., V. Kiefel, A. Grubert, H. Kroll, M. Weisheit, S. Schmidt, G. Mueller-Eckhardt, and S. Santoso, 1989, 348 cases of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia: *Lancet*, v. 1, p. 363-6.
- Mueller-Eckhardt, G., M. Hauck, W. Kayser, and C. Mueller-Eckhardt, 1980, HLA--C antigens on platelets: *Tissue Antigens*, v. 16, p. 91-4.
- Muller, J. Y., M. F. Reznikoff-Etievant, C. Patereau, C. Dangu, and N. Chesnel, 1985, [Neonatal alloimmune thrombopenia. Clinical and biological study of 84 cases]: *Presse Med*, v. 14, p. 83-6.
- Murphy, M. F., and J. B. Bussel, 2007, Advances in the management of alloimmune thrombocytopenia: *Br J Haematol*, v. 136, p. 366-78.
- Murphy, M. F., and L. M. Williamson, 2000, Antenatal screening for fetomaternal alloimmune thrombocytopenia: an evaluation using the criteria of the UK National Screening Committee: *Br J Haematol*, v. 111, p. 726-32.
- Myszka, D. G., 1997, Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors: *Curr Opin Biotechnol*, v. 8, p. 50-7.
- Nardi, M., S. J. Feinmark, L. Hu, Z. Li, and S. Karpatkin, 2004, Complement-independent Ab-induced peroxide lysis of platelets requires 12-lipoxygenase and a platelet NADPH oxidase pathway: *J Clin Invest*, v. 113, p. 973-80.
- Nardi, M., S. Tomlinson, M. A. Greco, and S. Karpatkin, 2001, Complement-independent, peroxide-induced antibody lysis of platelets in HIV-1-related immune thrombocytopenia: *Cell*, v. 106, p. 551-61.
- Nauck, M. S., H. Gierens, M. A. Nauck, W. Marz, and H. Wieland, 1999, Rapid genotyping of human platelet antigen 1 (HPA-1) with fluorophore-labelled hybridization probes on the LightCycler: *Br J Haematol*, v. 105, p. 803-10.
- Nemazee, D. A., and V. L. Sato, 1982, Enhancing antibody: a novel component of the immune response: *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 79, p. 3828-32.
- Newman, P. J., R. S. Derbes, and R. H. Aster, 1989, The human platelet alloantigens, PIA1 and PIA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing: *J Clin Invest*, v. 83, p. 1778-81.
- Newman, P. J., L. S. Martin, M. A. Knipp, and R. A. Kahn, 1985, Studies on the nature of the human platelet alloantigen, PIA1: localization to a 17,000-dalton polypeptide: *Mol Immunol*, v. 22, p. 719-29.
- Nguyen, X. D., A. Dugrillon, C. Beck, M. Kerowgan, and H. Kluter, 2004, A novel method for simultaneous analysis of specific platelet antibodies: SASPA: *Br J Haematol*, v. 127, p. 552-60.
- Ni, H., P. Chen, C. M. Spring, E. Sayeh, J. W. Semple, A. H. Lazarus, R. O. Hynes, and J. Freedman, 2005, A novel murine model of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: Response to intravenous IgG therapy: *Blood*.

- Niessner, H., K. J. Clemetson, S. Panzer, C. Mueller-Eckhardt, S. Santoso, and P. Bettelheim, 1986, Acquired thrombasthenia due to GPIIb/IIIa-specific platelet autoantibodies: *Blood*, v. 68, p. 571-6.
- Nieuwenhuis, H. K., J. W. Akkerman, W. P. Houdijk, and J. J. Sixma, 1985, Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia: *Nature*, v. 318, p. 470-2.
- Niezgodka, M., J. Mikulska, M. Ugorski, J. Boratynski, and J. Lisowski, 1981, Human placental membrane receptor for IgG-I. Studies on properties and solubilization of the receptor: *Mol Immunol*, v. 18, p. 163-72.
- Novotny, V. M., R. van Doorn, M. D. Witvliet, F. H. Claas, and A. Brand, 1995, Occurrence of allogeneic HLA and non-HLA antibodies after transfusion of prestorage filtered platelets and red blood cells: a prospective study: *Blood*, v. 85, p. 1736-41.
- Nurden, A. T., 2007, Platelet membrane glycoproteins: A look back into the past and a view to the future: *Thromb Haemost*, v. 98, p. 49-54.
- Ober, R. J., C. Martinez, C. Vaccaro, J. Zhou, and E. S. Ward, 2004, Visualizing the site and dynamics of IgG salvage by the MHC class I-related receptor, FcRn: *J Immunol*, v. 172, p. 2021-9.
- Ogasawara, K., J. Ueki, M. Takenaka, and K. Furihata, 1993, Study on the expression of ABH antigens on platelets: *Blood*, v. 82, p. 993-9.
- Okumura, I., C. Lombart, and G. A. Jamieson, 1976, Platelet glycolalicin. II. Purification and characterization: *J Biol Chem*, v. 251, p. 5950-5.
- Panzer, S., 2001, Report on the Tenth International Platelet Genotyping and Serology Workshop on behalf of the International Society of Blood Transfusion: *Vox Sang*, v. 80, p. 72-8.
- Pappalardo, P. A., A. R. Secord, P. Quitevis, M. D. Haimowitz, and D. Goldfinger, 2001, Platelet transfusion refractoriness associated with HPA-1a (PI(A1)) alloantibody without coexistent HLA antibodies successfully treated with antigen-negative platelet transfusions: *Transfusion*, v. 41, p. 984-7.
- Patil, S., D. K. Newman, and P. J. Newman, 2001, Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 serves as an inhibitory receptor that modulates platelet responses to collagen: *Blood*, v. 97, p. 1727-32.
- Peerschke, E. I., W. Yin, S. E. Grigg, and B. Ghebrehiwet, 2006, Blood platelets activate the classical pathway of human complement: *J Thromb Haemost*, v. 4, p. 2035-42.
- Peppard, J. V., L. E. Jackson, and N. M. Mackenzie, 1985, Comparison of in vitro binding to enterocyte brush borders of rat IgG subclasses and their transmission in vivo in the rat: *Immunology*, v. 56, p. 51-5.
- Peterson, J. A., S. M. Balthazor, B. R. Curtis, J. G. McFarland, and R. H. Aster, 2005, Maternal alloimmunization against the rare platelet-specific antigen HPA-9b (Max a) is an important cause of neonatal alloimmune thrombocytopenia: *Transfusion*, v. 45, p. 1487-95.
- Peterson, J. A., G. P. Visentin, P. J. Newman, and R. H. Aster, 1998, A recombinant soluble form of the integrin alpha IIb beta 3 (GPIIb-IIIa) assumes an active, ligand-binding conformation and is recognized by GPIIb-IIIa-specific monoclonal, allo-, auto-, and drug-dependent platelet antibodies: *Blood*, v. 92, p. 2053-63.
- Peyruchaud, O., A. Nurden, and F. Bourre, 1995, Non-radioactive SSCP for genotyping human platelet alloantigens: *Br J Haematol*, v. 89, p. 633-6.
- Poncz, M., R. Eisman, R. Heidenreich, S. M. Silver, G. Vilaire, S. Surrey, E. Schwartz, and J. S. Bennett, 1987, Structure of the platelet membrane glycoprotein IIb. Homology to the alpha subunits of the vitronectin and fibronectin membrane receptors: *J Biol Chem*, v. 262, p. 8476-82.

- Proulx, C., P. Chartrand, V. Roy, M. Goldman, F. Decary, and A. Rinfret, 1997, Human monoclonal Fab fragments recovered from a combinatorial library bind specifically to the platelet HPA-1a alloantigen on glycoprotein IIb-IIIa: *Vox Sang*, v. 72, p. 52-60.
- Proulx, C., M. Filion, M. Goldman, A. Bradley, D. Devine, F. Decary, and P. Chartrand, 1994, Analysis of immunoglobulin class, IgG subclass and titre of HPA-1a antibodies in alloimmunized mothers giving birth to babies with or without neonatal alloimmune thrombocytopenia: *Br J Haematol*, v. 87, p. 813-7.
- Pytela, R., M. D. Pierschbacher, M. H. Ginsberg, E. F. Plow, and E. Ruoslahti, 1986, Platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa: member of a family of Arg-Gly-Asp--specific adhesion receptors: *Science*, v. 231, p. 1559-62.
- Raghavan, M., V. R. Bonagura, S. L. Morrison, and P. J. Bjorkman, 1995, Analysis of the pH dependence of the neonatal Fc receptor/immunoglobulin G interaction using antibody and receptor variants: *Biochemistry*, v. 34, p. 14649-57.
- Randen, I., K. Sorensen, M. K. Killie, and J. Kjeldsen-Kragh, 2003, Rapid and reliable genotyping of human platelet antigen (HPA)-1, -2, -3, -4, and -5 a/b and Gov a/b by melting curve analysis: *Transfusion*, v. 43, p. 445-50.
- Rebulla, P., 2005, A mini-review on platelet refractoriness: *Haematologica*, v. 90, p. 247-53.
- Reid, M. E., 2003, Applications of DNA-based assays in blood group antigen and antibody identification: *Transfusion*, v. 43, p. 1748-57.
- Reznikoff-Etievant, M. F., C. Kaplan, J. Y. Muller, F. Daffos, and F. Forestier, 1988, Allo-immune thrombocytopenias, definition of a group at risk; a prospective study: *Curr Stud Hematol Blood Transfus*, p. 119-24.
- Riegert, P., V. Wanner, and S. Bahram, 1998, Genomics, isoforms, expression, and phylogeny of the MHC class I-related MR1 gene: *J Immunol*, v. 161, p. 4066-77.
- Rodewald, R., D. M. Lewis, and J. P. Kraehenbuhl, 1983, Immunoglobulin G receptors of intestinal brush borders from neonatal rats: *Ciba Found Symp*, v. 95, p. 287-99.
- Rolih, S. D., 1989, High-titer, low-avidity (HTLA) antibodies and antigens: a review: *Transfus Med Rev*, v. 3, p. 128-39.
- Roopenian, D. C., G. J. Christianson, T. J. Sproule, A. C. Brown, S. Akilesh, N. Jung, S. Petkova, L. Avanesian, E. Y. Choi, D. J. Shaffer, P. A. Eden, and C. L. Anderson, 2003, The MHC class I-like IgG receptor controls perinatal IgG transport, IgG homeostasis, and fate of IgG-Fc-coupled drugs: *J Immunol*, v. 170, p. 3528-33.
- Roos, A., and M. R. Daha, 2002, Antibody-mediated activation of the classical complement pathway in xenograft rejection: *Transpl Immunol*, v. 9, p. 257-70.
- Rothwell, S. W., P. Maglasang, T. J. Reid, M. Gorogias, and C. Krishnamurti, 2000, Correlation of in vivo and in vitro functions of fresh and stored human platelets: *Transfusion*, v. 40, p. 988-93.
- Rubinstein, E., I. Urso, C. Boucheix, and R. C. Carroll, 1992, Platelet activation by cross-linking HLA class I molecules and Fc receptor: *Blood*, v. 79, p. 2901-8.
- Ruggeri, Z. M., and T. S. Zimmerman, 1987, von Willebrand factor and von Willebrand disease: *Blood*, v. 70, p. 895-904.
- Ruoslahti, E., and M. D. Pierschbacher, 1987, New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins: *Science*, v. 238, p. 491-7.
- Sablitzky, F., G. Wildner, and K. Rajewsky, 1985, Somatic mutation and clonal expansion of B cells in an antigen-driven immune response: *Embo J*, v. 4, p. 345-50.
- Sabol, S. Z., S. Hu, and D. Hamer, 1998, A functional polymorphism in the monoamine oxidase A gene promoter: *Hum Genet*, v. 103, p. 273-9.
- Sachs, U. J., I. Socher, C. G. Braeunlich, H. Kroll, G. Bein, and S. Santoso, 2006, A variable number of tandem repeats polymorphism influences the transcriptional activity of the neonatal Fc receptor alpha-chain promoter: *Immunology*, v. 119, p. 83-9.
- Sakiyama, T., J. C. Robinson, and J. Y. Chou, 1979, Characterization of alkaline phosphatases from human first trimester placentas: *J Biol Chem*, v. 254, p. 935-8.

- Santoso, S., 2001, Platelet polymorphisms in thrombotic disorders: *Transfus Clin Biol*, v. 8, p. 261-6.
- Santoso, S., J. Amrhein, H. A. Hofmann, U. J. Sachs, M. M. Walka, H. Kroll, and V. Kiefel, 1999, A point mutation Thr(799)Met on the alpha(2) integrin leads to the formation of new human platelet alloantigen Sit(a) and affects collagen-induced aggregation: *Blood*, v. 94, p. 4103-11.
- Santoso, S., R. Kalb, V. Kiefel, and C. Mueller-Eckhardt, 1993a, The presence of messenger RNA for HLA class I in human platelets and its capability for protein biosynthesis: *Br J Haematol*, v. 84, p. 451-6.
- Santoso, S., R. Kalb, M. Walka, V. Kiefel, C. Mueller-Eckhardt, and P. J. Newman, 1993b, The human platelet alloantigens Br(a) and Brb are associated with a single amino acid polymorphism on glycoprotein Ia (integrin subunit alpha 2): *J Clin Invest*, v. 92, p. 2427-32.
- Santoso, S., and V. Kiefel, 2001, Human platelet alloantigens: *Wien Klin Wochenschr*, v. 113, p. 806-13.
- Santoso, S., V. Kiefel, and C. Mueller-Eckhardt, 1989, Human platelet alloantigens Bra/Brb are expressed on the very late activation antigen 2 (VLA-2) of T lymphocytes: *Hum Immunol*, v. 25, p. 237-46.
- Santoso, S., V. Kiefel, and C. Mueller-Eckhardt, 1991, Blood group A and B determinants are expressed on platelet glycoproteins IIa, IIIa, and Ib: *Thromb Haemost*, v. 65, p. 196-201.
- Santoso, S., V. Kiefel, I. G. Richter, U. J. Sachs, A. Rahman, B. Carl, and H. Kroll, 2002, A functional platelet fibrinogen receptor with a deletion in the cysteine-rich repeat region of the beta(3) integrin: the Oe(a) alloantigen in neonatal alloimmune thrombocytopenia: *Blood*, v. 99, p. 1205-14.
- Santoso, S., H. Kroll, C. L. Andrei-Selmer, **I. Socher**, A. Rankin, E. Kretzschmar, N. A. Watkins, and W. H. Ouwehand, 2006, A naturally occurring LeuVal mutation in beta3-integrin impairs the HPA-1a epitope: the third allele of HPA-1: *Transfusion*, v. 46, p. 790-9.
- Santoso, S., and T. Kunicki, 2001, Platelet receptor polymorphisms and thrombotic risk: *Ital Heart J*, v. 2, p. 811-5.
- Santoso, S., J. Lohmeyer, H. Rennich, K. J. Clemetson, and C. Mueller-Eckhardt, 1984, Platelet surface antigens: analysis by monoclonal antibodies. I. Antibodies. I. Immunological and biochemical studies: *Blut*, v. 48, p. 161-70.
- Santoso, S., G. Mueller-Eckhardt, V. Kiefel, and C. Mueller-Eckhardt, 1986, HLA antigens on platelet membranes. In vitro and in vivo studies: *Vox Sang*, v. 51, p. 327-33.
- Santoso, S., S. Santoso, and C. Mueller-Eckhardt, 1993c, PECAM is the major glycoprotein carrying blood group antigens: *Thromb Haemost*, v. 69, p. 1191a.
- Schneider, W., and M. Schnaidt, 1981, The platelet adhesion immunofluorescence test: a modification of the platelet suspension immunofluorescence test: *Blut*, v. 43, p. 389-92.
- Schreiber, A. D., D. B. Cines, C. Zmijewski, and R. W. Colman, 1979, Effect of anti-P1A1 antibody on human platelets. II. Mechanism of the complement-dependent release reaction: *Blood*, v. 53, p. 578-87.
- Shattil, S. J., H. Kashiwagi, and N. Pampori, 1998, Integrin signaling: the platelet paradigm: *Blood*, v. 91, p. 2645-57.
- Shattil, S. J., and P. J. Newman, 2004, Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets: *Blood*, v. 104, p. 1606-15.
- Shih, M. C., T. C. Liu, I. L. Lin, S. F. Lin, C. M. Chen, and J. G. Chang, 2003, Gene frequencies of the HPA-1 to HPA-13, Oe and Gov platelet antigen alleles in Taiwanese, Indonesian, Filipino and Thai populations: *Int J Mol Med*, v. 12, p. 609-14.

- Shulman, N. R., R. H. Aster, A. Leitner, and M. C. Hiller, 1961, Immunoreactions Involving Platelets. V. Post-Transfusion Purpura Due to a Complement-Fixing Antibody against a Genetically Controlled Platelet Antigen. A Proposed Mechanism for Thrombocytopenia and Its Relevance in "Autoimmunity": *J Clin Invest*, v. 40, p. 1597-620.
- Shulman, N. R., V. J. Marder, M. C. Hiller, and E. M. Collier, 1964, Platelet and Leukocyte Isoantigens and Their Antibodies: Serologic Physiologic and Clinical Studies: *Prog Hematol*, v. 27, p. 222-304.
- Simister, N. E., and K. E. Mostov, 1989, An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens: *Nature*, v. 337, p. 184-7.
- Simister, N. E., and A. R. Rees, 1985, Isolation and characterization of an Fc receptor from neonatal rat small intestine: *Eur J Immunol*, v. 15, p. 733-8.
- Simister, N. E., and C. M. Story, 1997, Human placental Fc receptors and the transmission of antibodies from mother to fetus: *J Reprod Immunol*, v. 37, p. 1-23.
- Simister, N. E., C. M. Story, H. L. Chen, and J. S. Hunt, 1996, An IgG-transporting Fc receptor expressed in the syncytiotrophoblast of human placenta: *Eur J Immunol*, v. 26, p. 1527-31.
- Simsek, S., N. M. Faber, P. M. Bleeker, A. B. Vlekke, E. Huiskes, R. Goldschmeding, and A. E. von dem Borne, 1993, Determination of human platelet antigen frequencies in the Dutch population by immunophenotyping and DNA (allele-specific restriction enzyme) analysis: *Blood*, v. 81, p. 835-40.
- Sirotkina, O. V., A. M. Sheidina, T. V. Vavilova, and E. I. Shvarts, 2005, [Novel mutation of the GPIIIa gene in the Russian population, Leu40Arg, linked to the Leu33Pro]: *Genetika*, v. 41, p. 838-43.
- Siskind, G. W., and H. N. Eisen, 1965, Effect of variation in antibody-hapten association constant upon the biologic activity of the antibody: *J Immunol*, v. 95, p. 436-41.
- Skogen, B., D. B. Bellissimo, M. J. Hessner, S. Santoso, R. H. Aster, P. J. Newman, and J. G. McFarland, 1994, Rapid determination of platelet alloantigen genotypes by polymerase chain reaction using allele-specific primers: *Transfusion*, v. 34, p. 955-60.
- Socher, I.**, H. Kroll, and S. Santoso, 2006, Heterogeneity of platelet alloantigens and alloantibodies: new insights into structure and function: *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, v. 33, p. 244-253.
- Socher, I.**, C. Zwingel, S. Santoso, and H. Kroll, 2007, accepted for publication in *Transfusion*, 14.08.2007, Heterogeneity of HPA-3 alloantibodies: Consequences for the diagnosis of alloimmune thrombocytopenic syndromes.: *Transfusion*.
- Spencer, J. A., and R. F. Burrows, 2001, Feto-maternal alloimmune thrombocytopenia: a literature review and statistical analysis: *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, v. 41, p. 45-55.
- Spiegelberg, H. L., and B. G. Fishkin, 1972, The catabolism of human G immunoglobulins of different heavy chain subclasses. 3. The catabolism of heavy chain disease proteins and of Fc fragments of myeloma proteins: *Clin Exp Immunol*, v. 10, p. 599-607.
- Spiekermann, G. M., P. W. Finn, E. S. Ward, J. Dumont, B. L. Dickinson, R. S. Blumberg, and W. I. Lencer, 2002, Receptor-mediated immunoglobulin G transport across mucosal barriers in adult life: functional expression of FcRn in the mammalian lung: *J Exp Med*, v. 196, p. 303-10.
- Stachecki, B., Z. Mrowiec, M. Olszewska, A. Dzieciatkowska, and W. Fenrych, 1991, [Sialic acid level in blood platelets after cryopreservation with DMSO]: *Acta Haematol Pol*, v. 22, p. 271-8.
- Steiner, M., and S. Vancura, 1985, Asymmetrical loss of sialic acid from membrane glycoproteins during platelet aging: *Thromb Res*, v. 40, p. 465-71.
- Stockelberg, D., M. Hou, L. Rydberg, J. Kutti, and H. Wadenvik, 1996, Evidence for an expression of blood group A antigen on platelet glycoproteins IV and V: *Transfus Med*, v. 6, p. 243-8.

- Sturk, A., L. M. Burt, T. Hakvoort, J. W. ten Cate, and N. Crawford, 1982, The effect of storage on platelet morphology: *Transfusion*, v. 22, p. 115-20.
- Taaning, E., 2000, HLA antibodies and fetomaternal alloimmune thrombocytopenia: myth or meaningful?: *Transfus Med Rev*, v. 14, p. 275-80.
- Taaning, E., N. Morling, H. Ovesen, and A. Svejgaard, 1985, Post transfusion purpura and anti-Zwb (-PIA2): *Tissue Antigens*, v. 26, p. 143-6.
- Taaning, E., and F. Tonnesen, 1999, Pan-reactive platelet antibodies in post-transfusion purpura: *Vox Sang*, v. 76, p. 120-3.
- Takagi, J., B. M. Petre, T. Walz, and T. A. Springer, 2002, Global conformational rearrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling: *Cell*, v. 110, p. 599-11.
- Take, H., Y. Tomiyama, Y. Shibata, T. Furubayashi, S. Honda, H. Mizutani, T. Nishiura, T. Tsubakio, Y. Kurata, T. Yonezawa, and et al., 1990, Demonstration of the heterogeneity of epitopes of the platelet-specific alloantigen, Baka: *Br J Haematol*, v. 76, p. 395-400.
- Tanaka, S., A. Taniue, N. Nagao, S. Ohnoki, H. Shibata, Y. Okubo, and H. Yamaguchi, 1995, Simultaneous DNA typing of human platelet antigens 2, 3 and 4 by an allele-specific PCR method: *Vox Sang*, v. 68, p. 225-30.
- Tholouli, E., C. R. Hay, P. O'Gorman, and M. Makris, 2004, Acquired Glanzmann's thrombasthenia without thrombocytopenia: a severe acquired autoimmune bleeding disorder: *Br J Haematol*, v. 127, p. 209-13.
- Tovar, D., J. C. Faye, and G. Favre, 2003, Cloning of the human RHOB gene promoter: characterization of a VNTR sequence that affects transcriptional activity: *Genomics*, v. 81, p. 525-30.
- Tsubakio, T., P. Tani, J. G. Curd, and R. McMillan, 1986, Complement activation in vitro by antiplatelet antibodies in chronic immune thrombocytopenic purpura: *Br J Haematol*, v. 63, p. 293-300.
- Ueyama, H., M. Niwa, T. Tada, M. Sasaki, and I. Ohkubo, 1991, Cloning and nucleotide sequence of a human Zn-alpha 2-glycoprotein cDNA and chromosomal assignment of its gene: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 177, p. 696-703.
- Vaisocherova, H., A. Zitova, M. Lachmanova, J. Stepanek, S. Kralikova, R. Liboska, D. Rejman, I. Rosenberg, and J. Homola, 2006, Investigating oligonucleotide hybridization at subnanomolar level by surface plasmon resonance biosensor method: *Biopolymers*, v. 82, p. 394-8.
- Valentin, N., G. P. Visentin, and P. J. Newman, 1995, Involvement of the cysteine-rich domain of glycoprotein IIIa in the expression of the human platelet alloantigen, PIA1: evidence for heterogeneity in the humoral response: *Blood*, v. 85, p. 3028-33.
- van der Meulen, J. A., T. C. McNabb, N. Haeffner-Cavaillon, M. Klein, and K. J. Dorrington, 1980, The Fc gamma receptor on human placental plasma membrane. I. Studies on the binding of homologous and heterologous immunoglobulin G1: *J Immunol*, v. 124, p. 500-7.
- van Leeuwen, E. F., O. C. Leeksma, J. A. van Mourik, C. P. Engelfriet, and A. E. von dem Borne, 1984, Effect of the binding of anti-Zwa antibodies on platelet function: *Vox Sang*, v. 47, p. 280-9.
- van Leeuwen, E. F., A. E. von dem Borne, L. E. von Riesz, L. E. Nijenhuis, and C. P. Engelfriet, 1981, Absence of platelet-specific alloantigens in Glanzmann's thrombasthenia: *Blood*, v. 57, p. 49-54.
- Vance, B. A., T. W. Huizinga, K. Wardwell, and P. M. Guyre, 1993, Binding of monomeric human IgG defines an expression polymorphism of Fc gamma RIII on large granular lymphocyte/natural killer cells: *J Immunol*, v. 151, p. 6429-39.

- Vijayan, K. V., P. J. Goldschmidt-Clermont, C. Roos, and P. F. Bray, 2000, The PI(A2) polymorphism of integrin beta(3) enhances outside-in signaling and adhesive functions: *J Clin Invest*, v. 105, p. 793-802.
- von dem Borne, A. E., and F. Decary, 1990, ICSH/ISBT Working Party on platelet serology. Nomenclature of platelet-specific antigens: *Vox Sang*, v. 58, p. 176.
- von dem Borne, A. E., F. W. Verheugt, F. Oosterhof, E. von Riesz, A. B. de la Riviere, and C. P. Engelfriet, 1978, A simple immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies: *Br J Haematol*, v. 39, p. 195-207.
- Vorchheimer, D. A., J. J. Badimon, and V. Fuster, 1999, Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists in cardiovascular disease: *Jama*, v. 281, p. 1407-14.
- Wainwright, S. D., and C. H. Holmes, 1993, Distribution of Fc gamma receptors on trophoblast during human placental development: an immunohistochemical and immunoblotting study: *Immunology*, v. 80, p. 343-51.
- Wallace, K. H., and A. R. Rees, 1980, Studies on the immunoglobulin-G Fc-fragment receptor from neonatal rat small intestine: *Biochem J*, v. 188, p. 9-16.
- Ward, E. S., J. Zhou, V. Ghetie, and R. J. Ober, 2003, Evidence to support the cellular mechanism involved in serum IgG homeostasis in humans: *Int Immunol*, v. 15, p. 187-95.
- Warkentin, T. E., and J. W. Smith, 1997, The alloimmune thrombocytopenic syndromes: *Transfus Med Rev*, v. 11, p. 296-307.
- Warmerdam, P. A., I. E. van den Herik-Oudijk, P. W. Parren, N. A. Westerdaal, J. G. van de Winkel, and P. J. Capel, 1993, Interaction of a human Fc gamma RIIb1 (CD32) isoform with murine and human IgG subclasses: *Int Immunol*, v. 5, p. 239-47.
- Watabe, H., J. I. Gitlin, and D. Gitlin, 1980, Further characterization of IgG receptors from human placenta: *J Biochem (Tokyo)*, v. 87, p. 393-7.
- Watkins, N. A., E. Schaffner-Reckinger, D. L. Allen, G. J. Howkins, N. H. Brons, G. A. Smith, P. Metcalfe, M. F. Murphy, N. Kieffer, and W. H. Ouwehand, 2002a, HPA-1a phenotype-genotype discrepancy reveals a naturally occurring Arg93Gln substitution in the platelet beta 3 integrin that disrupts the HPA-1a epitope: *Blood*, v. 99, p. 1833-9.
- Watkins, N. A., P. A. Smethurst, D. Allen, G. A. Smith, and W. H. Ouwehand, 2002b, Platelet alphaIIb beta3 recombinant autoantibodies from the B-cell repertoire of a post-transfusion purpura patient: *Br J Haematol*, v. 116, p. 677-85.
- Wautier, J. L., B. Boizard, B. Lecharny, P. Hautefeuille, and J. P. Caen, 1984, [Posttransfusion purpura: identification of a new platelet antigen Leka. A case]: *Presse Med*, v. 13, p. 657-60.
- Weigert, M. G., I. M. Cesari, S. J. Yonkovich, and M. Cohn, 1970, Variability in the lambda light chain sequences of mouse antibody: *Nature*, v. 228, p. 1045-7.
- Weiss, E. J., P. F. Bray, M. Tayback, S. P. Schulman, T. S. Kickler, L. C. Becker, J. L. Weiss, G. Gerstenblith, and P. J. Goldschmidt-Clermont, 1996, A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis: *N Engl J Med*, v. 334, p. 1090-4.
- Williamson, L., H. Cohen, E. Love, H. Jones, A. Todd, and K. Soldan, 2000, The Serious Hazards of Transfusion (SHOT) initiative: the UK approach to haemovigilance: *Vox Sang*, v. 78 Suppl 2, p. 291-5.
- Williamson, L. M., G. Hackett, J. Rennie, C. R. Palmer, C. Maciver, R. Hadfield, D. Hughes, S. Jobson, and W. H. Ouwehand, 1998, The natural history of fetomaternal alloimmunization to the platelet-specific antigen HPA-1a (PIA1, Zwa) as determined by antenatal screening: *Blood*, v. 92, p. 2280-7.
- Winokur, R., and J. H. Hartwig, 1995, Mechanism of shape change in chilled human platelets: *Blood*, v. 85, p. 1796-804.

- Wu, S., K. Maslanka, and J. Gorski, 1997, An integrin polymorphism that defines reactivity with alloantibodies generates an anchor for MHC class II peptide binding: a model for unidirectional alloimmune responses: *J Immunol*, v. 158, p. 3221-6.
- Xiao, T., J. Takagi, B. S. Coller, J. H. Wang, and T. A. Springer, 2004, Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics: *Nature*, v. 432, p. 59-67.
- Xiong, J. P., T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D. L. Scott, A. Joachimiak, S. L. Goodman, and M. A. Arnaout, 2001, Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3: *Science*, v. 294, p. 339-45.
- Xiong, J. P., T. Stehle, S. L. Goodman, and M. A. Arnaout, 2003, New insights into the structural basis of integrin activation: *Blood*, v. 102, p. 1155-9.
- Xiong, J. P., T. Stehle, S. L. Goodman, and M. A. Arnaout, 2004, A novel adaptation of the integrin PSI domain revealed from its crystal structure: *J Biol Chem*, v. 279, p. 40252-4.
- Yamaguchi, H., M. Hirai, Y. Kurosawa, and K. Hashimoto, 1997, A highly conserved major histocompatibility complex class I-related gene in mammals: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 238, p. 697-702.
- Yang, Y. Y., P. Fischer, S. J. Leu, M. Zhu, V. L. Woods, Jr., and P. P. Chen, 1999, Possible presence of enhancing antibodies in idiopathic thrombocytopenic purpura: *Br J Haematol*, v. 104, p. 69-80.
- Yurugi, K., S. Kimura, E. Ashihara, H. Tsuji, A. Kawata, Y. Kamitsuji, R. Hishida, M. Takegawa, H. Egawa, and T. Maekawa, 2007, Rapid and accurate measurement of anti-A/B IgG antibody in ABO-unmatched living donor liver transplantation by surface plasmon resonance: *Transfus Med*, v. 17, p. 97-106.
- Zahavi, J., and V. J. Marder, 1974, Acquired "storage pool disease" of platelets associated with circulating antiplatelet antibodies: *Am J Med*, v. 56, p. 883-90.
- Zhu, X., G. Meng, B. L. Dickinson, X. Li, E. Mizoguchi, L. Miao, Y. Wang, C. Robert, B. Wu, P. D. Smith, W. I. Lencer, and R. S. Blumberg, 2001, MHC class I-related neonatal Fc receptor for IgG is functionally expressed in monocytes, intestinal macrophages, and dendritic cells: *J Immunol*, v. 166, p. 3266-76.

9 Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

Abb.	Abbildung
ACD	Acid citrate dextrose
ACE	Antigen-specific capture assay
ADP	Adenosindiphosphat
AG-AK	Antigen-Antikörper Komplex
AITP	Autoimmunthrombozytopenie
APC	Antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäure
Ass	Assoziation
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
CD	Cluster of differentiation
C1	Komplementkomponente C1
CHO	Chinese hamster ovary
COS	Cercopithecus aethiops
Cys	Cystein
d	Tag
DC	Dendritische Zelle
Diss	Dissoziation
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP`s	Desoxynukleotid-triphosphate
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FcRn	neonataler Fc Rezeptor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanate
FKS	fötales Kälberserum
FNAIT	Fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

GB	Gastrointestinalblutung
Gln	Glutamin
GP	Glykoprotein
GPI	Glycophosphatidylinositol
h	Stunden
H	Heavy chain
HB	Hautblutung
HBK	Hammelblutkörperchen
HIV	Human immune deficiency virus
HNK	Hämolytische Neugeborenenenerkrankung
HLA	Human leucocyte antigen
HPA	Human platelet antigen
HSNP	Human single nucleotide polymorphism
ICH	Intracranial haemorrhage
Ig	Immunglobulin
Ile	Isoleucin
IUTT	Intrauterine Thrombozytentransfusion
IV	Intravenös
Ko	Kontrolle
L	Light chain
L, Leu	Leucin
MACE	Monoclonal antibody specific capture assay
MAIPA	Monoclonal antibody immobilisation of platelet antigens
mAK	monoklonaler Antikörper
MEM	Minimal essential medium
MFI	Mean fluorescence intensity
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minuten
MKBR	Mikrokomplementbindungsreaktion
Mr	Molekulargewicht
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
Neu	Neuraminidase
NHS-LC	N-Hydroxy-Succinimido LC
NHS	Humanes Normalserum

NK	Negative Kontrolle
NOD/SCID	Nonobese diabetic/immune-deficient
PAIFT	Plättchen-Adhäsions-Immunfluoreszenztest
PaIgG	Plättchen-assoziiertes IgG
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PGE1	Prostaglandin E1
PI	Phosphoinositol
PK	Positive Kontrolle
PLAP	Plazentare alkalische Phosphatase
PO	Peroxidase
PP	Polypropylen
PPP	Platelet poor plasma
Pro	Prolin
PRP	Plättchenreiches Plasma
PSI	Plexine, Semaphorine, Integrine
PTP	Posttransfusionelle Purpura
PTR	Platelet Transfusion Refractoriness
R	Rückwärts
R, Arg	Arginin
RES	Retikuloendoplasmatisches System
RFLP	Restriction fragment length polymorphism
rhu	rekombinant human
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RU	Resonance Units
s	Sekunden
s.	siehe
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin
SPR	Surface plasmon resonance
SS	Schwangerschaft
SSP	Sequence-specific primer
SSW	Schwangerschaftswoche

STABW	Standardabweichung
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Vorwärts
V, Val	Valin
VNTR	Variable number of tandem repeats
Vs.	Versus
WGA	Wheat-Germ-Agglutin

10 Anhang

Tab. 10.1: Seren von FNAIT und PTP Patienten mit anti-HPA-1a, -1b, -3a, -3b und AITP Patienten mit anti- α IIb β 3.

Antikörperspezifität	Nummer	Herkunft	Antikörperspezifität	Nummer	Herkunft
<i>Val33-Studie</i>					
HPA-1a	12422/03	FNAIT	HPA-1a	124292/99	FNAIT
	13956/04	FNAIT		6712/01	FNAIT
	11934/02	FNAIT		5964/01	FNAIT
	14497/04	FNAIT		29121/81	FNAIT
	11114/04	FNAIT		95667/94	FNAIT
	9767/02	FNAIT		80625/91	FNAIT
	10054/02	FNAIT		3042/00	FNAIT
	122518/99	FNAIT		304/00	FNAIT
	124184/99	FNAIT		121935/99	FNAIT
	10777/03	FNAIT		96303/94	FNAIT
	12746/03	FNAIT		N001*	FNAIT
	36669/82	FNAIT		N002*	FNAIT
	7048/01	FNAIT		N003*	FNAIT
	7579/02	FNAIT		N004*	FNAIT
	8230/02	FNAIT		N005*	FNAIT
	8720/02	FNAIT		N006*	FNAIT
	9292/02	FNAIT		N007*	FNAIT
	122427/99	FNAIT		N008*	FNAIT
	122963/99	FNAIT		N009*	FNAIT
	4739/01	FNAIT		N010*	FNAIT
	179/00	FNAIT		N011*	FNAIT
	4515/01	FNAIT		N013*	FNAIT
	3103/00	FNAIT		N014*	FNAIT
	122211/99	FNAIT		N015*	FNAIT
				N016*	FNAIT
HPA-1a	42900/83	PTP			
	43799/83	PTP			
	49176/85	PTP			
	51828/88	PTP			
<i>SPR-Analyse, MKBR, NOD/SCID Mausmodell</i>					
HPA-1a	19206/06	FNAIT		11664/03	FNAIT
	80625/91	FNAIT		19058/06	FNAIT
	17851/05	FNAIT		119152/98	FNAIT

	36669/82	FNAIT		15265/04	FNAIT
	3101/01	FNAIT		16394/05	FNAIT
	12746/03	FNAIT		10634/02	FNAIT
	18823/05	FNAIT		15755/04	FNAIT
	16304/05	FNAIT	HPA-1b	106714/95	FNAIT
	12422/03	FNAIT	HPA-1a	19466/06**	PTP
	20534/06	FNAIT		37691/82	PTP
	96389/94	FNAIT		45101/01	PTP
	14963/04	FNAIT		31592/81	PTP
	122429/99	FNAIT		Patient W***	PTP
	6712/01	FNAIT	α IIb β 3	16514/05	ITP
	5429/01	FNAIT			
<i>Anti-HPA-3 Studie</i>					
HPA-3a	87795/92	FNAIT	HPA-3a	114827/97 11490/97	FNAIT
	82813/91	FNAIT		4099/01	FNAIT
	110457/96	FNAIT		12430/03 15662/04	FNAIT
	10886/03	FNAIT		16540/05***** 17454/05*****	FNAIT
	1256/00	FNAIT		70772/89	PTP
	99433/94	FNAIT	HPA-3b	16746/05*****	FNAIT
	73101/89	FNAIT		59681/87	PTP

* Department of Haematology, University of Cambridge and National Blood Service, Cambridge, UK

** Institut für Transfusionsmedizin, Rostock

*** Blood Research Institute, Wisconsin, Milwaukee, USA

**** University Clinic for Blood Group Serology and Transfusion Medicine, Graz, Österreich

***** Saitama Red Cross Blood Center, Saitama, Japan

Tab. 10.2: Identifikationsnummern der DNA Proben von Feten und Neugeborenen.

Intrauterin (Kollektiv I)		Neonatal (Kollektiv II)	
120069/98	5348/01	13955/04	6235/01
120362/98	5866/01	12889/03	5905/01
120407/98	6153/01	12711/03	122972/99
121224/98	6995/01	12421/03	5705/01
121594/98	7149/01	12075/03	5665/01
121453/98	7357/02	11933/01	5428/01
121681/98	7495/02	11663/03	5457/01
121614/98	8183/02	11151/03	5380/01
121812/98	8276/02	11075/03	5049/01
123552/99	8818/02	10794/03	5021/01
123285/99	8821/02	10776/03	4738/01
123523/99	9106/02	10563/02	4659/01
124148/99	9322/02	10053/02	3904/01
123553/99	9697/02	9766/02	3648/01
125110/99	10640/02	9615/02	12725/03
125111/99	11027/03	9347/02	1544/00
125525/99	11103/03	9291/02	3102/00
1187/00	11167/03	9120/02	178/00
1076/00	11555/03	8719/02	1356/00
1433/00	12044/03	8264/02	3031/00
1891/00	12564/03	8229/02	579/00
1956/00	12862/03	7969/02	1285/00
2328/00	13532/03	7955/02	2710/00
4555/01	14057/04	7578/02	
4601/01	14339/04	7047/01	
4904/01	15327/04	6737/01	
4990/01	15330/04	6711/01	

Klinische Falldokumentation von zwei HPA-1a negativen FNAIT Müttern***FNAIT Mutter 1:***

In erster Para hat die 23-jährige Mutter ihr Kind in der 41. Schwangerschaftswoche (SSW) entbunden (w, 2900 g, Apgar 9/10/10). Zwei Tage nach der Geburt ist die Plättchenzahl auf $4 \cdot 10^9/L$ gefallen und Petechien manifestierten sich als Folge der Thrombozytopenie. Die Transfusion eines Thrombozytenkonzentrates und die intravenöse Gabe von Immunglobulinen (IVIG) führten nicht zu einem Anstieg der Thrombozytenzahl. Nach Transfusion von maternalen Plättchen am Tag 4 stieg die Thrombozytenzahl auf $273 \cdot 10^9/l$ an. Computer Tomographie am Tag 5 diagnostizierte Zeichen einer intrauterin aufgetretenen intrakraniellen Blutung. Die Thrombozytenwerte normalisierten sich nach zweimaliger Substitution von maternalen Plättchen innerhalb von 4 Wochen. Zu dieser Zeit konnten serologisch (MAIPA Assay, PAIFT) keine Antikörper nachgewiesen werden (Fall 1.1) (s. Abb. 4.20A). Sechs Jahre später war die Mutter erneut schwanger (2. Para). Während der serologischen Untersuchung in der 34. SSW wurden nur im Plättchenadhäsions-Immunfluoreszenstest (PAIFT) schwache HPA-1a Alloantikörper detektiert (Fall 1.2). Nach Sectio in der 34+5 SSW wurde ein Neugeborenes mit schwerer Thrombozytopenie ($3 \cdot 10^9/l$) entbunden (2960g, Apgar 8/9/9). Nach sofortiger Transfusion von maternalen Plättchen stiegen die Thrombozytenwerte auf $265 \cdot 10^9/L$ an. Die Thrombozytopenie manifestierte sich in Hautblutungen, intrakranielle Blutungen wurden nicht beobachtet. Am Tag 2 und 3 wurde IVIG verabreicht. Nach erneutem Abfall der Thrombozytenzahl auf $65 \cdot 10^9/L$ wurden kompatible Spenderthrombozyten am Tag 5 transfundiert, infolge derer sich die Thrombozytenwerte normalisierten. Postnatal konnten HPA-1a Alloantikörper durch eine starke Reaktion im MAIPA Assay und PAIFT nachgewiesen werden (Fall 1.3) (s. Abb. 4.20A).

FNAIT Mutter 2:

In erster Para hat die 29-jährige Mutter ihr Neugeborenes in der 40. SSW entbunden (3245, Apgar 9/10). Postnatal bildeten sich infolge der schweren Thrombozytopenie ($2 \cdot 10^9/L$) multiple Petechien. IVIG Gabe und Transfusion eines Plättchenkonzentrates führten nicht zu einem Anstieg der Thrombozytenzahl. Nach Transfusion von drei HPA-1a negativen Plättchenkonzentraten am Tag 2, 8 und 14 und Kortikosteroidgabe stabilisierten sich die Thrombozytenwerte (Fall 2.1). Serologisch war der Antikörpernachweis negativ (PAIFT, MAIPA Assay). Zwei Jahre später war die Mutter erneut schwanger. Nach fetaler Blutentnahme in der 23. SSW konnte ein starker HPA-1a Alloantikörper im MAIPA Assay und PAIFT detektiert werden (Fall 2.2) (s. Abb. 4.20A).

LEBENS LAUF**Persönliche Daten**

Name: Ines Socher
 Anschrift: Tengstr. 32a
 80796 München
 Fon: 0176-23495917
 E-mail: ines_socher@hotmail.com
 Geburtsdatum: 04.03.1978
 Geburtsort: Rostock
 Familienstand: ledig
 Staatsangehörigkeit: deutsch

Schul Ausbildung

1984 – 1991 62. Polytechnische Oberschule, Rostock
 1991 – 1996 Ostseegymnasium, Rostock
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium

10/1996 – 01/2004 Ingenieurstudiengang Biotechnologie an der Technischen
 Universität Berlin
 Fachrichtung: Medizinische Biotechnologie
 08/99 Vordiplom
 01/2004 Diplom
 02/2002 – 12/2002 Diplomarbeit am Institut für Transfusionsmedizin, Prof. Dr.
 Abdulgabar Salama, Charité Berlin, Campus Virchow-Klinikum
 Titel: „Fluoreszenz-Partikel-Immunoassay zum Nachweis
 antithrombozytärer Antikörper im durchflusszytometrischen
 Testverfahren“
 seit 07/2004 Wissenschaftliche Angestellte zum Zweck der Promotion am Institut
 für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Arbeitsgruppe
 Immnhämatologie, Dr. rer. nat. Sentot Santoso, Prof. Dr. G. Bein,
 Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH

Gießen, den

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Gregor Bein danke ich für die Überlassung des interessanten Themas dieser Dissertation und für die Bereitstellung der besten Voraussetzungen zu deren Durchführung am Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, sowie für die Durchsicht dieser Arbeit. An dieser Stelle möchte ich mich herzlich für die Möglichkeit der Teilnahme an zahlreichen Kongressen im In- und Ausland und Fortbildungslehrgängen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Michael U. Martin danke für seine sofortige Betreuungszusage der Dissertation am Fachbereich Biologie und Chemie der Justus-Liebig Universität Gießen und die Durchsicht dieser Arbeit.

Ich danke den Betreuern dieser Dissertation Herrn Dr. Sentot Santoso und Dr. Hartmut Kroll, durch deren freundliche, kompetente wissenschaftliche Betreuung meine Arbeit unterstützt und vorangetrieben wurde. Insbesondere möchte mich für ihren fachkundigen Rat und Hilfe bei der Erstellung der wissenschaftlichen Publikationen bedanken.

Herrn Dr. Ulrich J.H. Sachs danke ich für seine stete freundliche Diskussionsbereitschaft und angenehme Zusammenarbeit.

Ich danke allen Mitarbeitern/innen des Instituts für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin für ihre Hilfsbereitschaft in praktischen und theoretischen Fragen. Mein Dank gilt insbesondere den Mitgliedern des Thrombozytenlabors: Astrid Giptner, Claudia Zwingel, Sabine Kreiling, Petra Ziegler, Sabine Mutz und der AG Immunhämatologie: Olga Eva, Heike Berghöfer, Silke Werth und Anette Zeyer. Gaby Haley danke ich für ihre erwiesene Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der TaqMan PCR und Frau Dr. Cornelia Andrei-Selmer für die kompetente Einweisung in die Oberflächenplasmonresonanz Technologie.

Den Kooperationspartnern aus dem Blood Research Institute/Milwaukee/USA (Dr. Peter J. Newman und Dr. Brian Boylan) danke ich für die gute Zusammenarbeit, vor allem Brian Boylan für die Durchführung der Tierversuche.

An dieser Stelle möchte ich mich vor allem bei Ture und all meinen Freunden bedanken, die mich durch ihren Beistand unermüdlich in meiner Arbeit motiviert und meinen Glauben an das Gelingen bestärkt haben.

Ich danke meinen Eltern für ihre unerlässliche Unterstützung jeglicher Hinsicht während meiner Promotionszeit.

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Biologie und Chemie Gießen zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Transport- und Bindungsmechanismen thrombozytärer Alloantikörper und deren Assoziation zur fetalen und neonatalen Blutungsneigung“ im Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Direktor: Prof. Dr. G. Bein, mit Unterstützung durch Dr. rer. nat. Sentot Santoso ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Vollständige oder sinngemäße Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die externe Betreuung im Fachbereich Biologie und Chemie der Justus-Liebig Universität Gießen erfolgte durch Prof. Dr. Michael U. Martin, Professur für Immunologie an der Justus-Liebig Universität Gießen.

Ich habe bisher in keinem in- oder ausländischen naturwissenschaftlichem Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

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

1. Santoso S., Kroll H., Andrei-Selmer C.L., **Socher I.** Rankin A., Kretzschmar E., Watkins N.A. (2006) A naturally occurring Leu33Val mutation in β 3-integrin impairs the HPA-1a epitope: the third allele of HPA-1. *Transfusion* 46(5):790-9
2. Sachs U.J., **Socher I.**, Braeunlich C.G., Kroll H., Bein G., Santoso S. (2006) A variable number of tandem repeats polymorphism influences the transcriptional activity of the neonatal Fc receptor alpha chain promoter. *Immunology* 119(1):83-9
3. **Socher I.**, Kroll H., Santoso S. (2006) Heterogeneity of platelet alloantigens and alloantibodies: new insights into structure and function. *Transfus Med Hemother* 33: 244-253
4. **Socher I.** Zwingel C., Santoso S., Kroll H (2007) Heterogeneity of HPA-3 alloantibodies: Consequences for the diagnosis of alloimmune thrombocytopenic syndromes. (*Manuscript accepted for publication in Transfusion, 14.08.2007*)

5. **Socher I.**, Boylan B., Andrei-Selmer C.L., Bein G., Kroll H., Newman P.J., Santoso S. (2007) Severe neonatal alloimmune thrombocytopenia caused by low-affinity anti-HPA-1a alloantibodies. *Manuscript in preparation*)

Gießen, den

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

1. 38th annual meeting of German society Transfusion Medicine and Immune Haematology, 2005, Erfurt, Germany
Socher I., Kroll H., Andrei-Selmer C., Rankin A., Kretzschmar E., Watkins N., Ouwehand W., Santoso S.
“The third allele of HPA-1: A naturally occurring Leu33Val mutation in the β 3 integrin impairs the HPA-1a epitope”
Socher I., Zwingel I., Schallmoser K., Santoso S., Kroll H.
“Heterogeneity of HPA-3 alloantibodies: Consequences for the diagnosis of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia”
2. 9th Symposium on Platelet and Granulocyte Immunobiology, 2006, Tromsø, Norwegen
Socher I., Andrei-Selmer C.L., Bein G., Kroll H., Santoso S.
“Real-time analysis of HPA-1a antigen-antibody interaction by surface plasmon resonance technology”
Socher I., Zwingel C., Schallmoser K., Hundhausen T., Santoso S., Kroll H.
“Heterogeneity of HPA-3 alloantibodies: Consequences for the diagnosis of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia”
3. 39th annual meeting of German society Transfusion Medicine and Immune Haematology, 2006, Frankfurt, Germany
Socher I., Andrei-Selmer C.L., Bein G., Kroll H., Santoso S.
“Real-time analysis of HPA-1a antigen-antibody interaction by surface plasmon resonance technology”

- Socher I.**, Bald R., Sachs U.J.H., Giers G., Santoso S.
 “Variable expression of the neonatal Fc receptor alpha-chain promoter may influence fetal and neonatal platelet counts in alloimmune thrombocytopenia”
- Socher I.**, Zwingel C., Schallmoser K., Hundhausen T., Santoso S., Kroll H.
 “Heterogeneity of HPA-3 alloantibodies: Consequences for the diagnosis of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia”
4. 51th annual meeting of the German society Thrombosis and Haemostasis, 2007, Dresden, Germany
- Socher I.**, Andrei-Selmer C.L., Bein G., Kroll H., Santoso S.
 “Severe neonatal alloimmune thrombocytopenia caused by low-avidity anti-HPA-1a alloantibodies”
5. 12th Congress of the European Hematology Association
- Socher I.**, Bakchoul T., Santoso S.
 “Human platelet alloantigens: heterogeneity of platelet alloantibodies”
6. Annual Scientific Subcommittee Session of the Society Thrombosis and Haemostasis (Platelet Immunology), 2007, Geneva, Switzerland
- Socher I.**, Andrei-Selmer C., Bein G., Kroll H., Santoso S.
 “Severe neonatal alloimmune thrombocytopenia caused by low-avidity anti-HPA-1a alloantibodies: detection by surface plasmon resonance technology”
7. 21th Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, 2007, Geneva, Switzerland
- Socher I.**, Zwingel C., Santoso S., Kroll H.
 “Heterogeneity of HPA-3 alloantibodies: Consequences for the diagnosis of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia”
- Socher I.**, Andrei-Selmer C., Bein G., Kroll H., Santoso S.
 “Severe neonatal alloimmune thrombocytopenia caused by low-avidity anti-HPA-1a alloantibodies: detection by surface plasmon resonance technology”

