

**Untersuchung der Auswirkungen
zweier Punktmutationen im $\beta 3$ -Integrin auf
die Immunogenität
des Humanen Plättchenantigen 1a**

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

Vorgelegt von Sarah Theresa Holzwarth
aus Dresden

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin

Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Sachs

Gutachter: Prof. Dr. Schlüter

Tag der Disputation: 05. Juni 2023

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.2 Fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie	1
1.2.1 Einführung	1
1.2.2 Pathogenese: Immunisierung	4
1.2.3 β 3-Integrine	6
1.2.4 Epitope der Anti-HPA-Antikörper	8
1.2.5 Effekte der Anti-HPA-Antikörper im fetalen Organismus	9
1.2.6 Diagnostik	10
1.2.7 Therapie	11
1.3 Thrombasthenie Glanzmann	13
1.4 Zielsetzung	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Klinische Präsentation	15
2.2 Vorarbeiten	16
2.2.1 Sequenzierung der Patienten-DNA	16
2.2.2 Quantifizierung der α IIb-Oberflächenexpression auf Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie	20
2.3 Herstellung von Expressionsvektoren für αv, αIIb und β3	21
2.4 Generierung stabiler Transfektanten	22
2.4.1 Zellkultur	22
2.4.2 Kotransfektion	22
2.4.3 Fluoreszenzaktiviertes Zell-Sorting	24
2.5 Immunologische Analyse der Oberflächenproteine	24
2.5.1 Durchflusszytometrie von Thrombozyten und HEK-Zellen	24
2.5.2 Präparation von Gesamtproteinextrakten	26
2.5.3 SDS-Page	27
2.5.4 Immunblot mit HEK-Zellen	27
2.5.5 Antigen Capture Assay	29

3 Ergebnisse	31
3.1 Punktmutation ITGB3 c.473A>G	31
3.1.1 Nachweis eines Nukleotidaustausches (c.473A>G)	31
3.1.2 Anti-Wo(a) erkennt spezifisch ITGB3 p.Gln132Arg	32
3.2 Punktmutation ITGB3 c.1458C>G	34
3.2.1 Molekulare Analyse der α IIb(ITGA2B)- und β 3(ITGB3)-Gene	34
3.2.2 Auswirkungen der ITGB3 p.Cys460Trp-Mutation auf die Expression des β 3-Integrins	36
3.2.3 Auswirkung der Mutation auf HPA-1a-bestimmende Antigene	38
3.2.4 Auswirkung der Mutation auf das Bindungsverhalten einiger anti-HPA-1a-Antikörper	40
4 Diskussion	42
4.1 Punktmutation ITGB3 c.473A>G	42
4.2 Punktmutation ITGB3 c.1458C>G	43
4.2.1 Auswirkungen der Mutation p.Cys460Trp auf die Expression der β 3-Proteine	43
4.2.2 Auswirkungen der Mutation p.Cys460Trp auf die Proteinstruktur	44
4.2.3 Auswirkungen der Mutation p.Cys460Trp auf die Immunogenität des HPA-1a-Epitops	46
4.3 Fazit und Ausblick	48
5 Zusammenfassung.....	50
6 Summary	52
7 Abkürzungsverzeichnis	54
8 Abbildungsverzeichnis	56
9 Tabellenverzeichnis.....	57
10 Literaturverzeichnis	58
11 Publikationsverzeichnis.....	71
11.1 Publikationen	71
11.2 Vorträge	71
12 Ehrenwörtliche Erklärung.....	72
13 Danksagung	73

1 Einleitung

1.1 Fetomaternale Inkompatibilität

Bei jeder Schwangerschaft stellt sich eine für den menschlichen Körper sehr ungewöhnliche Situation ein: Fremdes Gewebe mit fremder DNA wird vom Immunsystem des mütterlichen Organismus über neun Monate hinweg geduldet. Doch in einigen wenigen Fällen greift dieser Körper, der sonst alles darauf auslegt, dem Fetus ideale Bedingungen zum Wachsen, Entwickeln und Gedeihen zu schaffen, einige fetale Zellen an. Besonders prominent ist hier der Morbus haemolyticus neonatorum. Bei dieser Erkrankung, die schon seit über 400 Jahren bekannt ist (Kjeldsen-Kragh & Ahlen, 2020), immunisiert sich die Mutter gegen Antigene auf der Oberfläche von kindlichen Erythrozyten. Weniger bekannt, aber dennoch von erheblicher klinischer Bedeutung, sind die Neonatale Alloimmunneutropenie und die Fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie. Bei diesen Erkrankungen befinden sich die Antigene auf neutrophilen Granulozyten, beziehungsweise Thrombozyten des Kindes. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Fetalen/neonatalen Alloimmunthrombozytopenie.

1.2 Fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie

1.2.1 Einführung

Bei der Fetalen/neonatalen Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT) immunisiert sich die Mutter gegen Antigene auf den Thrombozyten des Feten. Ihr Immunsystem bildet Antikörper, die über die Plazenta ins fetale Blut gelangen, an die fetalen Thrombozyten binden und zu einer Zerstörung der so markierten Thrombozyten führen. Etwa eine von 1500 Schwangerschaften ist betroffen (de Vos et al., 2020).

Neben einer teils schweren Thrombozytopenie (unter $50 \times 10^9/l$) fallen die betroffenen Kinder mit verschiedenen Blutungszeichen auf. In 90% der Fälle treten petechiale Blutungen auf, 66% haben Hämatome, 30% gastrointestinale Blutungen. Auch Hämoptysen, Hämaturie und retinale Blutungen können auftreten (Sachs et al., 2012). Betroffene Kinder kommen überdurchschnittlich häufig mit einem niedrigen Geburtsgewicht auf die Welt (Mueller-Eckhardt et al., 1989; Tiller, Killie, Husebekk, et al., 2012). Etwa die

Hälfte der Kinder werden transfusionspflichtig (van der Lugt et al., 2015), trotzdem ist auch ein vollkommen asymptomatischer Verlauf möglich (Sonneveld et al., 2016).

Als schwerwiegendste Komplikation gilt die intrakranielle Blutung (ICH), die 10-25% aller Schwangerschaften mit FNAIT betrifft (Kamphuis et al., 2014; Sachs et al., 2012). Die Prognose von ICHs ist ausgesprochen schlecht. Die Mortalität bis zum vierten Lebensstag beträgt 35%, über 50% der überlebenden Kinder leiden unter langfristigen neurologischen Beeinträchtigungen (Tiller et al., 2013), wie schwerer mentaler Retardierung, kortikaler Blindheit, Krampfanfällen, sowie zerebralen Lähmungen (Bonacossa & Jocelyn, 1996).

Die Antigene befinden sich auf fetalen Thrombozyten und werden als HPAs - Humane Plättchen Antigene - bezeichnet. Eine Immunisierung kann stattfinden, wenn der Fetus ein Antigen vom Vater geerbt hat, das sich nicht auf mütterlichen Thrombozyten befindet und daher dem mütterlichen Immunsystem unbekannt ist. Die HPAs befinden sich auf verschiedenen Glykoproteinen.

Die Häufigkeit verschiedener HPAs und damit FNAIT-verursachender Inkompatibilitäten variiert dabei zwischen ethnischen Gruppen. HPA-1a (in älteren Veröffentlichungen auch als PlA1 oder Zw(a) bezeichnet) ist bei Kaukasiern mit 75% der häufigste Verursacher von FNAIT (Mueller-Eckhardt et al., 1989) und befindet sich auf dem Integrin $\beta 3$ (Kornecki et al., 1985). Weitere 15% werden durch HPA-5b auf dem Glykoprotein Ia verursacht (Sachs 2014). Bei Asiaten steht HPA-4b im Vordergrund, was bei Kaukasiern eine Rarität darstellt (Ohto et al., 2004).

Bislang (Stand November 2022) sind vom Komitee für Plättchennomenklatur 35 verschiedene HPAs auf 5 Glykoproteinen anerkannt (siehe Abbildung 1), die Liste wird jedoch laufend erweitert (Versiti (October, 2020). HPA Database.)

(Versiti (October, 2020). HPA Database., 2020)

Eingriff und geht mit nicht unbedeutenden Komplikationsrisiken einher (Winkelhorst, Murphy, et al., 2017).

Auch die Konzentrationsbestimmung der Anti-HPA-1a-Antikörper hat sich nicht bewähren können, um ICHs vorherzusagen und das therapeutische Vorgehen festzulegen (Sachs, 2020). Mit einem negativ prädiktiven Wert von 88-95% könnte die Antikörperkonzentration unter bestimmten Umständen (richtiger Messzeitpunkt und Titration der Antikörper (AK) mittels MAIPA) jedoch geeignet sein, um Fälle mit niedrigem Risiko zu identifizieren (Kjær et al., 2019).

Bis jetzt war der Ausgang der vorherigen Schwangerschaft der einzige verlässliche Marker (Birchall et al., 2003; Bussel et al., 1997, 2010) - einer allerdings, der ausscheidet, wenn es sich um die erste Schwangerschaft handelt. Im Gegensatz zur Rhesusinkompatibilität sind in 51% aller Fälle jedoch auch Erstschwangerschaften schon betroffen (Bertrand et al., 2011; Mueller-Eckhardt et al., 1989).

In letzter Zeit mehren sich Hinweise, dass unterschiedliche Subtypen von Anti-HPA-1a-Antikörpern unterschiedliche klinische Auswirkungen haben und damit die Untersuchung der Zusammensetzung maternaler Seren, sowie die Unterscheidung in Antikörpersubtypen einen prognostischen Vorteil bringen würde (Kroll et al., 2005; Santoso et al., 2016). Eine These, die auch einen Erklärungsansatz für die niedrige Aussagekraft der AK-Titer bietet: Ein Serum mit einem hohen Titer eines ungefährlichen AK-Subtyps wird weniger schlimme klinische Auswirkungen haben, als ein Serum mit vergleichsweise niedrigen Konzentrationen eines sehr gefährlichen AK-Subtyps.

1.2.2 Pathogenese: Immunisierung

Damit es im Rahmen der FNAIT zu einer Immunisierung kommt, muss das Immunsystem der Mutter mit dem fetalen Plättchenantigen in Kontakt kommen. Eine HPA-1a-Inkompatibilität ist bei Kaukasiern mit etwa 75% die häufigste Ursache für eine Fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie (Mueller-Eckhardt et al., 1989) und die mit Abstand am ausführlichsten erforschte Variante der Immunisierung bei FNAIT. Im Folgenden soll deshalb die Pathogenese exemplarisch am Beispiel einer HPA-1a-Inkompatibilität dargestellt werden. Es darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass zahlreiche andere humane Plättchenantigene auch zu einer FNAIT führen können.

Ähnlich wie beim Morbus haemolyticus neonatorum (MHN), kann der Antigenkontakt durch einen Übertritt fetaler Plättchen in die mütterliche Zirkulation, zum Beispiel durch eine vorausgegangene Entbindung, Fehlgeburt oder fetomaternale Blutung geschehen (Brojer et al., 2016). Jedoch sind anders als beim MHN auch viele Primigravidae betroffen – 42% aller Kinder mit FNAIT werden von erstgebärenden Frauen geboren (Mueller-Eckhardt et al., 1989). Diese hohe Rate spricht dafür, dass das mütterliche Immunsystem noch auf anderen Wegen mit dem fetalen HPA-1a-Antigen in Kontakt kommen kann. Kumpel et al. wiesen nach, dass $\beta 3$ im Komplex mit αv auf den Microvilli von Synzytiotrophoblastenzellen vorhanden ist (Kumpel et al., 2008). Im Rahmen des natürlichen Regenerationsprozesses der Plazenta werden Zellfragmente des Synzytiotrophoblasten in das ihn umspülende mütterliche Blut abgegeben (Johansen et al., 1999). Das auf diesem zellulären Material vorhandene $\beta 3$ könnte die Quelle für eine Immunisierung von Primigravidae gegen HPA-1a sein (Kumpel & Manoussaka, 2012). Untersuchungen in den 1980er Jahren zeigten, dass humane Plättchenantigene schon ab der 18. Schwangerschaftswoche auf fetalen Zellen vorhanden sind (Gruel et al., 1986).

Das antigene Material wird von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen) phagozytiert und auf HLA-Klasse-II-Molekülen präsentiert (Kumpel & Manoussaka, 2012). Dabei scheint ein HLA-Klasse-II-Haplotyp das HPA-1a-Peptid besonders effektiv präsentieren zu können: Rund 90% der immunisierten Frauen tragen das Allel HLA-DRB3*01:01 (Kjeldsen-Kragh et al., 2007; L'Abbé et al., 1992), während nur 27% der Allgemeinbevölkerung Träger sind (Brojer et al., 2016). Verantwortlich für dieses Phänomen ist die stark positive Ladung der Tasche P4 in der Bindungsgrube dieser HLA-DRB3-Variante sowie die hydrophile Tasche P9. An diese kann der hydrophobe Rest Leu33 andocken, sodass das HPA-1a-Antigen besonders passgenau präsentiert werden kann (Ahlen et al., 2009; Kjeldsen-Kragh & Ahlen, 2020). Allerdings immunisieren sich nur 30% aller HPA-1a-negativen Mütter, die dieses Allel tragen, weshalb es nur bedingt als Risikoprädiktor für Screeningprogramme geeignet ist (Sachs et al., 2012).

Immunisieren sich HLA-DRB3*01:01-negative Frauen dennoch, ist der Krankheitsverlauf insgesamt milder und die neonatale Thrombozytopenie weniger ausgeprägt (Kjeldsen-Kragh & Ahlen, 2020).

Das HPA-1a-Peptid wird CD4-positiven T-Helferzellen in der mütterlichen Milz und Lymphknoten präsentiert und stimuliert diese. Die T-Helferzellen werden aktiviert, proliferieren und migrieren in B-Zellbereiche (Kumpel & Manoussaka, 2012).

Die B-Zellantwort wird durch die Bindung des HPA-1a-Antigens an den B-Zellrezeptor (=Oberflächen-IgM) eingeleitet. Der Rezeptor-Antigen-Komplex wird endozytiert, das Antigen prozessiert und von HLA-Klasse-II-Molekülen auf der B-Zell-Oberfläche präsentiert. Die HPA-1a-spezifischen T-Helferzellen können diesen Komplex erkennen und in einem vielschichtigen Zusammenspiel von Oberflächenmolekülen, Zytokinen und Rezeptoren die Produktion von Anti-HPA-1a-Antikörpern durch B-Zellen anregen (Murphy & Weaver, 2018).

Die aktivierten B-Zellen proliferieren und differenzieren in Plasma- und Gedächtniszellen. Die anfänglich nur IgM-produzierenden B-Zellen unterlaufen einen Isotypenwechsel, sodass Antikörper verschiedener Effektorfunktionen entstehen. Für die Pathogenese der FNAIT spielen nur IgG-Antikörper eine Rolle, IgA und IgM gelangen nicht zum Feten, weil sie in der Plazenta keine spezifischen Rezeptoren haben (Kumpel & Manoussaka, 2012). IgG wird über den plazentaren FcRn-Rezeptor zum Feten transportiert (P. Chen et al., 2010). Die transferierten Antikörper binden über den Fc-Rezeptor an fetale Plättchen und führen zur Zerstörung durch Phagozyten und zur Lysierung durch Komplementaktivierung (Audia et al., 2017).

Antikörper gegen HLA-Klasse I-Antigene scheinen keinen Einfluss auf die fetale Thrombozytenzahl zu haben (Sachs, 2020). Möglicherweise erhöhen bakterielle und virale Infektionen das Immunisierungsrisiko. Im Mausmodell konnte beobachtet werden, dass eine Stimulation mit Lipopolysacchariden und Poly I:C die Immunreaktion auf das β 3-Integrin erhöht (C. Li et al., 2013).

1.2.3 β 3-Integrine

Das β 3-Integrin ist ein Oberflächenprotein, das im Komplex mit einer α -Untereinheit auf vielen Zellen des menschlichen Körpers vorhanden ist. Im Komplex mit α Ib ist β 3 Rezeptor für Fibrinogen (auch bekannt als GP IIb/IIIa oder CD41/61) auf Thrombozyten. Im Komplex mit α v fungiert β 3 als Rezeptor für Vitronektin (Bennett et al., 2009) und

findet sich auf vielen Zelltypen, einschließlich verschiedener Kulturzellen, Endothelzellen und Trophoblastzellen (Giltay et al., 1988; Kumpel et al., 2008; Santoso et al., 2016).

Die β I-Domäne im Kopfteil des β -Integrins verfügt über die Ligandenbindungsstelle (Thinn et al., 2018). Der HPA-1a-determinierende Polymorphismus Leucin/Prolin33 befindet sich in der Plexin-Semaphorin-Integrin- (PSI-)Domäne (siehe Abbildung 2) und scheint an einer besonders gut zugänglichen Stelle des Integrins zu liegen (Xiao et al., 2004).

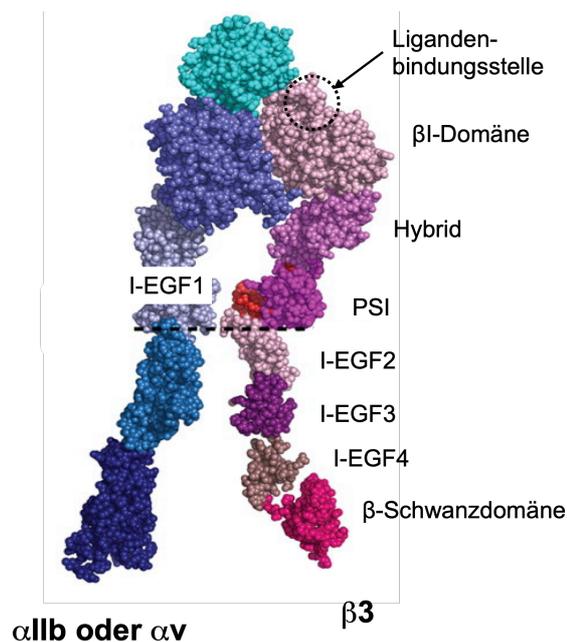


Abbildung 2: Domänen des β 3-Integrins

Das Integrin β 3 besteht aus einer Domäne, die cytoplasmatisch liegt, einer Transmembrandomäne (beide hier nicht dargestellt), einer β -Schwanzdomäne, vier I-EGF-Domänen, einer PSI-Domäne und Hybrid- und β I-Domäne. Abbildung nach (Tang et al., 2008).

Eine Disulfidbrücke der Cysteine 5 und 435 bildet eine große Schlaufe, die den Leu/Pro33-Polymorphismus-enthaltenden Aminoterminus mit der I-EGF-1-Domäne verbindet (Valentin et al., 1995).

Das Integrin β 3 kommt in verschiedenen Konformationen und Aktivierungszuständen auf der Zelloberfläche vor (Hynes, 2002). In kristallographischen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die PSI- und I-EGF1-Domänen verschiedene Konformationen je nach Komplexbildung mit α IIb oder α v annehmen. Diese unterschiedlichen

Konformationen können durch Anti-HPA-1a-Antikörper unterschieden werden (Thinn et al., 2018).

1.2.4 Epitope der Anti-HPA-Antikörper

Anti-HPA-1a-Antikörper scheinen sich in ihrer Wirkung zu unterscheiden, deshalb gewinnt eine Unterscheidung von Subtypen in der Risikoprädiktion von FNAIT (Kroll et al., 2005; Santoso et al., 2016; Zhi et al., 2018) zunehmend an Relevanz.

Zur Erkennung des HPA-1a-Epitops benötigen die Anti-HPA-1a-Antikörper die Aminosäure Leucin an Position 33 des β 3-Integrins (Newman et al., 1989). Eine wichtige Rolle für die Immunogenität des HPA-1a-Epitops spielt zudem die dreidimensionale Struktur der PSI-Domäne. Schon seit Anfang der 1990er Jahre ist bekannt, dass für das HPA-1a-Epitop mehr als nur die Aminosäure Leu33 auf einem linearen Peptid benötigt wird (Flug et al., 1991). Durch Spaltung der für die Tertiärstruktur elementaren Disulfidbrücken geht das HPA-1a-Epitop verloren (Kunicki & Aster, 1979).

Inzwischen mehren sich die Hinweise, dass Anti-HPA-1a-Antikörper heterozygot in Bezug auf ihre Epitope sind (Stafford et al., 2008; Zhi et al., 2018). Valentin et al. postulierten, dass für die Bindung mancher, jedoch nicht aller Anti-HPA-1a-Antikörper neben Resten in der PSI-Domäne auch Reste in der I-EGF1-Domäne wichtig sind und bezeichneten diese Antikörper als Typ-II-Antikörper. Antikörper, deren Epitop nur durch die PSI-Domäne gebildet wird, wurden als Typ-I-Antikörper definiert (Stafford et al., 2008; Valentin et al., 1995). Typ-I-Antikörper (wie zum Beispiel der monoklonale Antikörper SZ21) benötigen die Aminosäuren 30, 32, und 39 rund um Leu33, um zu binden. Typ-II-Antikörper (wie B2G1 und 26.4) benötigen zusätzlich die Aminosäuren H446 und Q470 in der I-EGF1-Domäne (Zhi et al., 2018).

Neben Anti-HPA-1a-Antikörpern, die lediglich die β -Kette für eine Bindung benötigen, gibt es zudem einen dritten Subtyp von Anti-HPA-1a-Antikörpern: komplex-spezifische Antikörper gegen $\alpha\beta$ 3 (Fiore et al., 2020; Santoso et al., 2016). Weil die α -Kette weit entfernt vom zentral gelegenen Leu33-Rest liegt, ist die α -Kette wahrscheinlich nicht direkt am Epitop beteiligt (Thinn et al., 2018), sondern beeinflusst die Konformation der β -Kette und damit das HPA-1a-Epitop indirekt (Santoso et al., 2016). Abbildung 3 gibt einen Überblick über die verschiedenen Epitope.

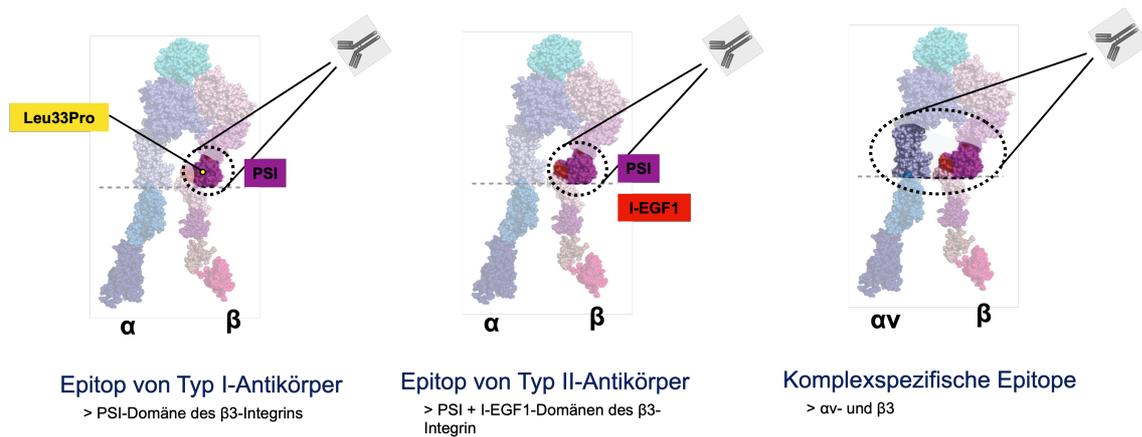


Abbildung 3: Übersicht über die Epitope der Anti-HPA-1a-Antikörper

Das Epitop von Typ I-Anti-HPA-1a-Antikörpern wird von der PSI-Domäne gebildet, Typ II-Anti-HPA-1a-Antikörper benötigen zur Bildung zusätzlich zur PSI- die I-EGF1-Domäne. Zudem gibt es komplexspezifische Antikörper, deren Epitop durch die αv - und β 3-Kette gebildet werden. Eigene Darstellung unter Verwendung von (Tang et al., 2008)

Im Serum immunisierter Mütter befindet sich nicht nur die Spezifität eines Antikörpers, sondern eine polyklonale Mischung aus Antikörpern mit verschiedenen Anti-HPA-1a-Epitopen (Zhi et al., 2018). Womöglich unterlaufen die Antikörper im Laufe der Erkrankung einen Reifungsprozess und ändern ihre Spezifität (Kroll et al., 2005; Williamson et al., 1998).

1.2.5 Effekte der Anti-HPA-1a-Antikörper im fetalen Organismus

Die Effekte der Anti-HPA-1a-Antikörper sind komplex und unterscheiden sich je nach Subpopulation.

Anti-HPA-1a-Antikörper binden über Fc-Rezeptoren an fetale Plättchen und führen durch Phagozytose zu einer Plättchendestruktion. Alternativ können sie das Komplementsystem aktivieren (Bakchoul et al., 2013). Zusätzlich scheinen Antikörper im Rahmen der FNAIT die Megakaryopoese und damit den Nachschub an neuen Plättchen für die fetale Zirkulation zu hemmen (Liu et al., 2015) – alles Faktoren, die zu einer Thrombozytopenie beitragen.

Kroll et al. wiesen darauf hin, dass manche Anti-HPA-1a-Antikörper durch Bindung an ihr Zielantigen zudem die Fibrinogenbindung und damit die für die Blutgerinnung wichtige Rezeptorfunktion des GPIIb/IIIa hemmen (Kroll et al., 2005). Inhibierende Seren waren mit ausgeprägten Blutungen assoziiert. Funktionell inhibierende Antikörper könnten einen Erklärungsansatz für ausgeprägte klinische Präsentationen von FNAIT bieten.

Für die Rezeptorfunktion von $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ und $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ ist eine Aktivierung nötig. Es konnte gezeigt werden, dass Typ-II-Antikörper (binden die PSI- und I-EGF1-Domäne) die gebeugte, inaktive Form des β3 stabilisieren können (Thinn et al., 2018). Es ist deshalb möglich, dass sich Typ-I- und Typ-II-Antikörper in ihrer Fähigkeit, die Rezeptorfunktion zu hemmen und damit in der Schwere des resultierenden klinischen Bildes unterscheiden. Anti-HPA-1a-Antikörper, die spezifisch gegen den $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Komplex auf Endothelzellen gerichtet sind, können über eine Hemmung von $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ als Vitronektinrezeptor die endotheliale Integrität zerstören (van Gils et al., 2009), eine Apoptose der Endothelzellen induzieren und die Angiogenese hemmen (Youghbaré et al., 2015). Es ist vorstellbar, dass derart geschädigte zerebrale Gefäße eher zu Blutungen neigen. Das Vorkommen von anti- $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Antikörpern ist deutlich mit ICHs des Feten assoziiert (Santoso et al., 2016). Der direkte Endothelschaden könnte auch erklären, warum FNAIT so oft intraparenchymale ICHs verursacht und nicht vorrangig intraventrikuläre Blutungen, wie sie bei Frühgeburtlichkeit vorrangig beobachtet werden (Althaus et al., 2005).

1.2.6 Diagnostik

Die Diagnose FNAIT beruht auf serologischen und molekulargenetischen Untersuchungstechniken. Da in den meisten Ländern keine Screeningprogramme etabliert sind, fallen die meisten Fälle von FNAIT erst durch ein thrombozytopenes Neugeborenes auf. Bei isolierter neonataler Thrombozytopenie ist FNAIT zwar mit etwa 10% der häufigste Grund (Uhrynowska et al., 1997), trotzdem sollten weitere Differentialdiagnosen abgeklärt werden. Bei schwerer Thrombozytopenie und einem kritisch kranken Kind stehen dabei die disseminierte Intravasalgerinnung (DIC) und Sepsis im Vordergrund, bei milder Thrombozytopenie eine Plazentainsuffizienz (Sachs et al., 2012). Kommerzielle Testsysteme testen auf die häufigsten Antigene, seltene Antigene werden von diesen Testverfahren meist übersehen. Als Goldstandard in der Diagnostik gelten *Antigen capture assays*, die auf dem 1987 von Kiefel et al. vorgestellten monoklonalen antikörper-spezifischen Immobilisationstest für plättchen-spezifische Antigene (MAIPA) beruhen (Kiefel et al., 1987; Sachs, 2013). Bei diesem Test werden die relevanten Glykoproteine von Spenderzellen mit bekanntem Antigenmuster immobilisiert und mit dem mütterlichen Serum getestet. Dieses Verfahren erlaubt zudem eine sogenannte *Crossmatch-Analyse* zwischen mütterlichem Serum und väterlichen Thrombozyten, bei der auch seltene Antigene, wie das des Patienten Nummer 1, erfasst werden können.

Wenn Frauen ein Kind mit FNAIT zur Welt bringen, ist manchmal trotzdem kein thrombozytärer Antikörper nachweisbar. In diesen Fällen empfiehlt sich eine Wiederholung des Tests einige Wochen später (Killie et al., 2008). Ein weiterer Grund für Schwierigkeiten bei der Antikörperdetektion können sogenannte niedrig-affine Antikörper sein, die trotzdem schwere Verläufe von FNAIT verursachen können. Sensitive experimentelle Verfahren wie die Oberflächenplasmonresonanz können in manchen Fällen hier doch Antikörper gegen Thrombozyten nachweisen (Socher et al., 2009).

Zur Sicherung der serologischen Ergebnisse sollte eine molekulargenetische Antigentypisierung der Mutter und des Kindes erfolgen. Gerade in Bezug auf das FNAIT-Risiko für mögliche Folgeschwangerschaften sollte im Verlauf auch der Vater genotypisiert werden, um zu wissen, ob er homozygot oder heterozygot für das jeweilige Allel ist. Dies findet heute meist durch PCR mit sequenz-spezifischen Primern (Phuangtham et al., 2017) oder Real-time-PCR statt (Ficko et al., 2004).

Bei einer Folgeschwangerschaft bietet die Untersuchung zellfreier fetaler DNA in der mütterlichen Zirkulation eine nichtinvasive Diagnostik, um zu klären, welche HPA-Allele beim Feten vorliegen (Scheffer et al., 2011; Wienzek-Lischka et al., 2015). Hat beispielsweise eine HPA-1a-Inkompatibilität eine vorherige Schwangerschaft verkompliziert, kann beim Genotyp HPA-1bb beim Feten Entwarnung gegeben und auf eine Therapie verzichtet werden.

1.2.7 Therapie

Bei der Therapie der FNAIT gilt es, die Nebenwirkungen einer Therapie gegen das Komplikationsrisiko der unbehandelten Erkrankung abzuwägen – in Anbetracht wenig verlässlicher Risikoprädiktoren keine leichte Aufgabe und fortwährendes Diskussionsthema in der Literatur (Kiefel et al., 1994; Lieberman et al., 2019; Peterson et al., 2013; Rayment et al., 2005; Winkelhorst, Murphy, et al., 2017).

Zur Therapie stehen verschiedene Substanzen zur Verfügung. Als Erstlinientherapie bei Schwangerschaft mit FNAIT gilt die wöchentliche Gabe von intravenösem IgG (IVIg) an die Mutter, teilweise mit zusätzlicher täglicher Kortikosteroidgabe (Rayment et al., 2005; Sachs, 2013; Winkelhorst, Murphy, et al., 2017). Mit einer Gabe von IVIg in einer Dosis von 1g pro kg Körpergewicht ist es in rund 97% aller Fälle möglich, eine intrakranielle Blutung zu verhindern (Winkelhorst, Murphy, et al., 2017).

Van der Lugt et al. schlugen eine Risikostratifizierung je nach Vorhandensein einer Hirnblutung in einer vorausgegangenen Schwangerschaft vor, um den Startzeitpunkt der IVIG-Therapie zu determinieren. Die Hochrisikogruppe mit betroffenem Geschwisterkind startet dabei die Therapie in der 16. Gestationswoche, während die Standardrisikogruppe erst ab Woche 28 behandelt wird (van der Lugt et al., 2015).

Insgesamt wird die Therapie mit intravenösem IgG gut vertragen, weniger als 5% der Patienten berichten von Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Hautausschlägen und febrilen Reaktionen (Kazatchkine & Kaveri, 2001). Da es sich bei IVIG um ein gepooltes Spenderpräparat handelt, besteht ein Infektionsrisiko mit Hepatitis C und HIV, durch rigoroses Spenderscreening und neue Verfahren zur Virusinaktivierung ist dieses Risiko in den meisten Ländern inzwischen jedoch sehr gering (Negi et al., 2007; Rayment et al., 2005). So wurde in Deutschland seit 1995 keine HCV-Infektion durch intravenöse Immunglobuline gemeldet und seit der Einführung routinemäßigen Screenings aller Blutspender auf anti-HIV-Antikörper 1985 wurden keine Berichte einer HIV-Übertragung durch intravenöse Immunglobuline veröffentlicht (Funk et al., 2020; Schiano et al., 1995; Unkelbach et al., 2014; Yap, 1996).

Interessanterweise ist trotz belegter Wirksamkeit von intravenösem IgG der genaue Wirkmechanismus nach wie vor ungeklärt. Diskutiert wird, dass es zu einer Fc-Rezeptorblockade auf Makrophagen mit daraus resultierender behinderter Eliminierung der antikörperbeladenen fetalen Thrombozyten kommt, die mütterliche Antikörperproduktion supprimiert wird oder weniger pathologische Antikörper diaplazentar zum Fetus transportiert werden (Rayment et al., 2005).

Als Therapie der Ultima Ratio gelten intrauterine Thrombozytentransfusionen. Die dafür notwendige Nabelschnurpunktion geht besonders bei fetaler Thrombozytopenie mit einer hohen Komplikationsrate von 6-11% pro Schwangerschaft einher (Berkowitz et al., 2006; Winkelhorst, Oepkes, et al., 2017). Mögliche Komplikationen bestehen in fetaler Bradykardie, Nabelschnurtamponade, sowie fetalen Blutungskomplikationen. Jede dritte Komplikation resultiert in fetalem oder neonatalem Tod (Winkelhorst, Murphy, et al., 2017).

In Hochrisikoschwangerschaften sollte eine Schnittentbindung erwogen werden, da eine Thrombozytenzahl unter $50 \times 10^9/l$ nicht sicher auszuschließen ist. Belastbare Evidenz zum Entbindungsmodus bei FNAIT steht jedoch noch aus (Sachs, 2013).

Bei Geburt wird das Kind von der Zufuhr der pathologischen Antikörper getrennt, trotzdem zirkulieren maternale Antikörper weiterhin im kindlichen Organismus und können zu Thrombozytopenie und ICHs führen. Die meisten postnatalen ICHs ereignen sich in den ersten 24 h nach der Geburt (Ghevaert et al., 2007), weshalb tägliche Blutbildkontrollen und eine kraniale Bildgebung zum Ausschluss einer ICH empfohlen werden. Plättchentransfusionen werden empfohlen, wenn die Thrombozytenzahl unter $30 \times 10^9/l$ fällt, bei Blutungszeichen kann die Transfusionsschwelle bei $50 \times 10^9/l$ angesetzt werden (Chakravorty & Roberts, 2012; Sachs, 2013).

Dabei sollten mütterliche Plättchen oder HPA-1bb- und HPA-5aa-Plättchen unausgewählten Spenderkonserven vorgezogen werden (Baker et al., 2019). Stehen diese nicht zur Verfügung (z.B. bei einem unerwarteten Fall von FNAIT), können auch unausgewählte Spenderkonserven verwendet werden, um einen Zeitverzug zu vermeiden (Kiefel et al., 2006).

Supportiv kann auch postnatal IVIG gegeben werden, benötigt aber 24 bis 48 h bis zum Wirkeintritt und kann dadurch Thrombozytentransfusionen bei Neugeborenen mit FNAIT nicht ersetzen.

Um eine Immunisierung HPA-1b-homozygoter Frauen gegen HPA-1a zu vermeiden, ist eine Prävention analog zur Anti-D-Prophylaxe beim Morbus haemolyticus neonatorum (MHN) denkbar. Sowohl gepooltes Spender-IgG mit Anti-HPA-1a-Spezifität (Kjær et al., 2020), als auch monoklonale Antikörper gegen HPA-1a (Bakchoul et al., 2013; Eksteen et al., 2015; Ghevaert et al., 2013) wurden hierfür vorgeschlagen, es fehlen jedoch klinische Studien zur Wirksamkeit und Unbedenklichkeit.

1.3 Thrombasthenie Glanzmann

Thrombasthenie Glanzmann ist eine seltene Störung der primären Hämostase, bei der $\alpha IIb\beta 3$ auf der Thrombozytenoberfläche vermindert oder nicht funktionstüchtig ist. Dies führt zu einer eingeschränkten Plättchenaggregation und mukokutanen Blutungen, wie Purpura, Epistaxis und Zahnfleischbluten (Botero et al., 2020; Nurden et al., 2011). Thrombasthenie Glanzmann ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung und wird durch Punktmutationen oder Deletionen in den für $\alpha IIb\beta 3$ kodierenden Genabschnitten verursacht.

Betroffene benötigen häufig Transfusionen und entwickeln danach oft Anti- α IIB β 3-Antikörper (Fiore et al., 2020). Deshalb sind diese Glanzmann verursachenden Mutationen hilfreich, um Epitope von Antikörpern zu studieren, die gegen Plättchen gerichtet sind und in der Pathogenese von FNAIT involviert sind.

1.4 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Im ersten Teil wird untersucht, ob die Mutation Gln132Arg in der β A-Domäne des β 3-Integrins verantwortlich für das Wo^a-Epitop ist. Die Mutation fiel bei einem Patienten mit Neonataler Alloimmunthrombozytopenie auf, nach dem Familiennamen wurde das Antigen als Wo^a benannt.

Um diese Frage zu beantworten, wurde ein β 3-Plasmid generiert, das die Mutation trägt. Dieses wurde zusammen mit einem α IIB-WT-Plasmid in HEK-293F-Zellen eingebracht. Anschließend wurde in einem *antigen capture assay* getestet, ob die mutationstragenden Zellen mit dem mütterlichen Serum reagieren.

Im zweiten Teil wird untersucht, ob die Mutation Cys460Trp in der I-EGF1-Domäne das Epitop für Anti-HPA-1a-Antikörper verändert. Die Mutation fiel bei einem Patienten mit Glanzmann Thrombasthenie auf, liegt jedoch in einer Region des β 3-Integrins, die zum Anti-HPA-1a-Epitop beiträgt und deshalb Bedeutung bei der Immunisierung im Rahmen von FNAIT haben kann.

Dazu wurde auch hier ein β 3-Plasmid generiert, das die Mutation trägt und zusammen mit einem α IIB-WT-Plasmid in HEK-293F-Zellen eingebracht. Weil bekannt ist, dass das β 3-Integrin im Komplex mit α v eine andere Konformation annimmt, wurden auch α v β 3-Transfektanten, die die Mutation tragen, generiert und vergleichend in die Untersuchungen eingeschlossen. Die Expression der Heterodimere wurde durchflusszytometrisch überprüft und anschließend das Bindungsverhalten mit verschiedenen Antikörpern in der Durchflusszytometrie und in einem *antigen capture assay* getestet.

Es soll die Frage beantwortet werden, ob sich mit Hilfe der Mutation verschiedene Antikörper-Subtypen unterscheiden lassen.

2 Material und Methoden

2.1 Klinische Präsentation

Der Patient Nr. 1 kam als zweites Kind einer 38-jährigen Patientin (hier als „Wo“ bezeichnet) zur Welt. Das in der 39. Schwangerschaftswoche reif geborene Kind fiel mit einer Thrombozytenzahl von $31 \times 10^9/l$ ohne Blutungszeichen auf. Behandelt wurde es am ersten Lebenstag mit einer unausgewählten Thrombozytentransfusion. Die Thrombozytenzahl stieg auf $170 \times 10^9/l$ und blieb ohne weitere Transfusion bei über $50 \times 10^9/l$. Am 28. Lebenstag erreichte die Thrombozytenzahl den Normalbereich.

Bereits die zwei Jahre ältere Schwester fiel bei der Geburt mit einer Thrombozytenzahl von $29 \times 10^9/l$ (bis auf $20 \times 10^9/l$ fallend) auf. Eine Neonatale Alloimmunthrombozytopenie (NAIT) wurde vermutet, in der serologischen Aufarbeitung konnten allerdings keine anti-thrombozytären Antikörper nachgewiesen werden (Testung mit PAK Lx von Immucor Medizinische Diagnostik). Auch die Genanalyse zeigte keine HPA-1, -2, -3, -4, -5, -6, -9 oder -15-Inkompatibilität.

Zur Abklärung wurden beim zweiten Kind weitere immunologische Tests durchgeführt. Ein MAIPA (monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens) mit Fremdspenderzellen konnte keine thrombozytären Antikörper nachweisen. Jedoch zeigte eine MAIPA-Cross-Match-Analyse zwischen maternalem Serum und paternalen Plättchen eine positive Reaktion mit $\alpha IIb\beta 3$, was auf eine Alloimmunisierung gegen ein seltenes Antigen hindeutet.

Der Patient Nr. 2 wurde als drei Monate altes männliches Neugeborenes vorgestellt (Gestationsalter 41+1 SSW). Er fiel durch spontane petechiale Hautblutungen bei einer Thrombozytenzahl von $284 \times 10^9/l$ und bilateralen Hämatomen nach i.m.-Impfung in beide Oberschenkel auf.

Die Thrombozytenfunktionsanalyse mit dem PFA-100 zeigte eine verlängerte Blutungszeit, die Thrombozytenaggregation war durchweg bei allen getesteten Stimuli (Adenosindiphosphat (2%), Kollagen (24%), Arachidonsäure (13%) und Epinephrin (13%)) beeinträchtigt. Bei Testung mit Ristocetin war die Aggregation beinahe normal (67%, mit 70% als unteres Limit des Normbereichs). Weiterhin wurde eine reduzierte Expression

des Integrins α IIb β 3 auf den neonatalen Thrombozyten festgestellt, was zur Diagnose Thrombasthenie Glanzmann führte. Molekulargenetische Untersuchungen ergaben eine compound heterozygote Missense-Mutation im *ITGB3*-Gen (siehe Kapitel 3.2.1, S. 36). Im Alter von elf Monaten wurde der Patient mit Schleimhautblutungen vorgestellt. Die Blutungen konnten nicht durch Verabreichung von Tranexamsäure oder rekombinant hergestelltem Faktor VII gestoppt werden, jedoch durch Thrombozyten- und Erythrozyten-transfusion.

Für die Arbeiten lag ein positives Votum der Ethikkommission vor (AZ 82/09 mit Amendment vom 8. April 2014).

2.2 Vorarbeiten

2.2.1 Sequenzierung der Patienten-DNA

Zur Sequenzierung der Patienten-DNA wurde genomische DNA aus peripheren Blutzellen oder Wangenabstrich nach den Herstellerangaben des BioRobot EZ1 Advanced XL (Quiagen, Hilden, Deutschland) gewonnen. Die α IIb- und β 3-kodierenden Regionen (*ITGA2B* und *ITGB3*-Gene) der genomischen DNA wurden bidirektional mit Primern, die in intronischen Sequenzen rund um die Exons binden, mittels PCR amplifiziert (siehe Tabelle 2.1 für *ITGB3*-Primer, Tabelle 2.2 für *ITGA2B*). Dafür wurde das Fast-Start High Fidelity PCR-System (Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, IN, USA) genutzt und anschließend die PCR-Produkte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Sciences, Valencia, CA, USA) aufgereinigt.

Die Sequenzierung erfolgte mittels des enzymatischen Kettenabbruchprinzips nach Sanger. Bei diesem Verfahren werden unterschiedlich lange Fragmente des zu sequenzierenden DNA-Abschnittes hergestellt. Das Reaktionsgemisch enthält neben den vier natürlichen DNA-Nukleotiden auch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide. Im Laufe der Synthese kann es zu zwei unterschiedlichen Ereignissen kommen: (1) Es wird ein dNTP eingebaut, dann endet der Strang auf eine 3'-Hydroxygruppe und weitere Nukleotide können angefügt werden. (2) Ein fluoreszenzmarkiertes Didesoxynukleotid wird eingebaut, das keine 3'-Hydroxygruppe enthält und die Kettensynthese bricht ab. Dadurch entstehen unterschiedlich lange Fragmente, an deren Ende immer ein Nukleotid steht, das durch unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe markiert ist. Anschließend werden die Kettenfragmente ihrer Größe nach mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Je länger das

Syntheseprodukt, desto langsamer läuft der DNA-Strang durch die Kapillare. Durch die fluoreszierenden Reportergruppen kann nachvollzogen werden, welche verschiedenen Basen an welcher Stelle der Sequenz stehen. Die Automatische Sequenzanalyse nach Sanger wurde bidirektional mit einem *Genetic Analyzer* (ABI 3100, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt.

Tabelle 1: Für Sequenzierung der Patienten-DNA verwendete ITGB3-Primer

S = Vorwärtsorientiert, R = Rückwärtsorientiert.

Primername	Sequenz	Annealing-Temperatur
Sur 1S	5'- CGT CTG TGG TAT GGT TAG GGT GTG -3'	70,4°C
Sur 1R	5'- GTT AGT ATT CCC AGC AAC ATC CCC ATG ACA GC -3'	83,1°C
Sur 2S	5'- CTC CAA TGT ACG GGG TAA ACT CTT AGC -3'	73,3°C
Sur 2R	5'- TGG AGC ACC TAC TAT GTC TGA AGG G -3'	69,3°C
Sur 3S	5'- GGA GGG TCA AGA GAT TAG AAG AGT AAT AG -3'	69,3°C
Sur 3R	5'- CTT AGG CTC CAT TGA CAC AAC ACT CCA GAT CC -3'	81,9°C
Sur 4S	5'- GGA GTC TGA ACT GTC TGG GTA ACT GTG G -3'	75,3°C
Sur 4R	5'- GGA ACA TCT GAG ACC ACT GAG GTT C -3'	70,2°C
Sur 5S	5'- GAA GAG AAT GAA ACT CCT GAA CTG G -3'	68,1°C
Sur 5R	5'- GTG ACA GTG AAG GCA GTG ATA ACA CC -3'	71,3°C
Sur 6-7S	5'- TTG TAG AGA TGG GGT CTT GCT ATG TTG C - 3'	76,0°C
Sur 6-7R	5'- GAG CAC ACG GAG AAG GCA GTA AGA C -3'	73,0°C
Sur 8S	5'- TAG ACG CAA GTG GAG ATG GAA AGA GG -3'	74,7°C
Sur 8R	5'- CTT ACG CAA CAG AAG CCT CAG -3'	57,7°C
Sur 9S	5'- TTC ATA TAG GGA AGG CTG AGG AAC TCC - 3'	74,5°C
Sur 9R	5'- CGT GAA AAG GGG ATT GGT CC -3'	56,1°C
Sur 10S	5'- ATC TTT TGC TCT ACA GTG GCT CCG -3'	59,0°C

Sur 10R	5'- GGA GGT TTG TAG TAG TTT CAC AGA GTG TCC -3'	59,8°C
Sur 11S	5'- AAT GAA GGA CCT GGG AGG CTT CTG GCT G -3'	65,4°C
Sur 11R	5'- ACT TGC TCC CTT TGC TTT GCA GGC TC -3'	63,7°C
Sur 12S	5'- TAC ATC AGT GAG TGT CAG TGA GTG GC -3'	60,0°C
Sur 12R	5'- GTA GAG ACA GGG TTT CAC CAT GTT GG -3'	59,2°C
Sur 13S	5'- GAC TTC TGA TTT GAG CCA CTC AGT G -3'	57,6°C
Sur 13R	5'- ATA GTG AGA CCA TCT CTC CCA GTT TCC -3'	59,2°C
Sur 14S	5'- GAA ACG GTG GCA GGA TGG CAT TCT ACC - 3'	63,2°C
Sur 14R	5'- CAC AGA CCC ACA CTT CCA CAT ACT GAC AT -3'	61,5°C

Tabelle 2: Für Sequenzierung der Patienten-DNA verwendete ITGA2B-Primer

S = Vorwärtsorientiert, R = Rückwärtsorientiert

Primernamen	Sequenz	Annealing-Temperatur
GPIIb Sur 1S	5'- GCC AGA GCT TTG TGT CCA CTG C -3'	61,1°C
GPIIb Sur 1R	5'- TGT AGT TTT CAG TGC CCA TCA GCC -3'	59,5°C
GPIIb Sur 2-4S	5'- TGA TTG CCC TCG CTG AGA GTC GGT TTC -3'	63,9°C
GPIIb Sur 2-4R	5'- AGG AGA CAA GGA GGA GGG GTC AG -3'	61,8°C
GPIIb Sur 5-7S	5'- GGA ACA CCC TGA GCC GCA TTT ACG -3'	62,3°C
GPIIb Sur 5-7R	5'- GCA AAT TAG TCT TTT CCA GGG GAG G -3'	57,9°C
GPIIb Sur 8-10S	5'- GCT CCC TTC CAC TGC GGA CTC GTA GC -3'	66,3°C
GPIIb Sur 8-10R	5'- GTG CA GCC ACT GAA TGC CCA AAA TAC G -3'	61,8°C
GPIIb Sur 11-12S	5'- GGG TAC AAG AAT GAT GCT CTC GCC -3'	59,7°C
GPIIb Sur 11-12R	5'- CTC AGC ACC CCA TCT GTC TAA GCC AC -3'	63,1°C
GPIIb Sur 13-18S	5'- AAC AAT CCT ACT TGG CAG GTC CCT CTC CC -3'	64,5°C

GPIIb Sur 13-14R	5'- GTC TTG GTC TGA GGT AGG ACA CAG C -3'	70,5°C
GPIIb Sur 15-17S	5'- GAT CCC ATG CCC TAATCG CCA ATT C -3'	78,3°C
GPIIb Sur 15-17R	5'- ATC TTG CTA CCA TAC ACA TCC CAC CTT C -3'	74,9°C
GPIIb Sur 18S	5'- CTG AAC CTG GAT CTG GGC GGA AAG CAC AG -3'	85,6°C
GPIIb Sur 13-18R	5'- CAA TCT GCC TGC CTC GGT CTC CCA AAG TGC -3'	67,2°C
GPIIb Sur 19-20S	5'- CTC TGA TGT AAA TTG ACA AAC CCT GAC -3'	56,0°C
GPIIb Sur 19-20R	5'- TGA CAG CAA AGC AGA AGA GAA GAG G -3'	58,8°C
GPIIb Sur 21-22S	5'- CAC TAG CAT GTG ACA GTC CCT TGA GAC C -3'	61,9°C
GPIIb Sur 21-22R	5'- TCC AAC TCC TGA CCT CCA GTG ATC CTT C -3'	62,7°C
GPIIb Sur 23-26S	5'- GCC TGG TTC CCT TTC TTC CTC AGA G -3'	61,0°C
GPIIb Sur 23-26R	5'- TGC TCC TCC ATG TTC ACT TGA AG -3'	57,1°C
GPIIb Sur 27-29S	5'- CAT CTC TGG GAC TAT GTG AGC AAG C -3'	59,1°C
GPIIb Sur 27R	5'- TGA AAG CCG TTT ACA CCC ACA AGA GG -3'	77,2°C
GPIIb Sur 28S	5'- CAC TTT GCT CTG GGA GGG GCG GGG TTT -3'	86,5°C
GPIIb Sur 28R	5'- AGC ACA CCC ACC AGC ACC CAC CAG ATT G -3'	85,6°C
GPIIb Sur 29S	5'- AGT CAG TGC CCA GCC ACA AAA GTC TGA GG -3'	81,6°C
GPIIb Sur 27-29R	5'- CAA AGT GCT GGG ATT ACA GGT GTG AGC -3'	61,5°C
GPIIb Sur 30S	5'- CTC TGT ACT CCC TGA CAC TCC CCA AAG ACA G -3'	63,8°C
GPIIb Sur 30R	5'- AGG CAT CCA TTT GTG AGT ACA GTG GGC -3'	62,6°C

2.2.2 Quantifizierung der α Ib β 3-Oberflächenexpression auf Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie

Die Expressionslevel der α Ib β 3-Integrine wurden im Rahmen der Routinediagnostik mithilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Bei diesem Messverfahren fließt ein laminarer Strom, der die zu messenden Zellen enthält, durch einen Laserstrahl hindurch. Durch die Ablenkung des Lichts können Aussagen über die Zellgröße (durch das Vorwärtsstreulicht, *FSC*) und Granularität (durch das Seitwärtsstreulicht, *SSC*) getroffen werden. Passiert eine Zelle die Messküvette, nehmen Messdioden die Änderung im Streulicht wahr. Weitere Informationen können gewonnen werden, wenn die Zellen zuvor mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert wurden. Der fluoreszierende Farbstoff ist an einen Sekundärantikörper gebunden, mit dem Primärantikörper detektiert werden können. Primärantikörper können gegen verschiedene Epitope auf Zelloberflächenprotein gerichtet sein, dadurch erlaubt die Durchflusszytometrie Rückschlüsse auf die Integrinexpression der gemessenen Zellen.

Der Laser regt den an den Sekundärantikörper konjugierten Farbstoff bei einer bestimmten Wellenlänge an. Die Elektronen des Farbstoffes werden dadurch auf ein höheres Energieniveau gehoben und fallen nach einer kurzen Zeit wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau ab, wobei sie Licht einer spezifischen anderen Wellenlänge aussenden. Dieses Emissionsspektrum kann durch Detektoren (*photomultiplier tubes*) registriert, amplifiziert und in digitale Signale umgewandelt werden. Mit Computersoftware können aus den Daten Histogramme erstellt werden, die die Zellzahl gegen die Fluoreszenz und damit die Expressionsrate auftragen.

Die Expressionslevel des α Ib β 3-Integrins auf Thrombozyten des Patienten wurde aus thrombozytenreichen Plasma bestimmt. Hierfür wurde Citratblut des Patienten bei 800 g für 20min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Messung erfolgte mithilfe verschiedener monoklonaler Antikörper nach Herstellerangaben an einem FACSCanto II der Firma Becton-Dickinson. Die Daten wurden durch die Software FACS Diva™ Software ausgegeben. Die weitere Analyse erfolgte mit der Flowing Software Version 2.5.1 (Perttu Terho, Turku Bioimaging).

2.3 Herstellung von Expressionsvektoren für α , α IIb und β 3

Die Punktmutationen *ITGB3* p.Gln132Arg und *ITGB3* p.Cys460Trp wurden mittels Site-directed Mutagenesis in die β 3-cDNA im Expressionsvektor pcDNA™3.1/V5-His-TOPO® (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) eingebracht. Es wurden Primer mit einer Länge von 31 Nukleotiden definiert, die die zu mutierende Base in der Mitte der Sequenz enthalten (siehe Tabelle 2.2).

Tabelle 3: Mutagenese-Primer

Die mutagene Base ist unterstrichen. Alle Primer stammen von Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany.

AS-Substitution	Nukleotid-Substitution	Orientierung	Sequenz	Annealing-Temperatur
Gln132Arg	c.473A>G	Vorwärts	5'-ATCTGTGGAGCATCC <u>G</u> - GAACCTGGGTACCAA-3'	70,8°C
		Rückwärts	5'-TTGGTACCCAGGTTCC <u>G</u> - GATGCTCCACAGAT-3'	70,8°C
Cys460Trp	c.1458C>G	Vorwärts	5'-TGAGTGTGGGG- TATG <u>G</u> CGTTGTGGGCCTGGC-3'	74,8°C
		Rückwärts	5'-GCCAGGCCCAAC- G <u>C</u> CATACCCCACTCA-3'	74,8°C

In einer PCR (Initiale Denaturierung für 30 s bei 95 °C, 12 Zyklen mit Denaturierung für 30 s bei 95 °C, Annealing für 1min. bei 55 °C, Elongation für 12 min. bei 65 °C) wurden anschließend nach den Herstellerangaben des QuikChange II Kits (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) Oligonukleotide anhand des Templates synthetisiert, die die Substitution enthalten. Anschließend wurde die cDNA mit der eingebrachten Mutation jeweils in pcDNA4/HisMax®-TOPO® (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) umklontiert.

Dazu wurde 4 μ l des PCR-Produktes zusammen mit je 1 μ l Salt Solution und Topovector für 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 2 μ l dieses Ansatzes zu 50 μ l One Shot TOP10 chemisch kompetenter Escherichia-coli-Zellen (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) pipettiert und für 30 min. auf Eis gelagert. Im 42 °C-Wasserbad wurden die Zellen nun für 30 s einem Hitzeschock ausgesetzt, damit die Bakterien das

Plasmid aufnehmen. Sofort danach wurden die Zellen wieder auf Eis gelagert, 500 μ l S.O.C.-Medium (ThermoFisher Scientific, Carlsbad, USA) zugegeben und für eine Stunde bei 225 rpm bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Dadurch wurden die Zellen selektiert, die das Plasmid aufgenommen hatten, da der Vektor ein Gen für Ampicillinresistenz enthält.

Die richtige Orientierung, das Vorhandensein der Mutation und die Abwesenheit von relevanten anderen Mutationen wurde mittels Sequenzierung nach Sanger (ausführliche Erklärung siehe Kap. 2.2.1) überprüft. Die Sequenzen wurden mit publizierten DNA-Sequenzen abgeglichen. Für *ITGAV* war dies die Referenzsequenz ENSG00000138448, für *ITGA2B* ENSG0000005961 und für *ITGB3* ENSG00000259207. Es fanden sich keine zusätzlichen Polymorphismen im eingebrachten β 3-DNA-Molekül, die in einem Aminosäureaustausch resultieren. Expressionsvektoren für das Wildtyp- α v und - α IIb waren im Labor vorhanden (Wihadmadyatami et al., 2015).

2.4 Generierung stabiler Transfektanten

2.4.1 Zellkultur

HEK293F-Zellen (American Type Tissue Collection) wurden in supplementiertem DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, Glucose 4,5 g/l, Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin (PAN-Biotech, Aidenbach, Germany) bei einer konstanten Temperatur von 37 °C, 5 % CO₂ und mindestens 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium erneuert, bevor eine Kultur vollständige Konfluenz erreicht hatte.

2.4.2 Kotransfektion

Die Kotransfektion wurde mit dem jetOPTIMUS Transfektionskit (Polyplus, Illkirch, Frankreich) nach Herstellerangaben durchgeführt. Unter stabiler Transfektion wird das dauerhafte Einbringen von fremder DNA in das Genom eukaryonter Zellen verstanden. Bei Kotransfektionen werden gleichzeitig zwei Plasmide eingebracht, in diesem Fall, um die Ausbildung des α IIb β 3- bzw. α v β 3-Heterodimers zu ermöglichen. Zusammen mit dem β 3-allelischen pcDNA3.1-Konstrukt (Wildtyp oder mutiert) wurde deshalb in

äquimolarer Menge ein α Ib- oder α v-Wildtyp-Plasmid (pcDNA4 mit Zeocinresistenz) eingebracht.

Auf einer 100 mm-Petrischale wurden 2,25 Mio. Zellen ausgesät und über Nacht im CO₂-Butschrank inkubiert. Nach Erreichen von 60-80 % Konfluenz konnte am folgenden Tag transfiziert werden. Dazu wurde das Zellmedium durch jetOPTIMUS Medium Serum ersetzt. Der Transfektionsmix, bestehend aus 1 ml jetOPTIMUS Puffer, 10 μ g DNA und 10 μ l jetOPTIMUS wurde nach 10 min. Inkubation bei Raumtemperatur tröpfchenweise zu den Zellen gegeben. Die Petrischale wurde anschließend für 4 h im Zellkulturinkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurde die Transfektionsreaktion durch Zugabe FCS-haltigen Mediums gestoppt.

Um die Zellen, die beide Plasmide und damit auch beide Resistenzgene aufgenommen haben, zu selektieren, wurde nach 24-48 h antibiotikahaltiges Medium (Zeocin 200 μ g/ml und Geneticin 400 μ g/ml) zugegeben. Tabelle 2.3 gibt einen Überblick über die verwendeten Zelllinien.

Tabelle 4: Verwendete Zelllinien

Alle Zellen sind Humane Embryonalen Nierenzellen (HEK293F) aus der American Tissue Collection.

Zelllinie	α -Allel	β -Allel	Resistenz
HEK293F untransfiziert	-	-	Keine
αIbβ3 Wildtyp	Wildtyp- α Ib in pcDNA4	Wildtyp- β 3 in pcDNA3.1	Geneticin und Zeocin
αvβ3 Wildtyp	Wildtyp- α v in pcDNA3.1	Wildtyp- β 3 in pcDNA3.1	Geneticin
Wo αIb/β3(Arg132)	Wildtyp- α Ib in pcDNA4	Arg132- β 3 in pcDNA3.1	Geneticin und Zeocin
Wo αv/β3(Arg132)	Wildtyp- α v in pcDNA4	Arg132- β 3 in pcDNA3.1	Geneticin und Zeocin
GT2 αIb/β3(Trp460)	Wildtyp- α Ib in pcDNA4	Trp460- β 3 in pcDNA3.1	Geneticin und Zeocin
GT2 αv/β3(Trp460)	Wildtyp- α v in pcDNA4	Trp460- β 3 in pcDNA3.1	Geneticin und Zeocin

2.4.3 Fluoreszenzaktiviertes Zell-Sorting

Vor den immunologischen Tests wurden die Zellen, wenn sie mehrere Populationen unterschiedlich hoher Integrinexpression in der Durchflusszytometrie aufwiesen, gesortet. Dies war der Fall bei folgenden Zelllinien: α IIb β 3 Wildtyp, Wo α IIb/ β 3(Arg132) und GT2 α IIb/ β 3(Trp460).

Unter Sorten versteht man das Separieren lebender Zellen nach spezifischen Merkmalen, in diesem Fall der Expressionsrate des α IIb β 3-Heterodimers. Die Vorbereitung der Zellen entsprach den Vorbereitungen für Messungen am Durchflusszytometer und beinhaltete das Ablösen der Zellen, Waschschritte, Bindung von Primär- und Sekundärantikörper und Aufnahme in Cellfix (siehe Kap. 2.2.2, S. 22). Gesortet wurde mit dem monoklonalen Antikörper Gi5 (markiert mit AlexaFluor 488) an einem BD FACS ARIA III mit FACS-Diva Version 6.1.3.

Im Unterschied zur herkömmlichen Durchflusszytometrie wird die Zellsuspension beim Sorten in einer Vibrationskammer in kleine Tröpfchen zerstäubt, sodass sie idealerweise eine einzelne Zelle enthalten. Diese Tröpfchen passieren einen Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm. Durch diese Messung wird die Zugehörigkeit der enthaltenen Zelle zu den zu sortenden Populationen identifiziert und das Tröpfchen erhält je nach Messwert eine elektrische Ladung. Anschließend werden die Zellen abhängig von ihrer elektrischen Ladung in einem elektrischen Feld aufgetrennt und in verschiedene Sammelgefäße geleitet.

2.5 Immunologische Analyse der Oberflächenproteine

2.5.1 Durchflusszytometrie von Thrombozyten und HEK-Zellen

Die Expressionslevel der Proteine wurden mithilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Für das Prinzip der Durchflusszytometrie siehe Kap. 2.2.2: Quantifizierung der α IIb-Oberflächenexpression auf Thrombozyten in der Durchflusszytometrie.

Die Testung der Thrombozyten zur Quantifizierung der α IIb β 3-Expression folgte einem anderen Protokoll (s. Kap. 2.2.2, S. 22) als die Testung mit anti-HPA-1a-Antikörpern. Im Folgenden wird der Versuchsablauf für die Testung mit anti-HPA-1a-Antikörpern dargestellt. Die Thrombozyten wurden aus EDTA-Blut gewonnen. Jeweils 20×10^6 gewaschene Thrombozyten wurden mit $0,4 \mu\text{g}$ des jeweiligen monoklonalen Antikörpers in 50

µl Rinderalbumin (Dulbecco PBS von Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Germany und 0,2 % BSA von Serva, Heidelberg, Germany) für 30 min. bei 4 °C inkubiert. Nach einem Waschschrift (Zugabe von 300 µl Rinderalbumin, Zentrifugation bei 6200 rpm für 1 min.) wurden die Thrombozyten mit Fluoresceinisothiocyanat(FITC)-markiertem Ziege anti-human IgG (Dianova, Hamburg, Deutschland, Verdünnung 1:50) für 30 min bei 4 °C angefärbt. Anschließend wurden die markierten Zellen in 200 µl Cellfix (Becton and Dickinson) resuspendiert und an einem FACSCanto II durchflusszytometrisch analysiert. Die Ausgabe der Daten erfolgte mit FACSDiva (Becton and Dickinson), die Auswertung mit Flowing Software Version 2.5.1 (Perttu Terho, Turku Bioimaging).

Die HEK293F-Zellen wurden mit 1 ml Accutase aus den Kulturflaschen abgelöst und mit PBS gewaschen. Pro Versuchsansatz wurden 300 000 Zellen in 50 µl Rinderalbumin aufgenommen. Anschließend wurden 20 µl monoklonale Antikörper (Konzentration: 20 µg/ml), respektive 20 µl Überstand, von antikörperproduzierenden Zellen zum Ansatz gegeben und für 30 min. bei 4 °C inkubiert. Weitere Details der verwendeten monoklonalen Primärantikörper finden sich in Tabelle 5. Nach der Inkubationszeit wurden ungebundene Antikörper durch einen Waschschrift (Zugabe von 500 µl Rinderalbumin, Zentrifugation bei 8000 rpm für 1 min. und Absaugen des Überstandes) entfernt. Anschließend wurde der Sekundärantikörper zugegeben (mit Alexa Fluor 488 konjugierter Esel anti-Maus-IgG (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) oder FITC-markierter Ziege anti-human IgG (Dianova, Hamburg, Deutschland); 1:50 verdünnt in 50 µl Rinderalbumin) und die Ansätze für 30 min. bei 4 °C inkubiert. Anschließend folgte ein weiterer Waschschrift. Nun wurden die Zellen durch Zugabe von 100 µl Cellfix fixiert. Anschließend wurde 200 µl Cellfix in Glasröhrchen vorgelegt und die Zellsuspension zugegeben. Für die weitere durchflusszytometrische Analyse siehe oben.

Tabelle 5: Bei der Durchflusszytometrie verwendete monoklonale Primärantikörper

Für verwendete Sekundärantikörper siehe Text.

Antikörper	Zielantigen	Herkunft
Gi5	αIIbβ3-Komplex	Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin Gießen

23C6	$\alpha\beta$ -Komplex	Millipore (Temecula, CA, USA)
AP3	β 3-Integrin (AS 348-421)	Hybridoma-AP3-Zelllinie (ATCC HB-242, Wessel, Deutschland)
SZ21	β 3-Integrin (AS 30, 32, 33, 39)	Beckman Coulter (Marseille, Frankreich)
26.4	β 3-Integrin (AS 30, 32, 33, 39, 470)	Dr. Bjørn Skogen (Prophylix Pharma AS, Tromsø, Norwegen)
B2G1	β 3-Integrin (AS 30, 32, 33, 39, 446, 470)	Dr. Celdric Ghevaert (NHS Blood and Transplant, Cambridge, Vereinigtes Königreich)

2.5.2 Präparation von Gesamtproteinextrakten

Zur Herstellung der Proteinlysate aus HEK-Zellen wurden diese mit Accutase abgelöst, mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 min) und in ein 1,5 ml-Tube überführt. Auf ca. 2 Mio. Zellen wurden jeweils 100 μ l Lysepuffer (bestehend aus 95,7 μ l IBP (siehe Tabelle 2.5), 3,3 μ l Protease Inhibiting Cocktail (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland), 1 μ l 100-millimolares Phenylmethylsulfonylfluorid (ThermoFisher Scientific, Carlsbad, USA)) pipettiert und nach kurzem Vortexen für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer bei 13 000 rpm bei 4°C für 30 min abzentrifugiert und der proteinhaltige Überstand in ein neues Tube überführt. Um einheitliche Probenverdünnungen herstellen zu können, wurde ein BCA-Assay zur Proteinkonzentrationsbestimmung nach Herstellerangaben (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific, Rockford, USA) durchgeführt.

Tabelle 6: Herstellung von IPB

	Konzentrationsangaben	Hersteller
3,03 g Tris	50 mM	Roth, Karlsruhe, Deutschland
4,38 g NaCl	150 mM	Roth, Karlsruhe, Deutschland
In 400 ml destilliertem Wasser lösen, mit rauchender HCl auf 7,4 einstellen		
5 ml Triton X-100	1 %	Janssen, Neuss, Deutschland
Triton X-100 zugeben und mit destilliertem Wasser auf 500 ml auffüllen		

2.5.3 SDS-Page

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülmasse wurde im Anschluss eine Sodi- undodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Das verwendete diskontinuierliche Elektrophoresesystem bestand aus einem 5 %igen Sammelgel (zum Konzentrieren der Proteine) und einem 7,5 %igen Trenngel (zum Auftrennen der Proteine). Die Proteinlysate wurden mit PBS auf eine Konzentration von 1 µg/µl in 10 µl verdünnt, mit 10 µl 2x nicht-reduzierendem Probenpuffer versetzt, für 5 min. bei 99 °C denaturiert und anschließend in die Probenslots des Gels aufgetragen. Als Standard wurden 7 µl PageRuler Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific, Produktnummer 26616, Carlsbad, USA) verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei 30 mA für 90 min. in 1x Laufpuffer (Rotiphorese, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland).

2.5.4 Immunblot mit HEK-Zellen

Hierfür wurden die im Gel aufgetrennten Proteine unter halbtrockenen Bedingungen (*semidry*) auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid-Membran; Roth, Karlsruhe) transferiert und mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen. Die Membran wurde in Methanol aktiviert und mit dem Gel für 5 min. in Puffer B äquilibriert. Der Western-Blot bestand aus drei mit Puffer A befeuchteten Filterpapieren, darauf drei mit Puffer B befeuchteten Filterpapieren, der Membran, dem Gel und drei mit Puffer C befeuchteten Filterpapieren. Zur Zusammensetzung der Transferpuffer siehe Tabelle 2.6.

Tabelle 7: Transferpuffer für Semidry-Blot

Puffer A	36,3 g Tris	800 ml Aqua dest.	200 ml Methanol
Puffer B	3,03 g Tris	800 ml Aqua dest.	200 ml Methanol
Puffer C	5,2 g ε-Aminocaprinsäure	800 ml Aqua dest.	200 ml Methanol

Um verbliebene Luftblasen zu entfernen, wurde ein Polyröhrchen über den Stapel gerollt. Der Transfer erfolgte bei einer Spannung von 90 mA für 45 min. Im Anschluss wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockierlösung (1,5% BSA in ECL-Waschlösung, siehe Tabelle 2.7) inkubiert, um die nicht-besetzten Bindungsstellen der Membranoberfläche zu blockieren. Danach wurde die Membran über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper verdünnt in Blockierlösung (20 µl Serum, bzw. 5 µg moAb oder 100 µl Überstand für 2 ml Blockierlösung) inkubiert. Details zu den verwendeten

monoklonalen Primärantikörper finden sich in Tabelle 2.8. Nach fünf Waschschritten mit ECL-Waschpuffer folgte die Inkubation der Membran für 45 min. mit dem HRP-markierten Sekundärantikörper (Esel-anti-Maus-Antikörper; Dianova (Hamburg, Deutschland)) 1:50 000 verdünnt in Blockierlösung inkubiert.

Tabelle 8: Herstellung des ECL-Puffers

	Konzentrationsangaben	Hersteller
2,423 g Tris	20 mM	Roth, Karlsruhe, Deutschland
9 g NaCl	155 mM	Roth, Karlsruhe, Deutschland
pH mit rauchender HCl auf 7,4 einstellen		
Tween-20	0,05 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mit destilliertem Wasser auf 1 l einstellen		

Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, folgte ein weiterer Waschschr. Die gebundenen Sekundärantikörper wurden mit Hilfe eines Chemolumineszenz-Nachweises (Pierce ECL Plus WB ReagenzKit, Pierce/Thermo Scientific, Rockford, US) nach Herstellerangaben nachgewiesen. Der Standard wurde mit dem WesternBright ChemiPen (Katalognr. R-07055-001, Advansta Inc., San José, USA) markiert, anschließend die Membran für 5 min in 6 ml Detektionslösung inkubiert, die überschüssige Lösung entfernt und die Membran zwischen Klarsichtfolienblätter gelegt. Die Membran wurde für 14 min. an einem FluorChem2-Gerät (FluorChem FC2 Imaging System, Alpha Innotech, Kasendorf, Deutschland) entwickelt.

Tabelle 9: Im Immunblot verwendete monoklonale Primärantikörper

Antikörper	Zielantigen	Herkunft
AP3	β 3-Integrin (AS 348-421)	Hybridoma-AP3-Zelllinie (ATCC HB-242, Wesel, Deutschland)
SZ21	β 3-Integrin (AS 30, 32, 33, 39)	Beckman Coulter (Marseille, Frankreich)
SZ22	α IIb-Integrin	Beckman Coulter (Marseille, Frankreich)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphate-Dehydrogenase	Halcyon (South Logan, UT, USA)

2.5.5 Antigen Capture Assay

Um die Reaktivität der Oberflächenproteine auf den Kulturzellen mit verschiedenen Seren zu überprüfen, wurde ein *Antigen Capture Assay* nach einem modifizierten MAIPA-Protokoll (*Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens*) durchgeführt (Kiefel et al., 1987). Dafür wurde am Vortag eine Mikrotiterflachbodenplatte mit Ziege-anti-Maus-IgG (100 µl pro Well; Verdünnung: 3 µg/ml in Beschichtungspuffer (bestehend aus 0,3975 g Na₂CO₃, 0,7325 g NaHCO₃, 0,05 g NaN₃, in 250 ml Aqua dest. Lösen und pH auf 9,6 einstellen)) beschichtet und bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die HEK-Zellen geerntet und mit 0,2 % BSA (Serva, Heidelberg, Deutschland) enthaltendem Dulbecco's PBS (Thermo Fisher Scientific, Langensfeld, Deutschland) auf 3 x 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Nun wurden 50 µl Patientenserum und 100 µl HEK-Zellen kurz gevortext und für 30 min. bei 37 °C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS/0,2 % BSA wurden 50 µl PBS/2 % BSA und 10 µl monoklonaler Antikörper (AP3 bzw. Gi5 als *Capture Antibody*; 0,02 mg/ml) zugegeben. Nach erneuten 30 min. Inkubation und drei weiteren Waschschriften mit PBS/0,2 % BSA wurde 100 µl Lysepuffer (siehe Tabelle 2.9, mit 5 % Proteaseinhibitorcocktail von Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) zum Pellet gegeben, resuspendiert und anschließend für 30 min. bei 4 °C inkubiert. Hiernach Abzentrifugation bei 13000 rpm für 30 min. und Überführung von 70 µl Überstand in 180 µl 4 °C temperierten MAINA-Waschpuffer mit 0,2 % BSA (siehe Tabelle 2.10).

Tabelle 10: Herstellung des Lysepuffers

1,2 g	Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
4,38 g	NaCl	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland
4,75 ml	Triton x-100	Janssen, Neuss, Deutschland
0,93 g	Titriplex	Merck, Darmstadt, Deutschland
In 500 ml Aqua dest. lösen, pH auf 7,4 einstellen.		

Tabelle 11: Herstellung des MAINA-Waschpuffers

1,21 g	Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
9,5 ml	Triton x-100	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland
4,5 ml	Tween 20	Roth, Karlsruhe, Deutschland
72,5 mg	CaCl ₂ ·2H ₂ O	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland
In 1 l NaCl lösen, pH auf 7,4 einstellen.		

In der Zwischenzeit wurde die am Vortag beschichtete Flachbodenplatte mit 200 µl PBS/0,2 % BSA pro Well für eine Stunde bei 4 °C blockiert und fünf Mal mit PBS/0,05 % Tween 20 gewaschen. Auf diese Platte wurden anschließend jeweils zweimal 100 µl der Lysatverdünnung pipettiert und MAINA-Waschpuffer als Leerwert verwendet. Anschließend wurde die Platte über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die Mikrotiterplatte fünf Mal mit PBS/0,05 % Tween 20 gewaschen und der Sekundärantikörper zugegeben (100 µl Ziege-anti-human-Antikörper; 1:4000 verdünnt in MAINA-Waschpuffer/0,2 % BSA). Nach 2 h Inkubation bei 4 °C und sechs Waschschritten wurden 100 µl Substratpuffer (3 ml Aqua dest., 1 o-Phenylenediamin-dihydrochlorid-Tablette, 1,25 µl H₂O₂) pro Well zugegeben und bei Raumtemperatur für 15 min. bei Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 50 µl 4N H₂SO₄ abgestoppt und die optische Dichte bei 490/620 nm photometrisch bestimmt. Alle Experimente wurden doppelt, bzw. dreifach durchgeführt, und die Ergebnisse wurden als arithmetisches Mittel der optischen Dichte angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Punktmutation *ITGB3* c.473A>G

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse zur Untersuchung der Punktmutation c.473A>G im $\beta 3$ -Integrin bei einem Patienten mit Neonataler Alloimmunthrombozytopenie vorgestellt.

3.1.1 Nachweis eines Nukleotidaustausches (c.473A>G)

Nachdem der MAIPA zwischen mütterlichem Serum und väterlichen Plättchen eine positive Reaktion mit dem Integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ gezeigt hatte, wurden die kodierenden Genabschnitte für die Integrine αIIb und $\beta 3$ (*ITGA2B* bzw. *ITGB3*) des Vaters, der Mutter und des Patienten vollständig sequenziert. Ein Einzelnukleotid-Polymorphismus in diesen Genen mit resultierendem Aminosäureaustausch kann eine Alloimmunisierung gegen ein bisher unbekanntes seltenes Antigen verursachen. Um Rückschlüsse ziehen zu können, ob beim Patienten „Wo“ ein Einzelnukleotid-Polymorphismus vorliegt, wurde das Ergebnis mit publizierten Sequenzen verglichen.

Dabei zeigte sich sowohl beim Vater als auch beim betroffenen Kind eine heterozygote Punktmutation im Exon 4 von *ITGB3*. Diese Mutation ist in Abbildung 4 dargestellt. Der Nukleotidaustausch c.473A>G wandelt das natürlich vorkommende Basentriplet CGG (kodierend für Arginin; vorhanden bei Wo^{a} -positiven Individuen) zu CAG (kodierend für Glutamin; vorhanden bei Wo^{a} -negativen Individuen) um und führt damit zum Aminosäureaustausch *ITGB3* p.Gln132Arg. Die Sequenzvariation wurde unter der Zugangsnummer MN624129 bei GenBank hinterlegt, unter rs_748901429 ist die Variation in der *SNP*-Datenbank zu finden. Im *ITGA2B* wurde keine Sequenzvariation festgestellt.

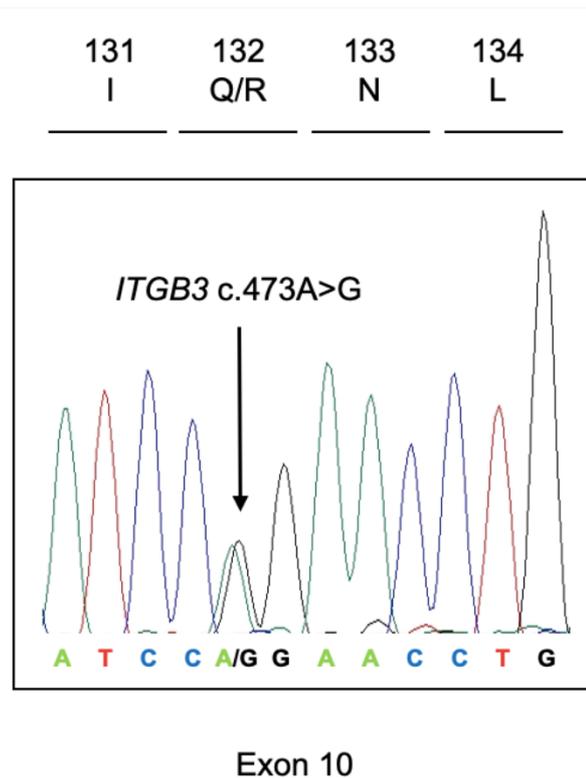


Abbildung 4: Nukleotidsubstitution c.473A>G

Statt der Base Arginin findet sich Guanin im Exon 4 in der Sequenz. Sequenzanalyse nach Sanger aus paternaler Plättchen-DNA. Die Nummerierung innerhalb von *ITGB3* bezieht sich dabei auf die Referenzsequenz ENSG00000259207.

3.1.2 Anti-Wo(a) erkennt spezifisch *ITGB3* p.Gln132Arg

Um zu bestätigen, dass der aus dem Einzelnukleotid-Polymorphismus c.473A>G resultierende Aminosäureaustausch p.Gln132Arg ursächlich für die Reaktion des mütterlichen Immunsystems auf die kindlichen Zellen war und das Wo(a)-Epitop bildet, wurde ein glykoproteinspezifischer Enzymtest durchgeführt. Dafür wurden durch Transfektion HEK-293F-Zellen hergestellt, die das α IIB β 3-Integrin mit dem Aminosäureaustausch auf der Zelloberfläche exprimieren. Zellen, die entweder dieses mutierte α IIB β 3 (Arg132; Wo(a)) oder Wildtyp- α IIB β 3 (Gln132) auf ihrer Oberfläche exprimierten, wurden auf Reaktivität mit mütterlichem Serum untersucht. Das mütterliche Serum reagierte spezifisch mit den mutierten HEK-293F-Zellen, jedoch nicht mit den Wildtyp-Zellen. Damit ließ sich bestätigen, dass das Wo(a)-Epitop durch die Gln132Arg-Mutation gebildet wird.



Abbildung 5: Serologische Bestätigung des Wo(a)-Epitops

Inkubation von HEK-293F-Zellen, die das mutierte oder Wildtyp-Oberflächenprotein exprimieren, mit dem mütterlichen Serum (anti-Wo(a)) oder Serum, das anti-HPA-1a-Antikörper enthielt. Als Kontrolle wurde Serum eines gesunden Blutspenders mit der Blutgruppe AB verwendet. Nach Zelllyse wurde das α IIb β 3-Integrin mit dem komplexspezifischen monoklonalen Antikörper Gi5 auf einer Platte immobilisiert. Der Antikörper Gi5 wurde nun durch einen HRP-markierten Sekundärantikörper gebunden und nachgewiesen. Die optische Dichte (OD) wurde bei 492 nm bestimmt. Wildtyp-HPA-1a-HEK-293F-Zellen (Gln132, grau) und mutierte HPA-1a-HEK-293F-Zellen (Arg132, schwarz) reagierten beide mit anti-HPA-1a-Serum (OD $4,19 \pm 0,19$, beziehungsweise $4,32 \pm 0,16$). Im Gegensatz dazu reagierten nur die mutierten Zellen auf das anti-Wo(a)-Serum (OD $4,11 \pm 0,47$), nicht jedoch die Wildtyp-Zellen (OD $0,14 \pm 0,19$). Alle Daten sind Mittelwerte \pm 1 SD, n = 3 unabhängige Experimente.

3.2 Punktmutation *ITGB3* c.1458C>G

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse zur Untersuchung der Punktmutation c.1458C>G im $\beta 3$ -Integrin bei einem Patienten mit Thrombasthenie Glanzmann vorgestellt. Die molekulargenetische Charakterisierung dieses Patienten wurde 2014 von Sandrock-Lang et al. unter der Bezeichnung GT2 publiziert (Sandrock-Lang et al., 2015).

3.2.1 Molekulare Analyse der α IIb(*ITGA2B*)- und $\beta 3$ (*ITGB3*)-Gene

Die Erkrankung Thrombasthenie Glanzmann wird durch homozygote oder compound heterozygote Mutationen in den Genabschnitten, die für die Integrine α IIb und $\beta 3$ kodierenden, verursacht. Deshalb wurden diese Genabschnitte (*ITGA2B* und *ITGB3*) des Patienten mit Vorwärts- und Rückwärtsprimern vollständig sequenziert. Das Ergebnis verglichen wir mit den publizierten DNA-Sequenzen (NM_000212.2 für *ITGB3* und NM_000419.5 für *ITGA2B*).

Im *ITGA2B*-Gen wurde keine Sequenzvariation festgestellt.

Die Sequenzierung der für die $\beta 3$ -Untereinheit kodierenden Exone zeigte zwei Missense-Mutationen: Eine Mutation c.31T>C fand sich im Exon 1, sie führt zum Aminosäureaustausch Trp11Arg (nicht abgebildet). Diese Mutation befindet sich im Signalpeptid des Integrins $\beta 3$. Es ist deshalb denkbar, dass sie mit der Translokation in oder durch Zellmembranen interferiert und zu einer Abwesenheit der betroffenen Proteine auf der Zelloberfläche führt.

Eine Mutation c.1458C>G fand sich zudem im Exon 10. Sie befindet sich in der I-EGF1-Domäne und führt zum Aminosäureaustausch p.Cys460Trp (Abbildung 6). Bei Sequenzierung der elterlichen DNA fand sich die Trp11Arg-Mutation bei der Mutter und die Cys460Trp-Mutation beim Vater, was darauf hindeutet, dass alle α IIb $\beta 3$ -Kopien des Patienten eine der beiden Mutationen tragen. In der direkten Umgebung der Cys460Trp-Mutation finden sich Aminosäuren, die für einige HPA-1a-Epitope unerlässlich sind. Das Cys460 geht im Wildtyp-Protein mit dem Cys448 eine Disulfidbrücke ein, die bei Substitution durch Tryptophan nicht entstehen kann. Es ist möglich, dass diese Änderung in der Primärstruktur weitreichende Auswirkungen auf die Sekundärstruktur von HPA-1a-Epitopen hat. Deshalb wurde die Mutation Cys460Trp bei einem Patienten mit Thrombasthenie Glanzmann für weitere Untersuchungen ausgewählt.

Die Sequenzanalyse zeigte, dass der Patient an Position 176 in Exon 3 homozygot für Cytosin ist, das für Leu33 kodiert. Damit ist der Patient HPA-1aa (siehe Abbildung 6).

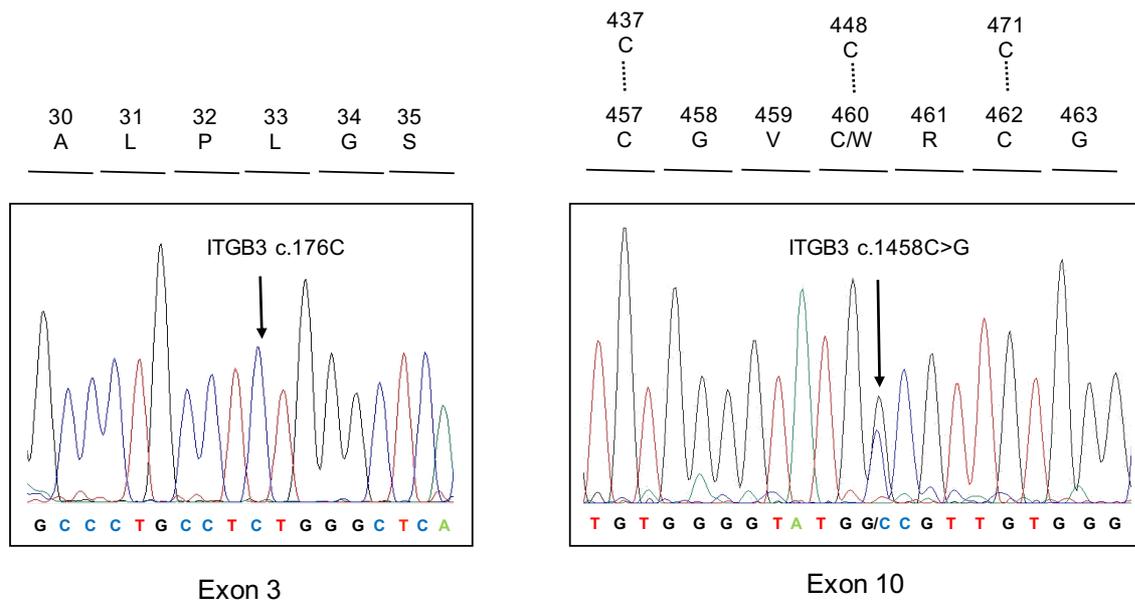


Abbildung 6: Sequenzierung des *ITGB3*-Gens: Leu33-Polymorphismus und Nukleotidsubstitution c.1458C>G

Sequenzanalyse nach Sanger aus DNA des Patienten. In der Sequenz fand sich statt der Base Cytosin Guanin in Exon 10. Die Positionen der drei Disulfidbrückenbindungen $C^{437}-C^{457}$, $C^{448}-C^{460}$ und $C^{462}-C^{471}$ sind dargestellt. Im Exon 3 fand sich das Basentriplet CTG, das für Leucin33 kodiert. Damit ist der Patient homozygot für HPA-1a. Im *ITGA2B*-Gen befanden sich keine Mutationen.

Anschließend wurde überprüft, ob die Mutationen die Expression des Glykoproteins $\alpha\text{IIb}\beta_3$ auf Thrombozyten des Patienten und seines Vaters im Vergleich zu einem Normalspender quantitativ verändern (siehe Abbildung 7). Der Patient zeigte eine reduzierte Expression von $\alpha\text{IIb}\beta_3$, der Vater im Vergleich zu einem gesunden Spender eine normale Expression. Dies lässt vermuten, dass die Trp11Arg-Mutation verhindert, dass $\alpha\text{IIb}\beta_3$ -Kopien mit dieser Mutation exprimiert werden, $\alpha\text{IIb}\beta_3$ -Kopien mit der Cys460Trp-Mutation jedoch auf der Zelloberfläche exprimiert werden können. Aufgrund dieser Ergebnisse kann die Erkrankung des Patienten als Thrombasthenie Glanzmann Typ 2 klassifiziert werden.

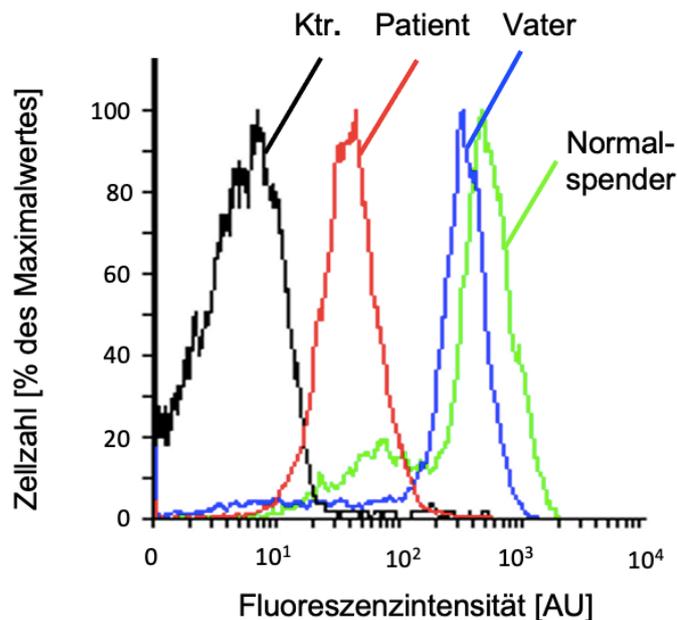


Abbildung 7: α IIb β 3-Expression auf den Thrombozyten des Patienten

Durchflusszytometrische Quantifizierung von α IIb β 3 auf der Thrombozytenoberfläche mit dem monoklonalen Antikörper AP3. Der Patient zeigte mit 11662 α IIb β 3-Kopien eine reduzierte Expression, während der Vater mit 41583 Kopien eine normale α IIb β 3-Expression aufweist. Die Plättchen der gesunden Spender exprimierten 41000 – 65000 α IIb β 3-Kopien. Isotypenkontrolle (Normalspenderplättchen mit Maus-IgG) in schwarz.

3.2.2 Auswirkungen der *ITGB3* p.Cys460Trp-Mutation auf die Expression des β 3-Integrins

Um die Auswirkungen der Cys460Trp-Mutation weiter untersuchen zu können, wurden cDNA-Vektoren für das β 3-Integrin hergestellt, die die Cys460Trp-Mutation enthalten und zusammen mit Wildtyp- α IIb bzw. Wildtyp- α v in HEK-293F-Zellen eingebracht. (siehe Kapitel 2.4).

Die stabil exprimierenden Zellen wurden durchflusszytometrisch mit monoklonalen Antikörpern gegen die β 3-Untereinheit, den α IIb β 3- bzw. α v β 3-Komplex (AP3, Gi5 und 23C6 respektive) analysiert, um zu untersuchen, ob die eingebrachte Mutation die Oberflächenexpression der Integrine verändert.

Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den mutierten Zellen und den Wildtypzellen (siehe Abbildung 8).

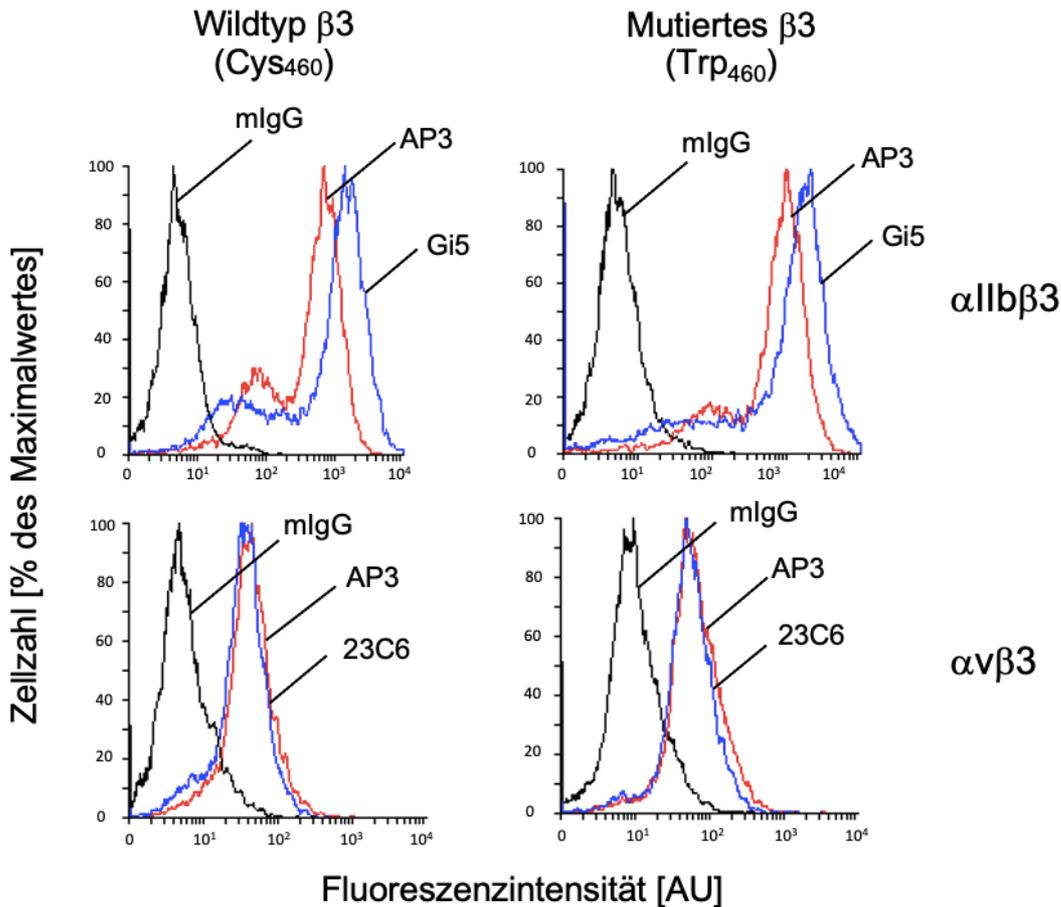


Abbildung 8: Durchflusszytometrische Analyse von HEK-293F-Zellen, die mit mutiertem und Wildtyp- α IIb β bzw. α v β transfiziert wurden

Die Mutation beeinträchtigt die Oberflächenexpression nicht signifikant. Sowohl die Wildtyp-Zellen, als auch Zellen mit der eingebrachten Mutation Trp460 reagierten vergleichbar mit AP3 (monoklonaler AK gegen das β 3-Integrin), Gi5 (gerichtet gegen α IIb β -Komplex) bzw. 23C6 (gerichtet gegen α v β -Komplex). Maus-IgG (mIgG) wurde als Negativkontrolle verwendet.

Um auch Aussagen über intrazelluläre Proteine treffen zu können, wurden die α IIb β -HEK-293F-Zellen lysiert und im Immunblot untersucht (siehe Abbildung 9). Auch hier zeigte sich eine vergleichbare Expression des mutierten und des Wildtyp- β 3. Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch bei Analyse der α v β -Zellen. Zudem fiel auf, dass die Bande der mutierten β 3-Proteine langsamer durch das Gel migrierte als die Bande des Wildtyp-Proteins, was darauf schließen lässt, dass die Mutation die Proteinstruktur des β 3-Moleküls verändert. Es lässt sich zusammenfassen, dass die Mutation Cys460Trp die Oberflächenexpression der α IIb β - und α v β - Proteine nicht bedeutend verändert.

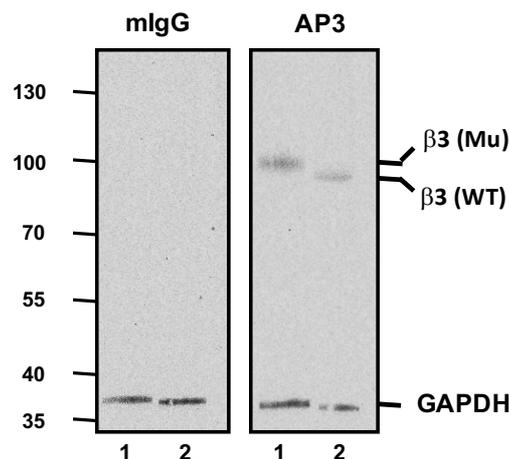


Abbildung 9: Immunblot von HEK-293F-Zellen, die mit mutiertem α IIb β 3 und Wildtyp- α IIb β 3 transfiziert wurden

Im Immunblot mit AP3 (monoklonaler AK gegen das β 3-Integrin) migriert die Bande mit dem mutierten Protein (1, Trp460) langsamer als die Bande des Wildtyp-Proteins (2, Cys460). Maus-IgG (mIgG) wurde als Negativkontrolle verwendet, es wurde nicht-reduzierender Puffer verwendet.

3.2.3 Auswirkung der Mutation auf HPA-1a-bestimmende Antigene

Die Mutation Cys460Trp zerstört eine Disulfidbrücke in der I-EGF1-Domäne. Da die I-EGF1-Domäne nötig für die Bindung mancher anti-HPA-1a-Antikörper ist, könnte diese Mutation immunologische Auswirkungen haben. Um diese Hypothese zu testen, wurden Plättchen des Patienten (exprimieren α IIb β 3 mit der Mutation auf ihrer Oberfläche), des Vaters und eines gesunden Spenders mit den monoklonalen anti-HPA-1a-Antikörpern SZ21, 26.4 und B2G1 in der Durchflusszytometrie analysiert. Die Antikörper SZ21, 26.4 und B2G1 benötigen zur Bindung in dieser Reihenfolge jeweils mehr Anteile der I-EGF1-Domäne und werden damit in dieser Reihenfolge in zunehmendem Maße spezifisch (Details zu involvierten Aminosäuren siehe Tabelle 2.8). Dabei zeigte sich, dass die Thrombozyten des Patienten im Vergleich zu Wildtyp-Thrombozyten signifikant schwächer mit SZ21, nur minimal mit 26.4 und nicht mit B2G1 reagierten (siehe Abbildung 10). Auch paternale Plättchen reagierten im Vergleich zu den Thrombozyten des gesunden Spenders schwächer mit 26.4 und B2G1. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Cys460Trp-Mutation das Bindungsverhalten einiger monoklonaler Antikörper gegen HPA-1a verändert.

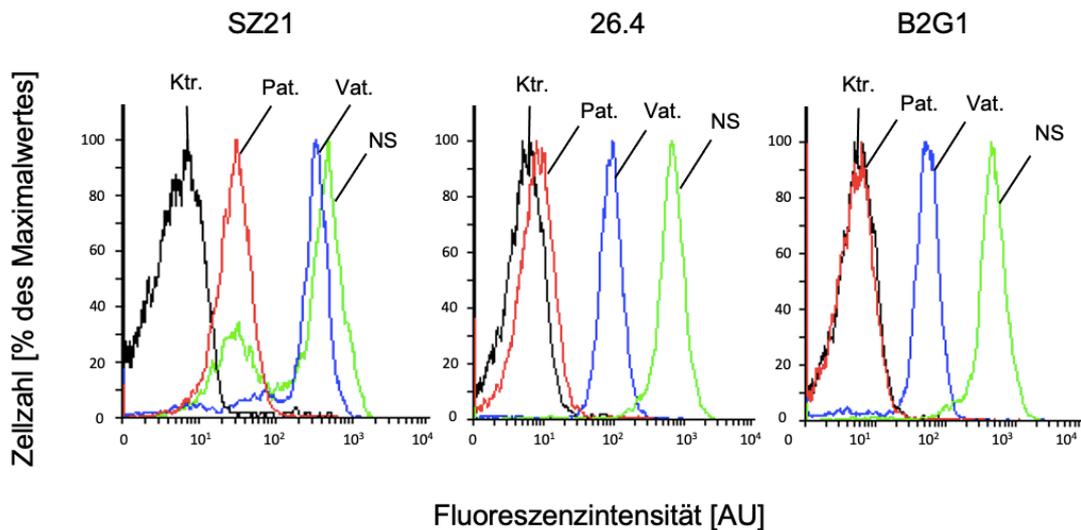


Abbildung 10: Durchflusszytometrische Messung von Thrombozyten mit monoklonalen HPA-1a-Antikörpern

Nur der monoklonale AK SZ21 reagierte mit Thrombozyten des Patienten (GT), nicht jedoch 26.4 und B2G1. Paternale Thrombozyten (FA) reagierten mit allen drei AK, jedoch im Vergleich zu den Thrombozyten eines gesunden Spenders (NS) schwächer mit 26.4 und B2G1. Ktr: Thrombozyten eines Normal-spenders mit Maus-IgG

Diese Ergebnisse bestätigten sich auch bei durchflusszytometrischer Analyse der HEK-293F-Zellen, in die ein α I**II**b-Wildtypplasmid und β 3(Trp460)-Plasmid eingebracht wurde (siehe Abbildung 11). Hier reagierten die Zellen mit dem mutierten Protein mit SZ21 und schwach mit 26.4. Es fand keine Reaktion mit B2G1 statt. Es lässt sich festhalten, dass die Cys460Trp-Mutation in der I-EGF1-Domäne das HPA-1a-Epitop verändert und vorwiegend die Bindung von Typ II- anti-HPA-1a-AK (e. g. 26.4 oder B2G1) stört und weniger die Bindung von Typ I-anti-HPA-1a-AK (e. g. SZ21).

Kürzlich stellten Strukturanalysen dar, dass das β 3-Integrin in einer anderen Konformation vorliegt, wenn es mit α v statt α I**II**b einen Komplex bildet. Es ist deshalb möglich, dass die α v β 3-Zellen mit den monoklonalen anti-HPA-1a-Antikörpern anders als die α I**II**b β 3-Zellen reagieren. Deshalb wurden auch mutierte-(Trp460)- und Wildtyp-(Cys460)- α v β 3-Transfektanten mit verschiedenen monoklonalen anti-HPA-1a-Antikörpern getestet (siehe Abbildung 11, untere Diagramme). Hier zeigte sich bei allen drei Antikörpern ein verändertes Bindungsmuster: Wenn die mutierte β 3-Untereinheit mit der

α v-Untereinheit im Komplex vorliegt, reagiert sie nicht mit 26.4 und B2G1 und nur schwach mit SZ21.

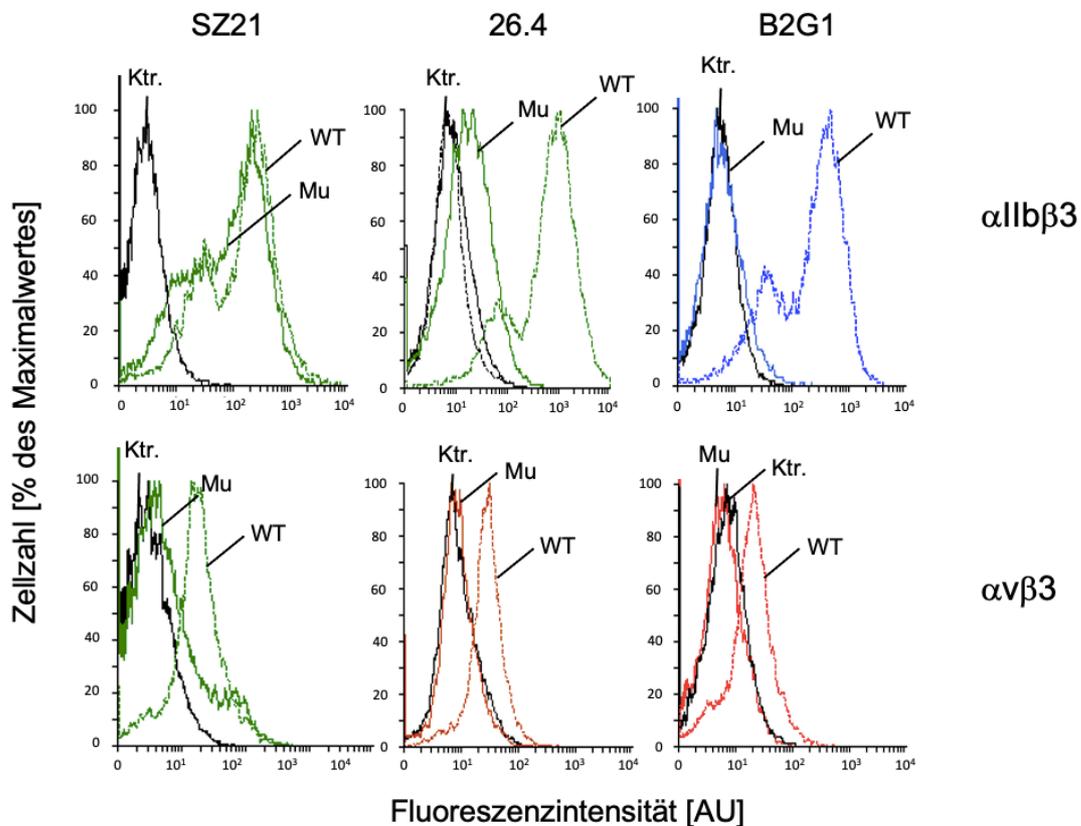


Abbildung 11: Durchflusszytometrische Messung der stabilen α IIb β 3- und α v β 3-Transfektanten mit monoklonalen HPA-1a-Antikörpern

Die mutierten α IIb β 3-Zellen (Mu) reagierten nur mit dem Antikörper SZ21, nicht jedoch mit den spezifischeren Antikörpern 26.4 und B2G1. Die mutierten α v β 3-Zellen reagierten mit allen Antikörpern signifikant schwächer als die Wildtyp-Zellen, leichte Reaktion mit SZ21. Wildtyp-HEK-293F-Zellen (WT) reagierten mit allen drei AK. Ktr: Maus-IgG

3.2.4 Auswirkung der Mutation auf das Bindungsverhalten einiger anti-HPA-1a-Antikörper

Um die Existenz dieser beiden Subtypen von anti-HPA-1a-Antikörper weiter zu bestätigen, wurden HEK-293F-Zellen, die das mutierte oder Wildtyp- α IIb β 3 bzw. α v β 3 auf der Oberfläche tragen, mit mütterlichen Seren von FNAIT-Fällen in einem glykoproteinspezifischen Enzymtest inkubiert.

Bei Testung mit dem anti-HPA-1a-Standardserum NIBSC 03/152 (als Typ-I-Antikörper, Säule 1) reagierten alle vier Zelllinien vergleichbar. Vier der fünf FNAIT-Seren (Säulen

3, 4, 6 und 7) reagierten mit den Wildtyp- α IIb β 3-Zellen, jedoch nicht mit den Cys460Trp-mutierten Zellen. Dies weist darauf hin, dass die meisten Seren vorwiegend aus Typ II-anti-HPA-1a-Antikörpern bestehen. Lediglich Serum Nummer 5 reagierte sowohl mit den Wildtyp- α IIb β 3-Zellen, als auch den mutierten α IIb β 3-Zellen vergleichbar, was auf Typ I-anti-HPA-1a-Antikörper in diesem Serum schließen lässt. Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch beim Testen mit α v β 3-Zellen.

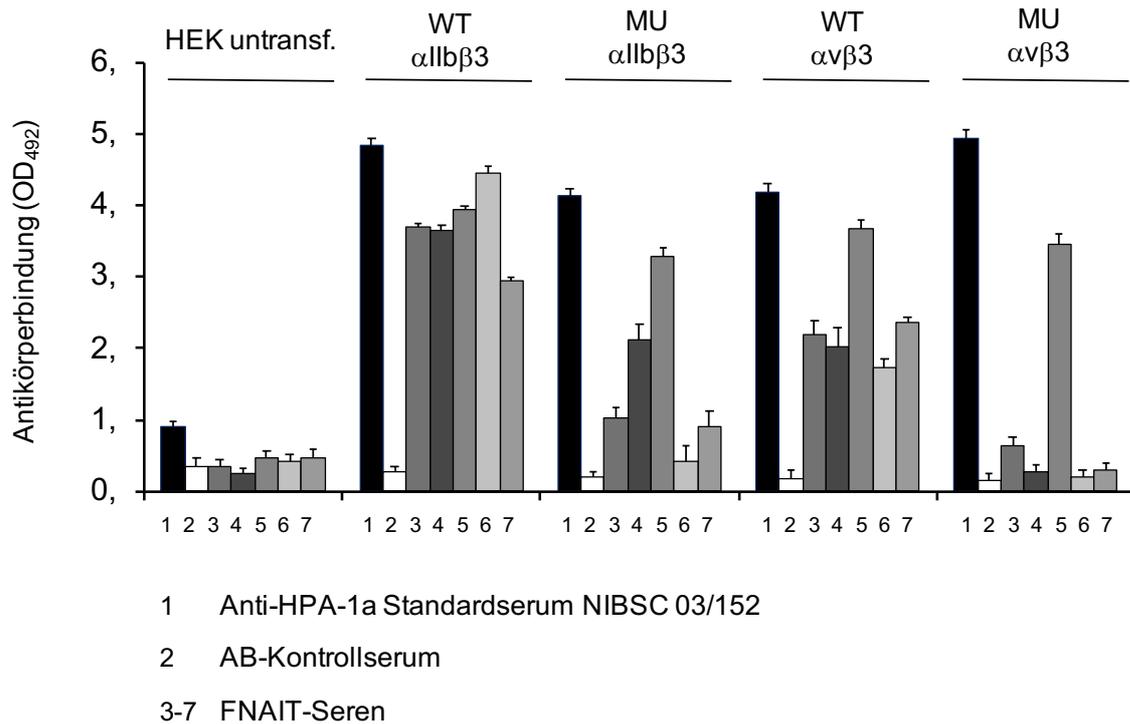


Abbildung 12: Analyse von anti-HPA-1a-Antikörpern mit Wildtyp und mutierten α IIb β 3- und α v β 3-transfizierten HEK-293F-Zellen in einem modifizierten MAIPA

Inkubation von HEK-293F-Zellen, die den mutierten (Trp460) oder Wildtyp (Cys460) α IIb β 3-, bzw. α v β 3-Komplex auf der Oberfläche exprimieren, mit fünf verschiedenen maternalen Seren von FNAIT-Fällen ohne ICH. Als Kontrolle wurde anti-HPA-1a-Standardserum (National Institute for Biological Standards and Control 03/152, Säule 1), sowie AB-Serum eines gesunden Blutspenders mitgeführt. Untransfizierte HEK293F-Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet. Nach Zelllyse wurde das α IIb β 3- bzw. α v β 3-Integrin mit dem β 3-spezifischen monoklonalen Antikörper AP3 auf der Platte immobilisiert. Nachweis von AP3 durch HRP-markierten Sekundärantikörper. Die optische Dichte wurde bei 492 nm bestimmt. Vier von fünf FNAIT-Seren (#3, #4, #6 und #7) reagierten mit den mutierten Zellen jeweils signifikant schwächer, als mit den Wildtypzellen, Serum #5 reagierte mit beiden mutierten und Wildtypzellen jeweils vergleichbar. Alle Daten sind Mittelwerte der Optischen Dichte +1 SD, n = 2 unabhängige Experimente.

4 Diskussion

In einem Fall von schwerer neonataler Alloimmunthrombozytopenie konnten wir eine Immunisierung gegen ein neues Antigen auf dem $\beta 3$ -Integrin feststellen. Durch Genomsequenzierung und Analyse mit Transfektanten wurde die Mutation *ITGB3* c.473A > G (p.Gln132Arg) als Ursache identifiziert.

Das neue Antigen wurde nach der internationalen Plättchennomenklatur *Wo(a)* benannt. Anti-HPA-1a-Antikörper reagierten sowohl mit Wildtypzellen, als auch mit mutierten Zellen, was darauf hinweist, dass die *Wo(a)*-Mutation nicht das HPA-1a-Epitop verändert.

Bei einem Patienten mit Thrombasthenie Glanzmann konnten wir die Punktmutation *ITGB3* c.1458C > G (p.Cys460Trp) nachweisen. Diese Mutation verhindert nicht die Expression von $\alpha IIb\beta 3$ und $\alpha v\beta 3$ auf der Oberfläche von HEK-Zellen, verändert jedoch die dreidimensionale Struktur des $\beta 3$ -Integrins.

Bei Testung mit anti-HPA-1a-Antikörpern zeigte sich, dass $\alpha IIb\beta 3$ -Zellen mit dieser Mutation zwar Typ-I-Antikörper (Epitop auf PSI-Domäne) binden, aber keine Typ-II-Antikörper (Epitop gebildet durch PSI- und I-EGF1-Domäne).

4.1 Punktmutation *ITGB3* c.473A>G

Wir stellen Untersuchungen zur Punktmutation *ITGB3* c.473A>G vor, die das Antigen *Wo(a)* bildet und bei einem Fall von neonataler Alloimmunthrombozytopenie aufgefallen ist.

Alloimmunerkrankungen wie die neonatale Alloimmunthrombozytopenie sind Systemerkrankungen, für deren Verständnis diverse Organsysteme berücksichtigt werden müssen. Dazu gehört zum Beispiel die Plazenta, die nur ausgewählte, nicht schädliche Stoffe zum fetalen Kreislauf vordringen lässt; das Gerinnungssystem mit der Produktion multifunktionaler Blutplättchen, gefüllt mit Gerinnungsaktivatoren; sowie das Immunsystem, das auf Angriffe innerhalb kurzer Zeit hochspezialisierte Zellen und Antikörper bilden kann. Experimentelle Studien, wie auch die vorliegende, müssen (1) immer in der Perspektive dieser Komplexität gesehen werden und (2) für eine gute externe Validität den natürlichen, humanen Verhältnissen möglichst nah sein.

Das Zellkultursystem kann diese Komplexität nur bedingt nachbilden. So ist eine Limitation dieser Arbeit, dass wir an nur einer Zelllinie gearbeitet haben (HEK-293F-Zellen), in vivo aber verschiedene Gewebeformen koexistieren und sich gegenseitig beeinflussen.

Auch das ältere Geschwisterkind von Patient Nr. 1 (s. Fallbeschreibung in Kapitel 2.1) war zur Geburt thrombopen. Eine Neonatale Alloimmunthrombozytopenie wurde vermutet. In der initialen Diagnostik dieses Kindes, bei der keine Cross-Match-Analyse stattfand, fiel der Antikörper nicht auf. Dieser Fall unterstreicht die Wichtigkeit, beim Verdacht auf Fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie serologische Cross-Match-Analysen zwischen paternalen Plättchen und maternalem Serum durchzuführen. Kommerzielle In-House-Testverfahren, wie PCR-Genotypisierungen oder Luminex-Beads-basierte Analyseverfahren, beschränken sich auf die häufigsten HPA-Inkompatibilitäten (Porcelijn et al., 2020). In der Aufarbeitung können dadurch seltene Anti-HPA-Antikörper übersehen und Diagnosen verpasst werden.

Deshalb ist der MAIPA als spezifisch auf Glykogene gerichtetes Diagnostiktool mit guter Sensitivität und Spezifität (Kaplan et al., 2007) bei Verdacht auf FNAIT wichtig. MAIPAs benötigen aber viel Erfahrung und Sachkenntnis der Ausführenden, weshalb HPA-Antikörperdiagnostik erfahrenen Laboren vorbehalten bleiben sollte.

4.2 Punktmutation *ITGB3* c.1458C > G

4.2.1 Auswirkungen der Mutation p.Cys460Trp auf die Expression der β 3-Proteine

In früheren Studien konnte nachgewiesen werden, dass Mutationen im *ITGB3*-Gen, insbesondere solche, die Disulfidbrücken zerstören, die α IIb β 3- und α v β 3-Expression reduzieren oder verhindern können (Laguerre et al., 2013; Mor-Cohen et al., 2012; Nurden et al., 2015). Ein Beispiel dafür stellt die Disulfidbrücke zwischen C437 und C457 in der I-EGF1-Domäne des *ITGB3*-Gens dar, deren Zerstörung zu einer reduzierten α IIb β 3- und α v β 3-Oberflächenexpression, aber konstitutiven Aktivierung der Rezeptoren führt (Mor-Cohen et al., 2012).

Die Mutation p.Cys460Trp in der I-EGF1-Domäne des *ITGB3*-Gens zerstört die Disulfidbrücke zwischen C448 und C460, verändert aber die α IIb β 3- und α v β 3-Expression nicht. HEK-293F-Zellen, in die wir cDNA-Vektoren mit der p.Cys460Trp-Mutation

einbrachten, exprimierten vergleichbare Mengen α IIb β 3 und α v β 3 auf der Zelloberfläche wie WT-Zellen. Die Thrombozyten des Patienten, bei dem wir die p.Cys460Trp-Mutation fanden, exprimieren jedoch weniger α IIb β 3 auf der Zelloberfläche. Dies ist aber nicht der p.Cys460Trp-Mutation, sondern der maternal vererbten p.Trp11Arg-Mutation zuzuschreiben (Sandrock-Lang et al., 2015). Diese Missense-Mutation liegt im Signalpeptid, das im reifen Peptid nicht vorhanden ist. Es ist bekannt, dass Mutationen im Signalpeptid des β 3-Proteins eine Thrombasthenie Glanzmann auslösen können (Kannan et al., 2009; Nurden et al., 2015; Sandrock-Lang et al., 2015).

Der Vater des Patienten hat ebenfalls die p.Cys460Trp-Mutation im *ITGB3*-Gen und hat eine normale α IIb β 3-Expression auf seinen Thrombozyten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die p.Cys460Trp-Mutation die Oberflächenexpression von α IIb β 3 und α v β 3 nicht verändert.

4.2.2 Auswirkungen der Mutation p.Cys460Trp auf die Proteinstruktur

Die C448-C460-Disulfidbrücke in der I-EGF1-Domäne des *ITGB3*-Gens wird durch die Mutation p.Cys460Trp zerstört. Die Wichtigkeit von intakten Disulfidbrücken für die 3D-Strukturdefinition von EGF-Domänen ist bekannt (Xiong et al., 2009). Auch durch die Zerstörung der C448-C460-Disulfidbrücke ändert sich die Sekundärstruktur des β 3-Proteins.

Trennt man Proteinlysate von Zellen unter nicht-reduzierenden Bedingungen in der SDS-Gelelektrophorese auf, bleiben im Gegensatz zum Lauf in reduzierenden Bedingungen die Disulfidbrücken der Proteine bestehen. Dadurch werden die Proteine nach ihrem hydrodynamischen Radius aufgetrennt, der sich je nach Sekundärstruktur unterscheiden kann.

Das mutierte β 3-Protein migriert unter nicht-reduzierenden Bedingungen in der Gelelektrophorese langsamer durch das SDS-Polyacrylamid-Gel als das WT- β 3-Protein. Dies steht auch in Übereinstimmung mit anderen Veröffentlichungen (P. Chen et al., 2001; Milet-Marsal et al., 2002; Ruan et al., 1999) und spricht für eine veränderte Sekundärstruktur durch die Mutation.

Auch das In-silico-Modell (siehe Abbildung 13) sagt eine Strukturänderung durch die p.Cys460Trp -Mutation voraus.

Im WT- β 3-Protein ist die Disulfidbrücke zwischen C448 und C460 intakt, dadurch befinden sich die Aminosäuren Q470 und L33, die beide wichtig für die Bildung des HPA-1a-Epitops sind, in unmittelbarer Nähe. Durch die p.Cys460Trp-Mutation wird Cystein durch den deutlich größeren Tryptophanrest ersetzt und die C448-C460-Disulfidbrücke zerstört. Dadurch ist im mutierten β 3-Protein die I-EGF1-Domäne zum WT-Protein gedreht und Q470 weiter entfernt von L33.

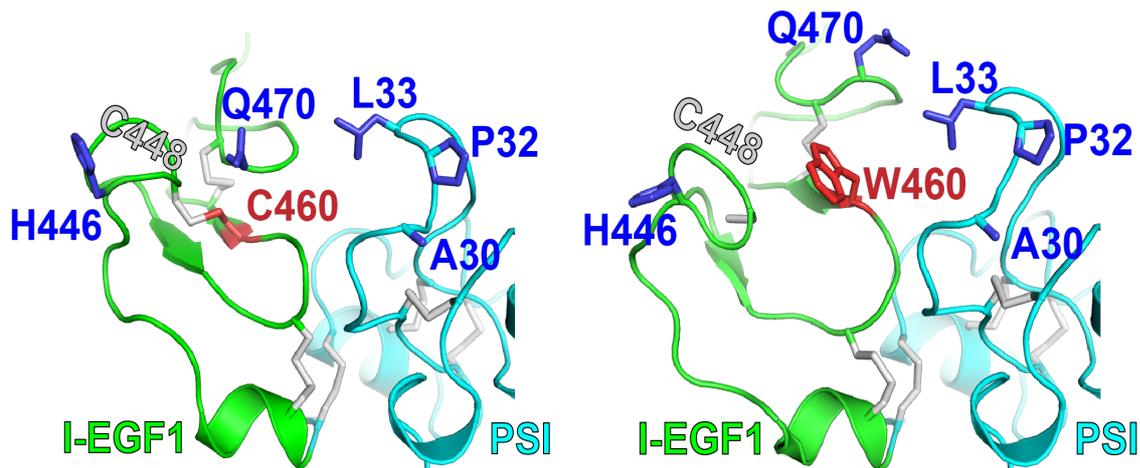


Abbildung 13: Mögliche sterische Auswirkungen der Cys460Trp-Mutation auf das HPA-1a-Epitop
Abgebildet sind die I-EGF1- und PSI-Domäne, die das HPA-1a-Epitop bilden, in einer Aufsicht. Die zu erwartende Konformation durch die Cys460Trp-Mutation im β 3-Integrin wurde mit der Software PyMol in silico simuliert und ist rechts abgebildet. Links ist die Kristallstruktur des Wildtyp- β 3-Moleküls dargestellt. Die für die Bildung des HPA-1a-Epitops bedeutenden Aminosäurereste sind blau markiert, Disulfidbrückenbindungen grau. Die Cys460Trp-Mutation kann womöglich durch die sperrige Seitenkette direkt das HPA-1a-Epitop stören oder indirekt die Konformation der I-EGF1-Domäne verändern, weil die C448-C460-Disulfid-Bindung gestört ist.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass die p.Cys460Trp-Mutation die Proteinstruktur des β 3-Proteins verändert.

Kamata et al. stellten fest, dass eine Substitution des Cys460 durch Serin Einfluss auf den Aktivierungszustand des α I**IIb** β 3-Integrins hat (Kamata et al., 2004). Da die Aktivierung des α I**IIb** β 3-Integrins wichtig für die primäre Hämostase ist, wäre in einer weiteren Untersuchung der Einfluss der Cys460Trp-Mutation auf die Funktion und den Aktivierungszustand des α I**IIb** β 3 von Interesse.

4.2.3 Auswirkungen der Mutation p.Cys460Trp auf die Immunogenität des HPA-1a-Epitops

Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit war, in einem in vivo-System Rückschlüsse auf die Beteiligung der I-EGF1-Domäne am HPA-1a-Epitop und damit die Existenz von Typ II-AKs zu ziehen.

Um den Faktor der Speziesdifferenz möglichst gering zu halten und den humanen Verhältnissen nah zu kommen, haben wir eine bei einem Patienten mit Thrombasthenie Glanzmann natürlich vorkommende Mutation in eine humane Zelllinie eingebracht.

Zwar konnte auch schon in einer vorherigen Studie gezeigt werden, dass Mutationen in der I-EGF1-Domäne das Bindungsverhalten mancher anti-HPA-1a-Antikörper beeinflussen können. Bislang fanden diese Versuche jedoch im Mausmodell an murinen $\beta 3$ -Integrinen statt, in denen einige Aminosäuren ersetzt wurden, um dem humanen $\beta 3$ -Integrin näher zu kommen (Zhi et al., 2018).

Hier präsentieren wir Ergebnisse von Versuchen an humanem $\beta 3$ -Integrin mit einer natürlich vorkommenden Mutation. Dies kommt den Verhältnissen in der Natur sehr viel näher als vorherige Untersuchungen, die Ergebnisse sind daher belastbarer.

Für die Bindung mancher Anti-HPA-1a-AKs ist nicht nur die Aminosäure Leu33 notwendig (Flug et al., 1991; Kunicki & Aster, 1979). So identifizierten Zhi et al. mit Hilfe genveränderter Mäuse Aminosäuren in der I-EGF1-Domäne, die für die Bindung einiger Anti-HPA-1a-Antikörper (Typ II-AKs) bedeutend sind (Zhi et al., 2018). Vertreter dieser postulierten Typ II-Antikörper sind beispielsweise die monoklonalen Antikörper 26.4 und B2G1 (Eksteen et al., 2015; Griffin & Ouwehand, 1995; Zhi et al., 2018). In unseren Experimenten untersuchten wir das Bindungsverhalten von Typ I- und Typ II-AKs mit transfizierten HEK-Zellen, die jeweils Wildtyp- oder mutiertes $\alpha \text{IIb}\beta 3$ oder $\alpha \text{v}\beta 3$ auf ihrer Oberfläche exprimieren.

Aus den Untersuchungen des Labors von Huiying Zhi ist bekannt, dass der monoklonale Antikörper 26.4 die Aminosäure Q470 in der I-EGF1-Domäne und B2G1 zusätzlich zu Q470 die Aminosäure H446 zur Bindung benötigt (Zhi et al., 2018). Dementsprechend stört die Mutation p.Cys460Trp zwar auch das Bindungsverhalten von 26.4, aber stärker das von B2G1, da es für die Bindung mehr Aminosäuren, deren Position durch die

Mutation potenziell verändert ist, benötigt. Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen unserer durchflusszytometrischen Untersuchungen wider (siehe Kapitel 3.2.3). Das Bindungsverhalten von SZ21, einem Antikörper, der nur die PSI-Domäne zur Bindung benötigt, unterscheidet sich nicht, wenn dieser mit WT- oder mutierten α Ib β 3-Zellen zusammengebracht wird.

Wir konnten unsere Ergebnisse mit Thrombozyten des Patienten, des Vaters und eines Normalspenders bestätigen.

Mit der Mutation p.Cys460Trp im *ITGB3* konnte in einem humanen in-vivo-System die Existenz von Typ-I- und Typ-II-AKs bewiesen werden.

Im folgenden Schritt testeten wir, ob die Transfektanten genutzt werden können, um Typ-I- und -II-AKs im Serum HPA-1a-immunisierter Mütter mit FNAIT mit einem glykoproteinspezifischen Enzymtest zu unterscheiden. Dabei konnten wir in unserer FNAIT-Kohorte in vier von fünf Seren Typ-II-AKs finden. Die Frage, ob Typ-I- und Typ-II-AKs sich in ihren klinischen Auswirkungen auf die Hämostase betroffener Feten unterscheiden, ist für die Diagnostik und Risikostratifizierung von großem Interesse. In der Literatur zeigt sich ein heterogenes Bild über die klinische Bedeutung. In einer Serie mit 140 FNAIT-Seren stellten Stafford et al. 2008 keinen Unterschied im Schweregrad der Thrombozytopenie und ICH-Risiko zwischen Typ-I- und Typ-II-AKs fest, jedoch lag der Schwerpunkt der Arbeit auf der Entwicklung der Domän-depletierten β 3-Peptide (Stafford et al., 2008). Auf der anderen Seite zeigt sich in vitro, dass Typ-II-AKs die Funktion von α Ib β 3 (und damit die Blutgerinnung) signifikant stärker hemmen als Typ-I-AKs (Zhi et al., 2018). In einer Serie von 43 anti-HPA-1a-AK-haltigen Seren stammten alle Antikörper mit α Ib β 3-hemmender Wirkung aus Seren von FNAIT-Fällen mit schweren Blutungskomplikationen (Kroll et al., 2005).

Interessanterweise unterschied sich in unseren Untersuchungen – anders als bei α Ib β 3-Zellen – das Bindungsverhalten des Typ-I-AK SZ21 je nachdem, ob das mutierte β 3 im Komplex mit α Ib oder α v vorliegt (siehe Abbildung 11). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die α -Kette durch unterschiedliche Konformationen des β 3 einen entscheidenden Einfluss auf das HPA-1a-Epitop hat. Neben Typ-I- und Typ-II-anti- α Ib β 3-AKs existiert ein weiterer anti-HPA-1a-AK-Subtyp: Anti- α v β 3-Antikörper. Dieser ist mit ICHs assoziiert und ist in vitro in der Lage, Endothelzellen durch eine Caspase-3/7-Aktivierung in die Apoptose zu führen (Santoso et al., 2016).

Auch pathophysiologisch ist die These, dass ICHs durch Anti- $\alpha\beta3$ -Antikörper verursacht werden, überzeugend. Zwischen der 19. und 24. SSW kommt es zu extensiver Angiogenese von Markvenen, auf deren Endothel $\alpha\beta3$ vorkommt. Damit wird besonders viel $\alpha\beta3$ als Angriffsfläche für Antikörper präsentiert (Kjeldsen-Kragh & Bengtsson, 2020).

4.3 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit stellen wir Untersuchungen zu zwei natürlich vorkommenden Punktmutationen auf dem $\beta3$ -Integrin vor.

Die Mutation ITGB3 c.473A > G (p. Gln132Arg), aufgetreten bei einem Kind mit neonataler Alloimmunthrombozytopenie, führt zur Bildung eines neuen Antigen, genannt Wo(a). Diese Mutation kann durch eine Immunisierung gegen $\alpha\text{IIb}\beta3$ zu einer Fetalen/neonatalen Alloimmunthrombozytopenie führen. Als seltenes Antigen liegt die Mutation außerhalb der Reichweite kommerzieller Luminex-Beads-basierter Tests oder gängiger vorgefertigter Genanalyse-Kits. Der Fall weist auf die Wichtigkeit von Cross-Match-Analysen im Abarbeitungsalgorithmus von FNAIT-Verdachtsfällen hin.

Die Mutation ITGB3 c. 1458C > G (p. Cys460Trp) bei einem Kind mit Thrombasthenie Glanzmann beweist die Bedeutung der I-EGF1-Domäne für die Bindung von Typ-II-anti-HPA-1a-Antikörpern. Die hergestellten Transfektanten bieten erstmals ein Diagnostiktool, um zuverlässig Typ I- und Typ II-Antikörper zu unterscheiden.

Die genaue Kenntnis der HPA-1a-Epitope hat Bedeutung für zukünftige Diagnostik. Bislang werden für die Durchführung von MAIPAs typisierte Spenderthrombozyten benötigt. Um von Blutspenden unabhängig zu werden, wären synthetische, rekombinante Proteine geeignete Alternativen. Für HPA-2, ein Antigen auf dem Von-Willebrand-Faktor-Rezeptor war die Herstellung solch rekombinanter Proteine bereits erfolgreich (C. Q. Li et al., 2000). Dafür fehlte beim HPA-1-Antigen bislang ein genaues Verständnis des Epitops. Zu diesem wird mit dieser Studie beigetragen.

Die Erkenntnisse über das HPA-1a-Epitop und die zwei unterschiedlichen Antikörper-Subtypen haben Bedeutung für zukünftige Therapiestrategien. Denkbar ist beispielsweise

der Einsatz kompetitiver Antikörper mit inaktivierter Fc-Domäne, die die HPA-1a-Epitope besetzen und damit die Bindung zerstörerischer Antikörper verhindern (Griffin & Ouwehand, 1995; Stafford et al., 2008). Im Mausmodell konnte ein monoklonaler anti- β 3-Antikörper bereits erfolgreich eine Immunisierung verhindern (Tiller, Killie, Chen, et al., 2012).

Der Einsatz eines monoklonalen AKs reicht beim Menschen vermutlich nicht aus, um die volle prophylaktische Wirkung zu entfalten (Kjær et al., 2020). Mehrere monoklonale Antikörper zu poolen, die die verschiedenen HPA-1a-Epitope erkennen, kann dieses Problem umgehen. Aussichtsreiche Typ-II-Kandidaten in solch einem Antikörper-Cocktail könnten unter anderem die in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörper 26.4 und B2G1 sein (Eksteen et al., 2015; Ghevaert et al., 2013).

Beim Krankheitsbild FNAIT bleibt die Immunisierung ein interessantes Forschungsfeld. Besonders die Rolle verschiedener anti-HPA-1a-AK-Subtypen in der Pathogenese von FNAIT und ihre Anwendbarkeit in der Risikostratifizierung von FNAIT-gefährdeter Schwangerschaften sollten weiterverfolgt werden.

Die vorliegende Arbeit stellt Reagenzien und Testmethoden für die Durchführung dieser Forschung vor.

5 Zusammenfassung

Fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT) ist eine Erkrankung, bei der fetale oder neonatale Plättchen durch diaplazentar übertragene Antikörper zerstört werden. FNAIT betrifft 1 von 1500 Schwangerschaften und kann zu völlig asymptomatischen Verläufen, aber auch zu schweren Komplikationen einschließlich intrakranieller Blutungen bis hin zu fetalem Tod führen. Bislang sind die genauen Mechanismen, die zu einer Immunisierung gegen das auf den Thrombozyten vorkommende α IIb β 3 führen, noch ungenügend geklärt. Zudem steht ein verlässliches Diagnostiktool zur frühzeitigen Unterscheidung von ungefährdeten und gefährdeten Schwangerschaften bislang noch aus. In dieser Arbeit wurden zwei natürlich vorkommende Punktmutationen auf ihre Auswirkungen auf die Immunogenität des HPA-1a-Epitops untersucht.

In einem ersten Teil haben wir die bei einem Patienten mit Neonataler Alloimmunthrombozytopenie entdeckte Punktmutation *ITGB3* c.473A > G (p.Gln132Arg) daraufhin untersucht, (1) ob sie zur Bildung eines neuen Epitops auf dem Integrin α IIb β 3 führt und (2) das HPA-1a-Epitop verändert. Dafür wurde die Punktmutation in HEK-293F-Zellen eingebracht und in einem glykoproteinspezifischen *antigen capture assay* getestet, ob die mutationstragenden Zellen mit dem mütterlichen Serum reagieren. Es konnte festgestellt werden, dass die p.Gln132Arg-Mutation ein bisher unbekanntes Epitop bildet. Diesem wurde analog der internationalen Plättchennomenklatur die Bezeichnung Wo(a) zugeteilt. Die Mutation p.Gln132Arg verändert nicht das HPA-1a-Epitop.

In einem zweiten Teil haben wir untersucht, ob die Mutation *ITGB3* c.1458C > G (p.Cys460Trp), die zu einem Aminosäureaustausch in der I-EGF-Domäne und dadurch zur Zerstörung einer Disulfidbrücke führt, das HPA-1a-Epitop verändert. Auch hier haben wir die Mutation in HEK-293F-Zellen transfiziert, das Zelllysate im Western Blot untersucht sowie anschließend mit monoklonalen anti-HPA-1a-Antikörpern unterschiedlicher Spezifität das Bindungsverhalten der Zellen in der Durchflusszytometrie getestet. Hierbei unterschied sich die Migration der Proteine im Western Blot, was auf eine Änderung der Konformation durch die Mutation p.Cys460Trp hinweist. Es bestätigte sich die Existenz zweier Subtypen von anti-HPA-1a-Antikörpern: Typ I- und Typ II-Antikörper, die sich darin unterscheiden, ob sie Zellen mit der Cys460Trp-Mutation binden und damit für eine Bindung auf die I-EGF-Domäne angewiesen sind. Die hier generierten Zellen lassen sich als Diagnostiktool einsetzen, um mütterliche Seren daraufhin zu untersuchen,

ob sie Typ I- oder Typ II-anti-HPA-1a-Antikörper beinhalten. Die vorliegende Arbeit legt mit dem Nachweis unterschiedlicher Subtypen von anti-HPA-1a-Antikörpern eine mögliche Erklärung für unterschiedliche klinische Präsentationen bei identischen Antikörpertitern vor und ist ein weiterer Schritt auf dem Weg zum besserem Verständnis der Pathogenese von FNAIT. Zukünftige Studien sind notwendig, um die Auswirkungen der unterschiedlichen Antikörpersubtypen auf die Entstehung von intrakraniellen Blutungen besser zu beleuchten.

6 Summary

FNAIT is a condition in which fetal or neonatal platelets are destroyed by diaplacentally transferred antibodies. 1 in 1500 pregnancies is affected, however clinical severity varies from completely asymptomatic courses to severe complications, including intracranial hemorrhage and fetal death. However, underlying mechanisms leading to immunization against $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ on thrombocytes remain not fully understood. In addition, a reliable diagnostic tool for the early differentiation of non-threatened and threatened pregnancies is still lacking. In this study, two naturally occurring point mutations were examined for their effect on the immunogenicity of the HPA-1a epitope.

In a first part, we investigated the point mutation *ITGB3* c.473A > G (p.Gln132Arg) found in a patient with neonatal alloimmune thrombocytopenia to determine (1) whether it leads to formation of a new epitope on integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ and (2) whether it modifies the HPA-1a epitope. For this purpose, we transfected the point mutation into HEK 293F cells and tested in a glycoprotein specific antigen capture assay, whether mutation-bearing cells react with maternal serum. We could demonstrate that the point mutation p.Gln132Arg creates a previously unknown epitope, termed Wo(a). The mutation p.Gln132Arg does not alter the HPA-1a epitope.

In a second part, we investigated whether the mutation *ITGB3* c.1458C>G (p.Cys460Trp) leading to an amino acid exchange in the I-EGF domain and disrupting a disulfide bridge, is altering the HPA-1a epitope. We transfected the mutation into HEK 293F cells and analyzed the cell lysate by Western blot for its migration behavior. Migration for mutated proteins was significantly slower in western blot than for wild type proteins, indicating a conformational change due to the p.Cys460Trp mutation. Subsequently, we tested the cells with monoclonal anti-HPA-1a-antibodies of differing specificities by flow cytometry. We could proof the existence of two subtypes of anti-HPA-1a-antibodies: type I and type II antibodies, differing in whether they bind cells with the p.Cys460Trp mutation and thus rely on the I-EGF domain for binding. The generated cells can be used as a diagnostic mean to test maternal serum for the existence of type I and type II anti-HPA-1a antibodies.

By proving the existence of anti HPA-1a antibody subtypes, this study presents a possible explanation for differing clinical presentations in patients with the same anti HPA-1a antibody concentration and adds one further puzzle piece for understanding the

pathogenesis of FNAIT. Future studies are needed to better elucidate the effects of different anti-body subtypes on the development of intracranial hemorrhage.

7 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AU	<i>Arbitrary Unit</i> , Willkürliche Einheit
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	<i>et alia</i> , und andere
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FNAIT	Fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie
FSC	<i>Forward Scatter</i> , Vorwärtsstreulicht
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphate-Dehydrogenase
HEK	Humane embryonale Nierenzellen
HPA	Humanes Plättchenantigen
HRP	Horserradish Peroxidase
I-EGF	<i>Integrin epidermal growth factor</i>
ICH	<i>Intracranial Hemorrhage</i> , Intrakranielle Blutung
i.m.	intramuskulär
IVIG	Intravenöses IgG
Ktr.	Kontrolle
MAIPA	<i>Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens</i> , monoklonalen antikörper-spezifischen Immobilisationstest für plättchen-spezifische Antigene
MHN	Morbus haemolyticus neonatorum
Mu	mutiert
NAIT	Neonatale Alloimmunthrombozytopenie
NS	Normaler Spender

OD	Optische Dichte
Pat.	Patient
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS/BSA	Rinderalbumin in PBS
PSI	Plexin-Semaphorin-Integrin
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> , Einzelnukleotid-Polymorphismus
SSC	<i>Sidewards Scatter</i> , Seitwärtsstreulicht
SSW	Schwangerschaftswoche
WT	Wildtyp

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lokalisation der Humanen Plättchenantigene (HPAs) 1-27 auf Oberflächenproteinen	3
Abbildung 2: Domänen des $\beta 3$ -Integrins	7
Abbildung 3: Übersicht über die Epitope der Anti-HPA-1a-Antikörper	9
Abbildung 4: Nukleotidsubstitution c.473A>G	32
Abbildung 5: Serologische Bestätigung des Wo(a)-Epitops	33
Abbildung 6: Sequenzierung des ITGB3-Gens: Leu33-Polymorphismus und Nukleotidsubstitution c.1458C>G	35
Abbildung 7: α I II β 3-Expression auf den Thrombozyten des Patienten	36
Abbildung 8: Durchflusszytometrische Analyse von HEK-293F-Zellen, die mit mutiertem und Wildtyp- α I II β 3 bzw. α v β 3 transfiziert wurden	37
Abbildung 9: Immunblot von HEK-293F-Zellen, die mit mutiertem α I II β 3 und Wildtyp- α I II β 3 transfiziert wurden	38
Abbildung 10: Durchflusszytometrische Messung von Thrombozyten mit monoklonalen HPA-1a-Antikörpern	39
Abbildung 11: Durchflusszytometrische Messung der stabilen α I II β 3- und α v β 3-Transfektanten mit monoklonalen HPA-1a-Antikörpern	40
Abbildung 12: Analyse von anti-HPA-1a-Antikörpern mit Wildtyp und mutierten α I II β 3- und α v β 3-transfizierten HEK-293F-Zellen in einem modifizierten MAIPA	41
Abbildung 13: Mögliche sterische Auswirkungen der Cys460Trp-Mutation auf das HPA-1a-Epitop	45

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Für Sequenzierung der Patienten-DNA verwendete ITGB3-Prime	17
Tabelle 2: Für Sequenzierung der Patienten-DNA verwendete ITGA2B-Primer	18
Tabelle 3: Mutagenese-Primer	21
Tabelle 4: Verwendete Zelllinien	23
Tabelle 5: Bei der Durchflusszytometrie verwendete monoklonale Primärantikörper	25
Tabelle 6: Herstellung von IPB	26
Tabelle 7: Transferpuffer für Semidry-Blot	27
Tabelle 8: Herstellung des ECL-Puffers	28
Tabelle 9: Im Immunblot verwendete monoklonale Primärantikörper	28
Tabelle 10: Herstellung des Lysepuffers	29
Tabelle 11: Herstellung des MAINA-Waschpuffers	30

10 Literaturverzeichnis

- Ahlen, M. T., Husebekk, A., Killie, M. K., Skogen, B., & Stuge, T. B. (2009). T-cell responses associated with neonatal alloimmune thrombocytopenia: Isolation of HPA-1a-specific, HLA-DRB3*0101-restricted CD4⁺ T cells. *Blood*, *113*(16), 3838–3844. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-09-178475>
- Althaus, J., Weir, E. G., Askin, F., Kickler, T. S., & Blakemore, K. (2005). Chronic villitis in untreated neonatal alloimmune thrombocytopenia: An etiology for severe early intrauterine growth restriction and the effect of intravenous immunoglobulin therapy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *193*, 1100–1104. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2005.06.043>
- Audia, S., Mahévas, M., Samson, M., Godeau, B., & Bonnotte, B. (2017). Pathogenesis of immune thrombocytopenia. *Autoimmunity Reviews*, *16*(6), 620–632. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2017.04.012>
- Bakchoul, T., Greinacher, A., Sachs, U. J., Krautwurst, A., Renz, H., Harb, H., Bein, G., Newman, P. J., & Santoso, S. (2013). Inhibition of HPA-1a alloantibody-mediated platelet destruction by a deglycosylated anti-HPA-1a monoclonal antibody in mice: toward targeted treatment of fetal-alloimmune thrombocytopenia. *Blood*, *122*(3), 321–327. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-11-468561>
- Baker, J. M., Shehata, N., Bussel, J., Murphy, M. F., Greinacher, A., Bakchoul, T., Massey, E., Lieberman, L., Landry, D., Tanael, S., Arnold, D. M., Baidya, S., Bertrand, G., Kjaer, M., Kaplan, C., Kjeldsen-Kragh, J., Oepkes, D., Savoia, H., Ryan, G., ... Wood, E. (2019). Postnatal intervention for the treatment of FNAIT: a systematic review. *Journal of Perinatology*, *39*, 1329–1339. <https://doi.org/10.1038/s41372-019-0360-7>
- Bennett, J. S., Berger, B. W., & Billings, P. C. (2009). The structure and function of platelet integrins. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *7*(SUPPL. 1), 200–205. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03378.x>
- Berkowitz, R. L., Bussel, J. B., & McFarland, J. G. (2006). Alloimmune thrombocytopenia: State of the art 2006. In *American Journal of Obstetrics and Gynecology* (Vol. 195, pp. 907–913). <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2006.05.001>

- Bertrand, G., Drame, M., Martageix, C., & Kaplan, C. (2011). Response: Prediction of the fetal status in noninvasive management of alloimmune thrombocytopenia. *Blood*, *117*(11), 3209–3213. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-302463>
- Birchall, J. E., Murphy, M. F., Kaplan, C., & Kroll, H. (2003). European collaborative study of the antenatal management of feto-maternal alloimmune thrombocytopenia. *British Journal of Haematology*, *122*(2), 275–288. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2003.04408.x>
- Bonacossa, I. A., & Jocelyn, L. J. (1996). Alloimmune thrombocytopenia of the newborn: neurodevelopmental sequelae. *American Journal of Perinatology*, *13*(4), 211–215. <https://doi.org/10.1055/s-2007-994366>
- Botero, J. P., Lee, K., Branchford, B. R., Bray, P. F., Freson, K., Lambert, M. P., Luo, M., Mohan, S., Ross, J. E., Bergmeier, W., & Paola, J. di. (2020). Glanzmann thrombasthenia: Genetic basis and clinical correlates. *Haematologica*, *105*(4), 888–894. <https://doi.org/10.3324/haematol.2018.214239>
- Brojer, E., Husebekk, A., Dębska, M., Uhrynowska, M., Guz, K., Orzińska, A., Dębski, R., & Maślanka, K. (2016). Fetal/Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia: Pathogenesis, Diagnostics and Prevention. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, *64*(4), 279–290. <https://doi.org/10.1007/s00005-015-0371-9>
- Bussel, J. B., Berkowitz, R. L., Hung, C., Kolb, E. A., Wissert, M., Primiani, A., Tsaor, F. W., & MacFarland, J. G. (2010). Intracranial hemorrhage in alloimmune thrombocytopenia: Stratified management to prevent recurrence in the subsequent affected fetus. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *203*, 135.e1-135.e14. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2010.03.011>
- Bussel, J. B., Zabusky, M. R., Berkowitz, R. L., & Mcfarland, J. G. (1997). Fetal alloimmune thrombocytopenia. *The New England Journal of Medicine*, *337*(1), 22–26.
- Chakravorty, S., & Roberts, I. (2012). How I manage neonatal thrombocytopenia. In *British Journal of Haematology* (Vol. 156, Issue 2, pp. 155–162). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08892.x>
- Chen, P., Li, C., Lang, S., Zhu, G., Reheman, A., Spring, C. M., Freedman, J., & Ni, H. (2010). Animal model of fetal and neonatal immune thrombocytopenia: Role of neonatal Fc receptor in the pathogenesis and therapy. *Blood*, *116*(18), 3660–3668. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-284919>

- Chen, P., Melchior, C., Brons, N. H. C., Schlegel, N., Caen, J., & Kieffer, N. (2001). Probing Conformational Changes in the I-like Domain and the Cysteine-rich Repeat of Human β 3 Integrins following Disulfide Bond Disruption by Cysteine Mutations. *Journal of Biological Chemistry*, 276(42), 38628–38635. <https://doi.org/10.1074/jbc.M105737200>
- Chen, Z. Y., Oswald, B. E., Sullivan, J. A., Dahmani, F. Z., Pasman, Y., Liu, Z., Chen, P., & Ni, H. (2019). Platelet physiology and immunology: pathogenesis and treatment of classical and non-classical fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Annals of Blood*, 4. <https://doi.org/10.21037/aob.2019.12.04>
- de Vos, T. W., Winkelhorst, D., de Haas, M., Lopriore, E., & Oepkes, D. (2020). Epidemiology and management of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion and Apheresis Science*, 59(1), 102704. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2019.102704>
- Eksteen, M., Tiller, H., Averina, M., Heide, G., Kjaer, M., Ghevaert, C., Michaelsen, T. E., Ihle, Ø., Husebekk, A., Skogen, B., & Stuge, T. B. (2015). Characterization of a Human Platelet Antigen-1a–Specific Monoclonal Antibody Derived from a B Cell from a Woman Alloimmunized in Pregnancy. *The Journal of Immunology*, 194(12), 5751–5760. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401599>
- Ficko, T., Galvani, V., Ruprecht, R., Dovc, T., & Rožman, P. (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. *Transfusion Medicine*, 14(6), 425–432. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2004.00538.x>
- Fiore, M., Bayat, B., Phuangtham, R., Blouin, L., Huguenin, Y., Bein, G., & Santoso, S. (2020). Immunization against α IIb β 3 and α v β 3 in Glanzmann thrombasthenia patients carrying the French Gypsy mutation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. <https://doi.org/10.1111/jth.15117>
- Flug, F., Espinola, R., Liu, L. X., SinQuee, C., DaRosso, R., Nardi, M., & Karpatkin, S. (1991). A 13-mer peptide straddling the leucine33/proline33 polymorphism in glycoprotein IIIa does not define the PLA1 epitope. *Blood*, 77(9), 1964–1969. <https://doi.org/10.1182/blood.v77.9.1964.bloodjournal7791964>
- Funk, M., Heiden, M., & Müller, S. (2020). *Hämovigilanz-Bericht des Paul-Ehrlich-Instituts 2018: Auswertung der Meldungen von Reaktionen und Zwischenfällen nach § 63i AMG*. www.pei.de/haemovigilanzbericht

- Ghevaert, C., Campbell, K., Walton, J., Smith, G. A., Allen, D., Williamson, L. M., Ouwehand, W. H., & Ranasinghe, E. (2007). Management and outcome of 200 cases of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*, *47*(5), 901–910. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01208.x>
- Ghevaert, C., Herbert, N., Hawkins, L., Grehan, N., Cookson, P., Garner, S. F., Crisp-Hihn, A., Lloyd-Evans, P., Evans, A., Balan, K., Ouwehand, W. H., Armour, K. L., Clark, M. R., & Williamson, L. M. (2013). Recombinant HPA-1a antibody therapy for treatment of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia: proof of principle in human volunteers. *Blood*, *122*(3), 313–320. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-481887>
- Giltay, J., Leeksa, O., von dem Borne, A., & van Mourik, J. (1988). Alloantigenic composition of the endothelial vitronectin receptor. *Blood*, *72*(1), 230–233.
- Griffin, H. M., & Ouwehand, W. H. (1995). A human monoclonal antibody specific for the leucine-33 (Pl(A1), HPA-1a) form of platelet glycoprotein IIIa from a V gene phage display library. *Blood*, *86*(12), 4430–4436. <https://doi.org/10.1182/blood.v86.12.4430.bloodjournal86124430>
- Gruel, Y., Boizard, B., Daffos, F., Forestier, F., Caen, J., & Wautier, J. L. (1986). Determination of platelet antigens and glycoproteins in the human fetus. *Blood*, *68*(2), 488–492.
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell*, *110*, 673–687. <https://doi.org/10.1016/B978-012439510-7/50078-4>
- Johansen, M., Redman, C. W. G., Wilkins, T., & Sargent, I. L. (1999). Trophoblast deportation in human pregnancy: Its relevance for pre-eclampsia. *Placenta*, *20*(7), 531–539. <https://doi.org/10.1053/plac.1999.0422>
- Kamata, T., Ambo, H., Puzon-McLaughlin, W., Tieu, K. K., Handa, M., Ikeda, Y., & Takada, Y. (2004). Critical cysteine residues for regulation of integrin α IIb β 3 are clustered in the epidermal growth factor domains of the β 3 subunit. *Biochemical Journal*, *378*(3), 1079–1082. <https://doi.org/10.1042/bj20031701>
- Kamphuis, M. M., Paridaans, N. P., Porcelijn, L., Lopriore, E., & Oepkes, D. (2014). Incidence and consequences of neonatal alloimmune thrombocytopenia: A systematic review. *Pediatrics*, *133*(4), 715–721. <https://doi.org/10.1542/peds.2013-3320>
- Kannan, M., Ahmad, F., Yadav, B., Kumar, R., Choudhry, V., & Saxena, R. (2009). Molecular defects in ITGA2B and ITGB3 genes in patients with Glanzmann

- thrombasthenia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7(11), 1878–1885.
<https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03579.x>
- Kaplan, C., Freedman, J., Foxcroft, Z., Husebekk, A., Metcalfe, P., Muniz-Diaz, E., Ouwehand, W., Panzer, S., Rozman, P., & Skogen, B. (2007). Monoclonal platelet antigen capture assays (MAIPA) and reagents: A statement. *Vox Sanguinis*, 93(4), 298–299. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2007.00943.x>
- Kazatchkine, M. D., & Kaveri, S. v. (2001). Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin. *New England Journal of Medicine*, 345(10), 747–755.
- Kiefel, V., Bassler, D., Kroll, H., Paes, B., Giers, G., Ditomasso, J., Alber, H., Berns, M., Wiebe, B., Quenzel, E. M., Hoch, J., & Greinacher, A. (2006). Antigen-positive platelet transfusion in neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT). *Blood*, 107(9), 3761–3763. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2235>
- Kiefel, V., Kroll, H., & Mueller-Eckhardt, C. (1994). Neonatale Alloimmunthrombozytopenie. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 119(44), 1512–1517.
- Kiefel, V., Santoso, S., Weisheit, M., & Mueller-Eckhardt, C. (1987). Monoclonal Antibody-Specific Immobilization of Platelet Antigens (MAIPA): A New Tool for the Identification of Platelet-Reactive Antibodies. *Blood*, 70(6), 1722–1726.
- Killie, M. K., Husebekk, A., Kjeldsen-Kragh, J., & Skogen, B. (2008). A prospective study of maternal anti-HPA 1a antibody level as a potential predictor of alloimmune thrombocytopenia in the newborn. *Haematologica*, 93(6), 870–877. <https://doi.org/10.3324/haematol.12515>
- Kjær, M., Bertrand, G., Bakchoul, T., Massey, E., Baker, J. M., Lieberman, L., Tanael, S., Greinacher, A., Murphy, M. F., Arnold, D. M., Baidya, S., Bussel, J., Hume, H., Kaplan, C., Oepkes, D., Ryan, G., Savoia, H., Shehata, N., Kjeldsen-Kragh, J., ... Wood, E. (2019). Maternal HPA-1a antibody level and its role in predicting the severity of Fetal/Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia: a systematic review. *Vox Sanguinis*, 114(1), 79–94. <https://doi.org/10.1111/vox.12725>
- Kjær, M., Geisen, C., Akkök, Ç. A., Wikman, A., Sachs, U., Bussel, J. B., Nielsen, K., Walles, K., Curtis, B. R., Vidarsson, G., Järås, K., & Skogen, B. (2020). Strategies to develop a prophylaxis for the prevention of HPA-1a immunization and fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion and Apheresis Science*, 59(1), 102712. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2019.102712>

- Kjeldsen-Kragh, J., & Ahlen, M. T. (2020). Foetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia – The role of the HLA-DRB3*01:01 allele for HPA-1a-immunisation and foetal/neonatal outcome. *Transfusion and Apheresis Science*, *59*(1), 102707. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2019.102707>
- Kjeldsen-Kragh, J., & Bengtsson, J. (2020). Fetal and Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia—New Prospects for Fetal Risk Assessment of HPA-1a–Negative Pregnant Women. *Transfusion Medicine Reviews*, *34*(4), 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2020.09.004>
- Kjeldsen-Kragh, J., Killie, M. K., Tomter, G., Golebiowska, E., Randen, I., Hauge, R., Aune, B., Øian, P., Dahl, L. B., Pirhonen, J., Lindeman, R., Husby, H., Haugen, G., Grønn, M., Skogen, B., & Husebekk, A. (2007). A screening and intervention program aimed to reduce mortality and serious morbidity associated with severe neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood*, *110*(3), 833–839. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-040121>
- Kornecki, E., Chung, S.-Y., Holt, J. C., Cierniewski, C. S., Tuszynski, G. P., & Niewiarowski, S. (1985). Identification of P1A1 alloantigen domain on a 66 kDa protein derived from glycoprotein IIIa of human platelets. *Biochimica et Biophysica Acta*, *818*, 285–290.
- Kroll, H. K., Penke, G., & Santoso, S. (2005). Functional heterogeneity of alloantibodies against the human platelet antigen (HPA)-1a. *Thrombosis and Haemostasis*, *94*, 1224–1229. <https://doi.org/10.1160/TH05>
- Kumpel, B. M., & Manoussaka, M. S. (2012). Placental immunology and maternal alloimmune responses. *Vox Sanguinis*, *102*(1), 2–12. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2011.01533.x>
- Kumpel, B. M., Sibley, K., Jackson, D. J., White, G., & Soothill, P. W. (2008). Ultrastructural localization of glycoprotein IIIa (GPIIIa, β 3 integrin) on placental syncytiotrophoblast microvilli: Implications for platelet alloimmunization during pregnancy. *Transfusion*, *48*(10), 2077–2086. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2008.01832.x>
- Kunicki, T. J., & Aster, R. H. (1979). Isolation and immunologic characterization of the human platelet alloantigen, P1A1. *Molecular Immunology*, *16*(6), 353–360. [https://doi.org/10.1016/0161-5890\(79\)90100-7](https://doi.org/10.1016/0161-5890(79)90100-7)

- L'Abbé, D., Tremblay, L., Filion, M., Busque, L., Goldman, M., Décarry, F., & Chartrand, P. (1992). Alloimmunization to Platelet antigen HPA-1a (PIA1) is strongly associated with both HLA-DRB3*0101 and HLA-DQB1*0201. *Human Immunology*, *34*(2), 107–114. [https://doi.org/10.1016/0198-8859\(92\)90036-M](https://doi.org/10.1016/0198-8859(92)90036-M)
- Laguerre, M., Sabi, E., Daly, M., Stockley, J., Nurden, P., Pillois, X., & Nurden, A. T. (2013). Molecular dynamics analysis of a novel $\beta 3$ Pro189Ser mutation in a patient with Glanzmann thrombasthenia differentially affecting $\alpha \text{IIb}\beta 3$ and $\alpha \text{v}\beta 3$ expression. *PLoS ONE*, *8*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078683>
- Li, C., Chen, P., Vadasz, B., Ma, L., Zhou, H., Lang, S., Freedman, J., & Ni, H. (2013). Co-stimulation with LPS or Poly I:C markedly enhances the anti-platelet immune response and severity of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Thrombosis and Haemostasis*, *110*(6), 1250–1258. <https://doi.org/10.1160/TH13-04-0354>
- Li, C. Q., Garner, S. F., Davies, J., Smethurst, P. A., Wardell, M. R., & Ouweland, W. H. (2000). Threonine-145/Methionine-145 variants of baculovirus produced recombinant ligand binding domain of GPIIb α express HPA-2 epitopes and show equal binding of von Willebrand factor. *Blood*, *95*(1), 205–211. <https://doi.org/10.1182/blood.v95.1.205>
- Lieberman, L., Greinacher, A., Murphy, M. F., Bussel, J., Bakchoul, T., Corke, S., Kjaer, M., Kjeldsen-Kragh, J., Bertrand, G., Oepkes, D., Baker, J. M., Hume, H., Massey, E., Kaplan, C., Arnold, D. M., Baidya, S., Ryan, G., Savoia, H., Landry, D., & Shehata, N. (2019). Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: recommendations for evidence-based practice, an international approach. *British Journal of Haematology*, *185*(3), 549–562. <https://doi.org/10.1111/bjh.15813>
- Liu, Z.-J., Bussel, J., & Sola-Visner, M. (2015). Suppression of in vitro megakaryopoiesis by maternal sera containing anti-HPA-1a antibodies. *Blood*, *126*(10), 1234–1236. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-11-611020>
- Milet-Marsal, S., Breillat, C., Peyruchaud, O., Nurden, P., Combrié, R., Nurden, A. T., & Bourre, F. (2002). Two different $\beta 3$ cysteine substitutions alter $\alpha \text{IIb}\beta 3$ maturation and result in Glanzmann thrombasthenia. *Thrombosis and Haemostasis*, *88*(1), 104–110. <https://doi.org/10.1055/s-0037-1613161>
- Mor-Cohen, R., Rosenberg, N., Einav, Y., Zelzion, E., Landau, M., Mansour, W., Averbukh, Y., & Seligsohn, U. (2012). Unique disulfide bonds in epidermal growth factor (EGF) domains of $\beta 3$ affect structure and function of $\alpha \text{IIb}\beta 3$ and $\alpha \text{v}\beta 3$ integrins in

- different manner. *Journal of Biological Chemistry*, 287(12), 8879–8891. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.311043>
- Mueller-Eckhardt, C., Grubert, A., Weisheit, M., Mueller-Eckhardt, G., Kiefel, V., Kroll, H., Schmidt, S., & Santoso, S. (1989). 348 cases of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia. *The Lancet*, 1(8634), 363–366. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(89\)91733-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(89)91733-9)
- Murphy, K., & Weaver, C. (2018). *Janeway Immunologie* (9. Auflage, p. 518).
- Negi, V. S., Elluru, S., Sibénil, S., Graff-Dubois, S., Mouthon, L., Kazatchkine, M. D., Lacroix-Desmazes, S., Bayry, J., & Kaveri, S. v. (2007). Intravenous immunoglobulin: An update on the clinical use and mechanisms of action. *Journal of Clinical Immunology*, 27(3), 233–245. <https://doi.org/10.1007/s10875-007-9088-9>
- Newman, P. J., Derbes, R. S., & Aster, R. H. (1989). The human platelet alloantigens, PI(A1) and PI(A2), are associated with a leucine³³/proline³³ amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *Journal of Clinical Investigation*, 83(5), 1778–1781. <https://doi.org/10.1172/JCI114082>
- Nurden, A. T., Fiore, M., Nurden, P., & Pillois, X. (2011). Glanzmann thrombasthenia: a review of ITGA2B and ITGB3 defects with emphasis on variants, phenotypic variability, and mouse models. *Blood*, 118(23), 5996–6005. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-365635>.The
- Nurden, A. T., Pillois, X., Fiore, M., Alessi, M. C., Bonduel, M., Dreyfus, M., Goudemand, J., Gruel, Y., Benabdallah-Guerida, S., Latger-Cannard, V., Négrier, C., Nugent, D., Oiron, R. d., Rand, M. L., Sié, P., Trossaert, M., Alberio, L., Martins, N., Sirvain-Trukniewicz, P., ... Vinciguerra, C. (2015). Expanding the mutation spectrum affecting α IIb β 3 integrin in glanzmann thrombasthenia: Screening of the ITGA2B and ITGB3 genes in a large international cohort. *Human Mutation*, 36(5), 548–561. <https://doi.org/10.1002/humu.22776>
- Ohto, H., Miura, S., Ariga, H., Ishii, T., Fujimori, K., Morita, S., Takeuchi, C., Tohyama, Y., Yamaguchi, T., Anzai, M., Ujiie, N., Okawa, T., Sato, A., Suzuki, H., Okada, T., Ishijima, A., Inoue, S., Enomoto, T., Hando, K., ... Kim, S. (2004). The natural history of maternal immunization against foetal platelet alloantigens. *Transfusion Medicine*, 14(6), 399–408. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2004.00535.x>

- Peterson, J. A., Mcfarland, J. G., Curtis, B. R., & Aster, R. H. (2013). Neonatal alloimmune thrombocytopenia: Pathogenesis, diagnosis and management. *British Journal of Haematology*, *161*(1), 3–14. <https://doi.org/10.1111/bjh.12235>
- Phuangtham, R., Romphruk, A., Puapairoj, C., Leelayuwat, C., & Romphruk, A. v. (2017). Human platelet antigens in Burmese, Karen and north-eastern Thais. *Transfusion Medicine*, *27*(1), 60–65. <https://doi.org/10.1111/tme.12362>
- Porcelijn, L., Huiskes, E., & de Haas, M. (2020). Progress and development of platelet antibody detection. *Transfusion and Apheresis Science*, *59*(1), 102705. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2019.102705>
- Rayment, R., Brunskill, S. J., Soothill, P. W., Roberts, D. J., Bussel, J. B., & Murphy, M. F. (2005). Antenatal interventions for fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, *1*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004226.pub2>
- Ruan, J., Schmutz, M., Clemetson, K. J., Cazes, E., Combrie, R., Bourre, F., & Nurden, A. T. (1999). Homozygous cys542 → Arg substitution in GPIIIa in a Swiss patient with type I Glanzmann's thrombasthenia. *British Journal of Haematology*, *105*(2), 523–531. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1999.01376.x>
- Sachs, U. J. (2013). Fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Thrombosis Research*, *131*(Suppl. 1), S42–S46. <https://doi.org/10.1016/j.emcped.2004.10.002>
- Sachs, U. J. (2020). Prospects for risk stratification of anti-HPA-1a alloimmunized pregnant women. *Transfusion and Apheresis Science*, *59*(1), 102709. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2019.102709>
- Sachs, U. J., Bakchoul, T., & Bein, G. (2012). Fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie - Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie. *Transfusionsmedizin*, *2*(2), 77–89. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1283993>
- Sandrock-Lang, K., Johannes, O., Wiegering, V., Halimeh, S., Santoso, S., Kurnik, K., Fischer, L., Tsakiris, D. A., Sigl-Kraetzig, M., Brand, B., Bührlen, M., Kraetzer, K., Deeg, N., Hund, M., Busse, E., Kahle, A., & Zieger, B. (2015). Characterisation of patients with Glanzmann thrombasthenia and identification of 17 novel mutations. *Thrombosis and Haemostasis*, *113*(4), 782–791. <https://doi.org/10.1160/th14-05-0479>
- Santoso, S., Wihadmadyatami, H., Newman, P., Bayat, B., & Sachs, U. (2016). Anti-endothelial $\alpha\beta 3$ antibodies are a major cause of intracranial bleeding in fetal-

- neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 36(8), 1517–1524. <https://doi.org/10.1186/s40945-017-0033-9>. Using
- Scheffer, P. G., Ait Soussan, A., Verhagen, O. J. H. M., Page-Christiaens, G. C. M. L., Oepkes, D., de Haas, M., & van der Schoot, C. E. (2011). Noninvasive fetal genotyping of human platelet antigen-1a. *BJOG*, 118(11), 1392–1395. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2011.03039.x>
- Schiano, T. D., Bellary, S. v., & Black, M. (1995). Possible Transmission of Hepatitis C Virus Infection with Intravenous Immunoglobulin. *Annals of Internal Medicine*, 122(10), 802–803.
- Socher, I., Andrei-Selmer, C., Bein, G., Kroll, H., & Santoso, S. (2009). Low-avidity HPA-1a alloantibodies in severe neonatal alloimmune thrombocytopenia are detectable with surface plasmon resonance technology. *Transfusion*, 49(5), 943–952. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2008.02065.x>
- Sonneveld, M. E., Natunen, S., Sainio, S., Koeleman, C. A. M., Holst, S., Dekkers, G., Koelewijn, J., Partanen, J., van der Schoot, C. E., Wuhrer, M., & Vidarsson, G. (2016). Glycosylation pattern of anti-platelet IgG is stable during pregnancy and predicts clinical outcome in alloimmune thrombocytopenia. *British Journal of Haematology*, 174(2), 310–320. <https://doi.org/10.1111/bjh.14053>
- Stafford, P., Ghevaert, C. J. G., Campbell, K., Proulx, C., Smith, G., Williamson, L. M., Ranasinghe, E., Watkins, N. A., Huntington, J. A., & Ouweland, W. H. (2008). Immunologic and structural analysis of eight novel domain-deletion $\beta 3$ integrin peptides designed for detection of HPA-1 antibodies. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 6, 366–375. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.02858.x>
- Tang, X.-Y., Li, Y.-F., & Tan, S.-M. (2008). Intercellular Adhesion Molecule-3 Binding of Integrin $\alpha L\beta 2$ Requires Both Extension and Opening of the Integrin Headpiece. *The Journal of Immunology*, 180(7), 4793–4804. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4793>
- Thinn, A. M. M., Wang, Z., Zhou, D., Zhao, Y., Curtis, B. R., & Zhu, J. (2018). Autonomous conformational regulation of $\beta 3$ integrin and the conformation-dependent property of HPA-1a alloantibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(39), E9105–E9114. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806205115>
- Tiller, H., Husebekk, A., Skogen, B., Kjeldsen-Kragh, J., & Kjær, M. (2016). True risk of fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia in subsequent pregnancies: A

- prospective observational follow-up study. *BJOG*, 123(5), 738–744.
<https://doi.org/10.1111/1471-0528.13343>
- Tiller, H., Kamphuis, M. M., Flodmark, O., Papadogiannakis, N., David, A. L., Sainio, S., Koskinen, S., Javela, K., Wikman, A. T., Kekomaki, R., Kanhai, H. H. H., Oepkes, D., Husebekk, A., & Westgren, M. (2013). Fetal intracranial haemorrhages caused by fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: An observational cohort study of 43 cases from an international multicentre registry. *BMJ Open*, 3(3).
<https://doi.org/10.1136/bmjopen-2012-002490>
- Tiller, H., Killie, M. K., Chen, P., Eksteen, M., Husebekk, A., Skogen, B., Kjeldsen-Kragh, J., & Ni, H. (2012). Toward a prophylaxis against fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: induction of antibody-mediated immune suppression and prevention of severe clinical complications in a murine model. *Transfusion*, 52(7), 1446–1457. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03480.x>
- Tiller, H., Killie, M. K., Husebekk, A., Skogen, B., Ni, H., Kjeldsen-Kragh, J., & Øian, P. (2012). Platelet antibodies and fetal growth: Maternal antibodies against fetal platelet antigen 1a are strongly associated with reduced birthweight in boys. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, 91(1), 79–86.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0412.2011.01269.x>
- Uhrynowska, M., Maslanka, K., & Zupanska, B. (1997). Neonatal thrombocytopenia: Incidence, serological and clinical observations. *American Journal of Perinatology*, 14(7), 415–418. <https://doi.org/10.1055/s-2007-994171>
- Unkelbach, U., Hunfeld, A., & Breitner-Ruddock, S. (2014). Prüfung von aus gepooltem Plasma hergestellten Produkten. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 57(10), 1181–1184. <https://doi.org/10.1007/s00103-014-2035-z>
- Valentin, N., Visentin, G. P., & Newman, P. J. (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*, 85(11), 3028–3033.
- van der Lugt, N. M., Kamphuis, M. M., Paridaans, N. P. M., Figuee, A., Oepkes, D., Walther, F. J., & Lopriore, E. (2015). Neonatal outcome in alloimmune thrombocytopenia after maternal treatment with intravenous immunoglobulin. *Blood Transfusion*, 13(1), 66–71. <https://doi.org/10.2450/2014.0309-13>

- van Gils, J. M., Stutterheim, J., van Duijn, T. J., Zwaginga, J. J., Porcelijn, L., de Haas, M., & Hordijk, P. L. (2009). HPA-1a alloantibodies reduce endothelial cell spreading and monolayer integrity. *Molecular Immunology*, *46*(3), 406–415. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.10.015>
- Versiti (October, 2020). *HPA Database*. (2020, October). <https://www.versiti.org/hpa>
- Wienzek-Lischka, S., Krautwurst, A., Fröhner, V., Hackstein, H., Gattenlöhner, S., Bräuninger, A., Axt-Fliedner, R., Degenhardt, J., Deisting, C., Santoso, S., Sachs, U. J., & Bein, G. (2015). Noninvasive fetal genotyping of human platelet antigen-1a using targeted massively parallel sequencing. *Transfusion*, *55*(6), 1538–1544. <https://doi.org/10.1111/trf.13102>
- Wihadmyatami, H., Heidinger, K., Röder, L., Werth, S., Giptner, A., Hackstein, H., Knorr, M., Bein, G., Sachs, U. J., & Santoso, S. (2015). Alloantibody against new platelet alloantigen (Lapa) on glycoprotein IIb is responsible for a case of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*, *55*(12), 2920–2929. <https://doi.org/10.1111/trf.13238>
- Williamson, L. M., Hackett, G., Rennie, J., Palmer, C. R., Maciver, C., Hadfield, R., Hughes, D., Jobson, S., & Ouwehand, W. H. (1998). The natural history of fetomaternal alloimmunization to the platelet-specific antigen HPA-1a (PIA1, Zwa) as determined by antenatal screening. *Blood*, *92*(7), 2280–2287. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9746765>
- Winkelhorst, D., Murphy, M. F., Greinacher, A., Shehata, N., Bakchoul, T., Massey, E., Baker, J., Lieberman, L., Tanael, S., Hume, H., Arnold, D. M., Baidya, S., Bertrand, G., Bussel, J., Kjaer, M., Kaplan, C., Kjeldsen-Kragh, J., Oepkes, D., & Ryan, G. (2017). Antenatal management in fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: A systematic review. *Blood*, *129*(11), 1538–1547. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-739656>
- Winkelhorst, D., Oepkes, D., & Lopriore, E. (2017). Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: evidence based antenatal and postnatal management strategies. *Expert Review of Hematology*, *10*(8), 729–737. <https://doi.org/10.1080/17474086.2017.1346471>
- Xiao, T., Takagi, J., Coller, B. S., Wang, J.-H., & Springer, T. A. (2004). Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature*, *432*(7013), 59–67. <https://doi.org/10.1038/nature02976>

- Xiong, J. P., Mahalingham, B., Alonso, J. L., Borrelli, L. A., Rui, X., Anand, S., Hyman, B. T., Rysiok, T., Müller-Pompalla, D., Goodman, S. L., & Arnaout, M. A. (2009). Crystal structure of the complete integrin $\alpha V\beta 3$ ectodomain plus an α/β transmembrane fragment. *Journal of Cell Biology*, *186*(4), 589–600. <https://doi.org/10.1083/jcb.200905085>
- Xu, X., Li, L., Xia, W., Ding, H., Chen, D., Liu, J., Deng, J., Chen, Y., He, Z., Wang, J., Shao, Y., Santoso, S., Ye, X., & Fang, Q. (2018). Successful management of a hydropic fetus with severe anemia and thrombocytopenia caused by anti-CD36 antibody. *International Journal of Hematology*, *107*(2), 251–256. <https://doi.org/10.1007/s12185-017-2310-5>
- Yap, P. L. (1996). The viral safety of intravenous immune globulin. *Clinical and Experimental Immunology, Supplement*, *104*(SUPPL. 1), 35–42. <https://doi.org/10.1111/cei.1996.104.s1.35>
- Yougbaré, I., Lang, S., Yang, H., Chen, P., Zhao, X., Tai, W. S., Zdravic, D., Vadasz, B., Li, C., Piran, S., Marshall, A., Zhu, G., Tiller, H., Killie, M. K., Boyd, S., Leong-Poi, H., Wen, X. Y., Skogen, B., Adamson, S. L., ... Ni, H. (2015). Maternal anti-platelet $\beta 3$ integrins impair angiogenesis and cause intracranial hemorrhage. *The Journal of Clinical Investigation*, *125*(4), 1545–1556. <https://doi.org/10.1172/JCI77820>
- Zhi, H., Ahlen, M. T., Thinn, A. M. M., Weiler, H., Curtis, B. R., Skogen, B., Zhu, J., & Newman, P. J. (2018). High-resolution mapping of the polyclonal immune response to the human platelet alloantigen HPA-1a (Pl A1). *Blood Advances*, *2*(21), 3001–3011. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018023341>

11 Publikationsverzeichnis

11.1 Publikationen

Holzwarth, S. T., Strobel, J., Cooper, N., Leyh, J., Bayat, B., Bein, G., Zingsem, J., & Sachs, U. J. (2020)

A point mutation c.473A > G of ITGB3 is responsible for the formation of the Wo^a human platelet alloantigen

Transfusion, 60(1), E5–E6. <https://doi.org/10.1111/trf.15640>

Holzwarth, S. T., Bayat, B., Zhu, J., Phuangtham, R., Fischer, L., Boeckelmann, D., Röder, L., Berghöfer, H., Schmidt, S., Bein, G., & Santoso, S. (2020)

Naturally occurring point mutation Cys460Trp located in the I-EGF1 domain of integrin β 3 alters the binding of some anti-HPA-1a antibodies

Transfusion, 60(9), 2097–2107. <https://doi.org/10.1111/trf.15960>

11.2 Vorträge

Holzwarth S., Bayat B., Traum A., Röder L., Berghöfer H., Sachs U., Bein G., Sentot S.
Naturally occurring point mutation Cys460Trp on the EFG-1 domain of β 3 integrin alters the binding of some anti-HPA-1a antibodies

52. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie e.V. (DGTI), 18.–20. September 2019, Mannheim

Holzwarth S. T., Bayat B., Zhu J., Phuangtham R., Fischer L., Boeckelmann D., Roeder L., Berghöfer H., Schmidt S., Bein G., Santoso S.

Naturally occurring point mutation Cys460Trp on EGF-1 domain of β 3 integrin alters the binding of some anti-HPA-1a antibodies

36th International Congress of the ISBT, 12-16 December, 2020, Virtual Congress

12 Ehrenwörtliche Erklärung

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

Ort/Datum

Unterschrift

13 Danksagung

Ohne die Unterstützung zahlreicher Menschen wäre die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen, deshalb möchte ich ihnen an dieser Stelle danken. Ich danke Herrn Prof. Sachs herzlich für die Überlassung des Themas, sein offenes Ohr für Ideen und Fragen zur Versuchsdurchführung und wissenschaftlichem Schreiben sowie die hilfreichen Rückmeldungen zum Konzept.

Frau Dr. Behnaz Bayat danke ich für ihre wertschätzende Haltung in der Mitbetreuung dieser Arbeit und ihre Unterstützung bei der Versuchsplanung.

Herr Dr. Santoso gilt mein Dank für die Gespräche zur wissenschaftlichen Einordnung der Ergebnisse – sie haben mich über den Tellerrand meiner Arbeit schauen lassen.

Ich bedanke mich bei Silke Schmidt, Heike Berghöfer, Lida Röder, Annalena Traum und Dawei Chen sowie bei allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für die Einführung in die Labortechniken und die Beantwortung vieler Fragen.

Danke an meine Familie und WG, die Schreibheimaten geboten haben. Danke an beide Johannas, Melinda und meine Mama für das Korrekturlesen, hilfreiche Kommentare und ergänzte Kommata.

Ganz besonders danken möchte ich den Patienten, ihren Familien und behandelnden Kliniken, die durch Ihre Bereitschaft, Blutproben zur Verfügung zu stellen und in die wissenschaftliche Bearbeitung dieser einzuwilligen, die vorliegende Untersuchung überhaupt erst möglich gemacht haben.

Nicht zuletzt danke ich dem HERRN, der begabt und erschafft, tröstet und ermutigt, gute Umstände und Möglichkeiten geschaffen hat.