

Hirnblutungen im Rahmen der  
fetalen/neonatalen Alloimmunthrombozytopenie:  
Der Einfluss endothelspezifischer Antikörper auf die *in vitro* Angiogenese

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

vorgelegt von Ahmadi, Jalda  
aus Münster

Gießen 2024

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

Frau Jalda Ahmadi hat das strukturierte Promotionsprogramm JLU TRAINEE  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen erfolgreich  
abgeschlossen.

Gutachter: Prof. Dr. G. Bein

Gutachter: PD Dr. M. Aslam

Tag der Disputation: 28.11.2024

*Meinen Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
	1.1 Fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie.....	1
	1.1.1 Definition .....	1
	1.1.2 Epidemiologie und Ätiopathogenese.....	2
	1.1.3 Symptome .....	9
	1.1.4 Diagnostik .....	9
	1.1.5 Differentialdiagnosen .....	10
	1.1.6 Prophylaxe .....	10
	1.1.7 Therapie .....	11
	1.1.8 Prognose und Screening.....	12
	1.2 Angiogenese.....	12
	1.3 $\alpha\beta 3$ Integrin.....	13
	1.4 Anoikis .....	15
	1.5 Die Rolle der Angiogenese, des $\alpha\beta 3$ Integrins und der Anoikis im Rahmen der FNAIT .....	17
<b>2</b>	<b>Ziel der Dissertation und Hypothese .....</b>	<b>18</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>19</b>
	3.1 Antikörper .....	19
	3.2 Geräte und Materialien .....	20
	3.3 Chemikalien .....	21
	3.4 HUVEC Isolation.....	22
	3.5 Zellkultur .....	24
	3.6 Tube Formation Assay.....	24
	3.7 Antikörper-Bindungsnachweis mittels Durchflusszytometrie .....	29
	3.8 Antikörper-Deglykosylierung .....	30
	3.9 SDS-Page.....	32
	3.10 Silberfärbung .....	33
	3.11 Absorptionsversuche .....	34
	3.12 Puffer .....	35
	3.13 Indirekter MAIPA/MAIEA (Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet/Endothelial Antigens Assay).....	35

<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>38</b>
	4.1 Gepoolte HUVECs weisen einen niedrigeren Variationskoeffizienten im Tube Formation Assay auf.....	38
	4.2 Die Kinetik der <i>in vitro</i> Angiogenese von HUVEC Pool Zellen im Tube Formation Assay.....	40
	4.3 Durchflusszytometrische Phänotypisierung der HUVECs.....	42
	4.4 Monoklonale Antikörper hemmen die <i>in vitro</i> Angiogenese.....	43
	4.5 Monoklonale Anti-HLA- und Anti-HPA-1a Antikörper hemmen die <i>in vitro</i> Angiogenese nicht.....	49
	4.6 Deglykosylierung monoklonaler Antikörper.....	50
	4.7 Der Fcγ Rezeptor Typ II trägt zur anti-angiogenetischen Wirkung von 23C6 bei.....	51
	4.8 <i>In vitro</i> Angiogenese nach Vorbehandlung der Endothelzellen mit LPS und TNF-α.....	52
	4.9 Das Serum von Patientinnen mit FNAIT und fetaler Hirnblutung hemmt die <i>in vitro</i> Angiogenese.....	55
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>71</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>73</b>
<b>10</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>75</b>
<b>11</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>76</b>
<b>12</b>	<b>Ethikvotum .....</b>	<b>88</b>
<b>13</b>	<b>Publikationsverzeichnis.....</b>	<b>89</b>
<b>14</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>90</b>
<b>15</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>91</b>
<b>16</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>92</b>

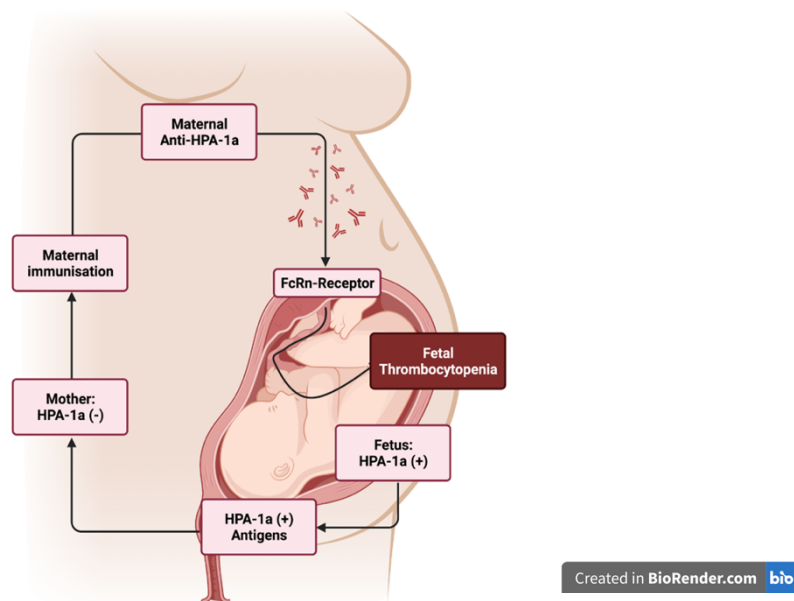
# 1 Einleitung

## 1.1 Fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie

### 1.1.1 Definition

Die fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT) stellt mit einer Inzidenz von circa 1/1000 Lebendgeburten eine der häufigsten Ursachen einer schweren isolierten Thrombozytopenie (Thrombozytenzahl  $< 50 \times 10^9/L$ ) bei Feten und Neugeborenen dar (M. M. Kamphuis et al., 2014). Das Kind ererbt vom Vater ein humanes Plättchenantigen (HPA), welches auf Thrombozyten exprimiert wird, während die Schwangere für dieses HPA-Antigen negativ ist; aufgrund dieser fetomaternalen Inkompatibilität kann die Schwangere immunisiert werden und Alloantikörper vom IgG-Typ (Immunglobulin G) bilden, die diaplazentar auf das Kind übertragen werden (Abb. 1); in der kindlichen Zirkulation können die mütterlichen Antikörper zum Abbau von Thrombozyten führen, was beispielsweise durch petechiale Hauteinblutungen nach der Geburt erkennbar wird (Kjeldsen-Kragh et al., 2007). In 10 von 100.000 Schwangerschaften resultiert die Erkrankung in intrakraniellen Blutungen (ICH), die nicht nur zu neurologischen Ausfallerscheinungen oder intrauterinen Wachstumsretardierungen, sondern auch zum Kindstod führen können (M. M. Kamphuis et al., 2014).

Abbildung 1: **Immunisierung der Mutter im Rahmen der FNAIT**; Schwangere Frauen immunisieren sich gegen das fetale humane Plättchenantigen (HPA)-1a Antigen und produzieren Anti-HPA-1a Antikörper. Diese Antikörper passieren die Plazenta, treten in das fetale Blutssystem ein und lösen so die FNAIT (fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie) aus. Erstellt mittels BioRender.com



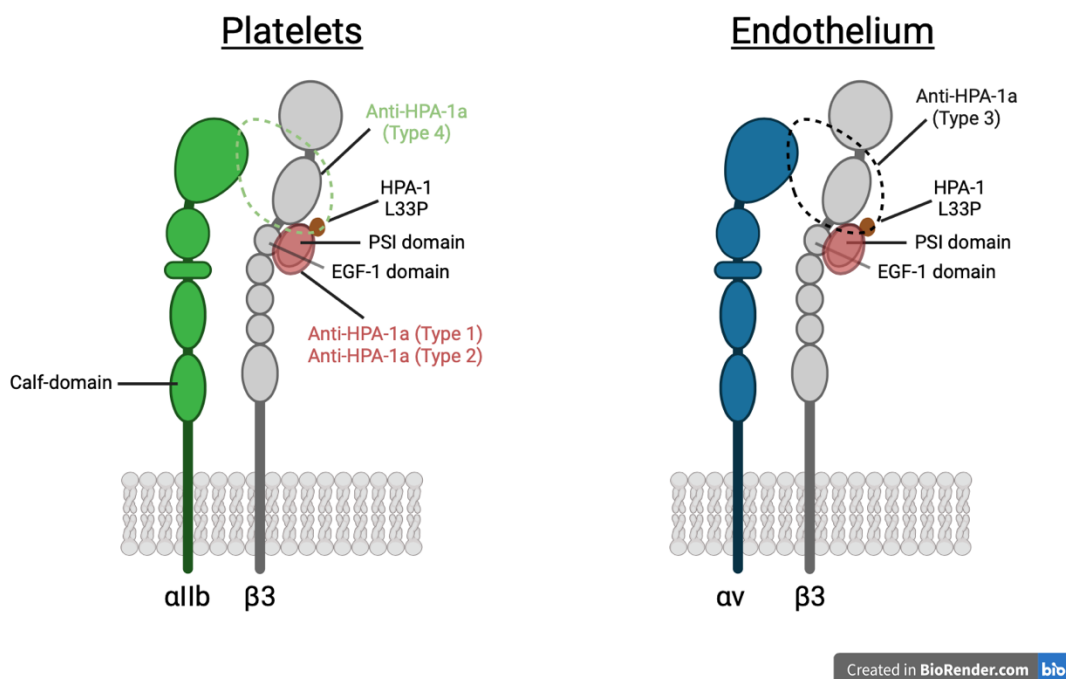
### 1.1.2 Epidemiologie und Ätiopathogenese

Insgesamt werden etwa 75 % der FNAIT-Fälle bei Kaukasiern durch Anti-HPA-1a-Antikörper verursacht (Kroll et al., 2005). Der erste Antikörper gegen HPA-1a wurde 1959 bei einem Patienten mit posttransfusioneller Purpura entdeckt (Loghem et al., 1959). Das HPA-1a/b Antigen ist auf dem  $\beta$ 3-Integrin (Glykoprotein IIIa, CD61) unterschiedlicher Zellen lokalisiert (Newman et al., 1989). Die kodierende Region des HPA-Gens weist durch den Basenaustausch T  $\rightarrow$  C im Nukleotid 196 einen Polymorphismus auf, der für den Wechsel von Leucin (Leu33, HPA-1a) zu Prolin (Pro33, HPA-1b) verantwortlich ist (Newman et al., 1989). Diese Leu33Pro Position befindet sich an der sogenannten Plexin-Semaphorin-Integrin-Domäne (PSI-Domäne) des Integrins; die PSI-Domäne stellt mit der EGF-1 und -2 (epidermal growth factor) Region das  $\beta$ 3-„Knie“ dar und sorgt nach aktivierender Signaltransduktion für eine gestreckte Konformationsänderung des Glykoproteins (Jallu et al., 2012). Mit der  $\alpha$ IIb-Integrinkette auf Thrombozyten stellt  $\beta$ 3 den Rezeptor für Fibrinogen dar ( $\alpha$ IIb $\beta$ 3, CD41/61) und trägt zur Plättchenadhäsion sowie -aggregation bei (Bennett, 2005).  $\beta$ 3 wird einschließlich seiner HPA-Epitope als Komplex mit dem  $\alpha$ v-Integrin ( $\alpha$ v $\beta$ 3, CD51/61) vorwiegend auf Endothelzellen exprimiert und fungiert als Vitronektinrezeptor, der bei der Adhäsion an die Extrazellulärmatrix, der Zellproliferation und Angiogenese eine wesentliche Rolle spielt (Felding-Habermann & Cheresh, 1993). Insgesamt gibt es vier unterschiedliche Subtypen der Anti-HPA-1a-Antikörper (Tab. 1 und Abb. 2) (Xu, Fu, et al., 2021):

Tabelle 1: **Subtypen der Anti-HPA-1a-Antikörper**; Anti-HPA (humanes Plättchenantigen) 1a-Antikörper Typ 1 und 2 sind weitestgehend nicht komplexspezifisch und binden an Thrombozyten sowie Endothelzellen (Zhi et al., 2018). Typ 1 erkennt lediglich die PSI (Plexin-Semaphorin-Integrin)-Domäne des Integrins als Epitop, Typ 2 geht an der PSI- sowie der EGF-1 (epidermal growth factor)-Domäne mit dem Glykoprotein eine Bindung ein; Typ 3 und Typ 4 sind komplexspezifisch; die Anti- $\alpha\beta$ 3-Antikörper vom Typ 3 binden stark an Endothelzellen und schwach an Thrombozyten; Typ 4 weist eine hohe Affinität zum  $\alpha\text{IIb}\beta$ 3 Integrin der Thrombozyten auf (Xu, Fu, et al., 2021).

Anti-HPA-1a-Antikörper	Epitop	Integrin	Zellspezifität
<i>Typ 1</i>	PSI-Domäne	$\beta$ 3	Thrombozyten- und Endothel-spezifisch
<i>Typ 2</i>	PSI-Domäne + EGF-1-Domäne	$\beta$ 3	Thrombozyten- und Endothel-spezifisch
<i>Typ 3</i>	$\alpha$ v Integrin + $\beta$ 3 Integrin	$\alpha\beta$ 3	Endothel-spezifisch
<i>Typ 4</i>	$\alpha\text{IIb}$ Integrin + $\beta$ 3 Integrin	$\alpha\text{IIb}\beta$ 3	Thrombozyten-spezifisch

Abbildung 2: **Schematische Darstellung des  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  und  $\alpha\text{v}\beta_3$  Integrins**; Integrine sind bidirektionale, membranständige Proteine mit der Aufgabe der Zellwanderung und -differenzierung, Adhäsion an die Extrazellulärmatrix sowie zytoskelettale Organisation (Leavesley et al., 1993). Sie setzen sich aus einer Domäne, die extrazellulär liegt, einer transmembranen Helix und einem kleinen, intrazellulär gelegenen Anteil zusammen (Lau et al., 2009). Die  $\alpha\text{v}$ -Kette sowie  $\alpha\text{IIb}$ -Kette bilden jeweils mit der  $\beta_3$  Untereinheit der beiden abgebildeten Glykoproteine einen funktionellen Rezeptor (links Fibrinogenrezeptor auf Thrombozyten und rechts Vitronektinrezeptor auf Endothelzellen); die intrazellulär lokalisierte Domäne dient dem Inside-Out-Signaling (intrazelluläre Kaskade sorgt für eine Erhöhung der Affinität des Integrins für extrazellulär gelegene Liganden), die extrazellulär lokalisierte wiederum dem Outside-In-Signaling (ein Adhäsionsmolekül wie Vitronektin, Fibrinogen oder vWF (von Willebrandt Faktor) bindet das Integrin und löst eine intrazelluläre Signalkaskade als Antwort auf die Ligandenbindung aus) (Ginsberg et al., 2005). Abbildung modifiziert nach Xu, Fu, et al., 2021; erstellt mittels BioRender.com



Die HPA-1a-spezifischen Antikörper binden zum einen Plättchen und aktivieren mit ihrem Fc-Fragment die Makrophagen zur Phagozytose, wodurch eine Thrombozytopenie ausgelöst wird; zum anderen werden Endothelzellen über das  $\alpha\text{v}\beta_3$ -Integrin in ihrer vaskulären Funktion so gehemmt, dass intrakranielle Blutungen ausgelöst werden können (Santoso et al., 2016). Die komplexe, polyklonale Immunantwort der HPA-1a-negativen Mütter ist heterogen und individuell, wodurch sich die Symptome und der klinische Schweregrad der HPA-1a-immunisierten Mütter unterscheiden; insgesamt weist das Antikörperprofil der Anti-HPA-1a-Antikörper aufgrund der unterschiedlichen Subtypen (Tab. 1) eine große Diversität auf, was die

Entwicklung eines präventiven und diagnostischen Algorithmus erschwert (Sachs, 2020).

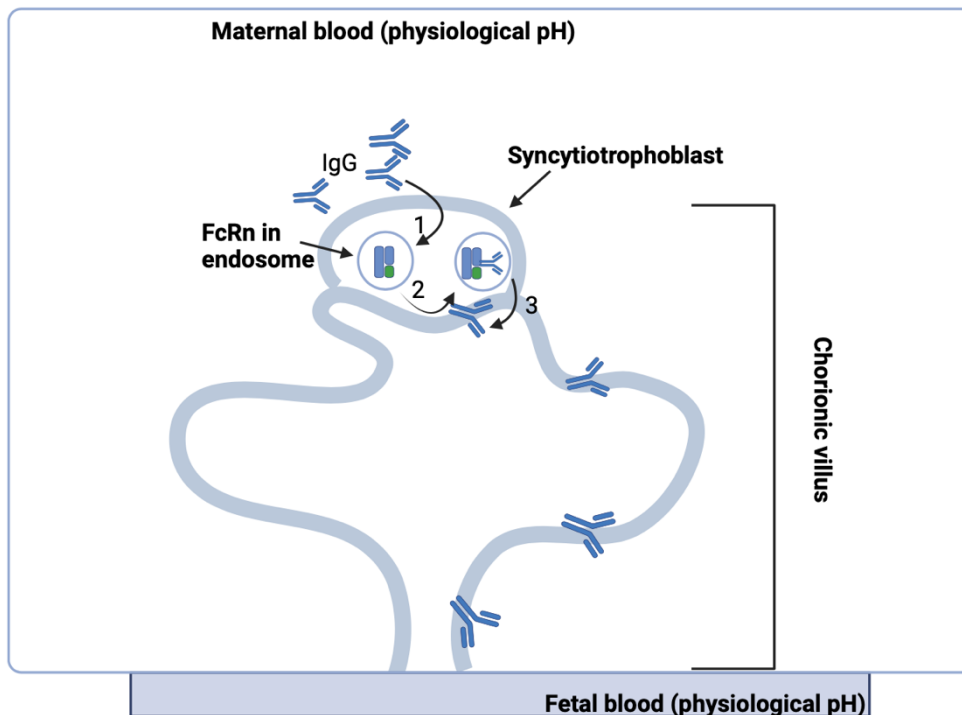
Im Rahmen einer Studie an 100.000 Schwangeren hat sich gezeigt, dass circa 2000 Frauen HPA-1a-negativ waren, während nur bei 200 von diesen Anti-HPA-1a-Antikörper detektiert werden konnten und es somit in circa 10 % der Fälle mit HPA-1a-Inkompatibilität zwischen Mutter und Kind zur Alloimmunisierung kommt; darunter waren 40 Neugeborene mit schwerer Thrombozytopenie ( $< 50 \times 10^9/L$ ); in einer Meta-Analyse wurde geschätzt, dass in 10 von 100.000 Schwangerschaften eine fetale intrakranielle Blutung infolge einer FNAIT auftritt (M. Kamphuis et al., 2010; M. M. Kamphuis et al., 2014). Männliche Feten sind häufiger von einer schweren Verlaufsform betroffen und ihr Geburtsgewicht ist um circa 200 bis 500 g geringer als das Gewicht gesunder Neugeborener (Tiller, Killie, Husebekk, et al., 2012). In der kaukasischen Bevölkerung kommen Antikörper gegen HPA-5b als zweithäufigste Ursache der FNAIT in Betracht, allerdings werden diese Fälle häufig mit einem mildereren klinischen Verlauf beschrieben (Kaplan et al., 1991). In Japan liegen der Erkrankung am häufigsten Anti-HPA-4b-Antikörper zugrunde (Ohto et al., 2004). Außerdem spielen Anti-CD36-Antikörper innerhalb der asiatischen und afrikanischen Bevölkerung eine wichtige Rolle, die im Vergleich zu Anti-HPA-1a-Antikörpern häufiger das klinische Bild eines Hydrops fetalis verursachen (Xu et al., 2018).

Insgesamt sind derzeit über 36 unterschiedliche HPA-Antigene bekannt, die teilweise in diallelischen Systemen (z.B. HPA-1a/b, -2a/b) vorliegen (*Platelet Antigen Database | HPA | Versiti*, 2022). Die Verteilung der unterschiedlichen Allelfrequenzen ist von der Ethnie abhängig (Tan et al., 2012) (Tab. 2):

**Tabelle 2: Frequenzen menschlicher Plättchenantigene in Bezug auf die ethnische Zugehörigkeit;** Innerhalb der europäischen Bevölkerungsgruppen (Frankreich und Schweiz) dominiert das humane Plättchenantigen (HPA)-1a, -2a, -4a und -5a; in Afrika und Asien (Algerien, Korea, Indien, China) treten ebenso HPA-1a, -2a, -4a sowie -5a am häufigsten auf; das HPA-6a kommt zusätzlich gehäuft innerhalb der asiatischen Bevölkerungsgruppe (Inder, Koreaner und Han-Chinesen) vor.

<b>Anti- gen</b>	<b>Europa (Frankreich, n=6192)</b>	<b>Europa (Schweiz, n=500)</b>	<b>Afrika (Algerien, n=485)</b>	<b>Asien (Koreaner, n=200)</b>	<b>Asien (Inder, n=1164)</b>	<b>Asien (Han- Chinesen, n=1000)</b>
<b>HPA- 1a</b>	0.8480	0.8090	0.8347	0.9880	0.9244	0.9940
<b>HPA- 1b</b>	0.1520	0.1910	0.1653	0.0120	0.0756	0.0060
<b>HPA- 2a</b>	0.9200 (n=525)	0.9180	0.8347	0.9230	0.9979	0.9515
<b>HPA- 2b</b>	0.0800 (n=525)	0.1090	0.1653	0.0770	0.0021	0.0485
<b>HPA- 3a</b>	0.6200	0.5910	0.6296	0.5550	0.0100	0.5945
<b>HPA- 3b</b>	0.3800	0.4070	0.3704	0.4450	0.9900	0.4055
<b>HPA- 4a</b>	-	0.9970	1.0000	0.9900	0.9953	0.9955
<b>HPA- 4b</b>	-	0.0030	0.0000	0.0100	0.0047	0.0045
<b>HPA- 5a</b>	0.8740	0.9340	0.8431	0.9780	0.9562	0.9860
<b>HPA- 5b</b>	0.1260	0.0660	0.1569	0.0220	0.0438	0.0140
<b>HPA- 6a</b>	-	-	-	0.9800	0.9923	0.9865
<b>HPA- 6b</b>	-	-	-	0.0200	0.0077	0.0135
<b>HPA- 15a</b>	-	-	0.5300	-	-	0.5320
<b>HPA- 15b</b>	-	-	0.4700	-	-	0.4680

Im Gegensatz zur Hämolytischen Erkrankung beim Fetus und Neugeborenen (HDFN), betrifft die FNAIT, inklusive des schweren Verlaufs der ICH, in den meisten Fällen bereits die erste Schwangerschaft; die Immunisierung der Schwangeren wird durch Antigen-präsentierende Zellen, wie dendritische Zellen, die innerhalb der sekundären lymphatischen Organe das fetale HPA-1a präsentieren, initiiert; auf fetalen Thrombozyten wird das HPA-1a-Antigen bereits in der 16. Schwangerschaftswoche exprimiert (Gruel et al., 1986). Das Risiko für eine Alloimmunisierung bei einer fetomaternalen HPA-1a-Inkompatibilität sowie der klinische Schweregrad sind höher, wenn die Mutter das HLA-Klassell-Allel HLA-DRB3\*01:01 trägt (Kjeldsen-Kragh & Ahlen, 2020). Diese Ausprägung des HLA-Moleküls sorgt für eine bessere Präsentation von Peptidfragmenten des  $\beta$ 3-Integrins, die den HPA-1a-Polymorphismus tragen, an CD4<sup>+</sup>-T-Helferzellen, sodass die humorale Immunantwort insgesamt stärker ausfällt (Anani Sarab et al., 2009). Die Abwesenheit von HLA-DRB3\*01:01 kann als protektiver Faktor für schwere klinische Verlaufsformen angesehen werden (Wienzek-Lischka et al., 2017). Die mütterlichen Anti-HPA-1a-Alloantikörper sind Antikörper vom Typ IgG und können somit durch die Plazenta transportiert werden; das Fc-Fragment geht mit dem neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) innerhalb des Endosomes bei niedrigen, sauren pH-Werten eine Bindung ein und wandert durch die Synzytiotrophoblast-Zellen der Plazenta, sodass die Antikörper nach pH-Wert-Erhöhung im fetalen Blutkreislauf freigesetzt und auf das Kind übertragen werden können (Abb. 3) (Roopenian & Akilesh, 2007).



Created in BioRender.com 

Abbildung 3: **Diaplazentare Übertragung der Immunglobuline G**; (1) Die mütterlichen Immunglobuline G (IgGs) werden in die Endosomen der Syncytiotrophoblast-Zellen aufgenommen, (2) und gehen mit den endosomal lokalisierten Fc-Rezeptoren durch das saure Milieu eine Bindung ein; (3) sie überqueren die Plazentaschranke und werden in das fetale Blut freigesetzt (Roopenian & Akilesh, 2007). Abbildung modifiziert nach Curtis, 2015; erstellt mittels BioRender.com

Da das  $\alpha\beta3$  Integrin (CD51/61) mit dem HPA-1a Antigen auf der Oberfläche von Syncytiotrophoblast-Zellen nachgewiesen wurde, wird der Kontakt des mütterlichen Blutes mit diesen Zellen als möglicher Weg der maternalen Alloimmunisierung angesehen (Kumpel et al., 2008). Weitere theoretische Ansätze der Immunisierung gegen HPA-1a basieren auf von Syncytiotrophoblast-Zellen übertragene Mikropartikel ins mütterliche Blut, auf Bluttransfusionen, unerkannte Schwangerschaften sowie Fehlgeburten (Kumpel et al., 2008). In einem Mausmodell wurde beschrieben, dass maternale Anti- $\beta3$ -Iso-Antikörper an die fetale Plazenta binden; die Antikörper besitzen die Fähigkeit mit ihrem Fc-Fragment den Fc $\gamma$ Rezeptor-IIIa (Fc $\gamma$ R-IIIa) der Natürlichen Killerzellen zu binden, die zum einen für eine *Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität* mit folgender Zellapoptose sorgen und zum anderen eine intrauterine Wachstumsretardierung und einen Abort verursachen können (Yougbaré et al., 2017).

### 1.1.3 Symptome

Klinisch manifestiert sich die FNAIT durch Petechien und Hämatome sowie durch Meläna, Hämoptysen, Hämaturie und retinale Blutungen, da Plättchen-spezifische Antikörper für den Untergang von Thrombozyten sorgen (Mueller-Eckhardt et al., 1989). Die komplexspezifischen Anti- $\alpha\beta$ 3-Antikörper spielen eine Rolle im Rahmen fetaler Hirnblutungen (ICH), von denen die meisten bereits vor der 28. SSW auftreten und das erste Kind betreffen (Santoso et al., 2016). Sie können in parenchymatöse, peri- und intraventrikuläre oder gemischte, nicht klassifizierbare Blutungen eingeteilt werden (Tiller et al., 2013). Komplikationen der Blutungen sind Entwicklungsstörungen, kortikale Blindheit sowie Paresen bis hin zur Plegie (Bonacossa & Jocelyn, 1996).

### 1.1.4 Diagnostik

Die Möglichkeiten zur Diagnosesicherung der FNAIT basieren im Wesentlichen auf einem serologischen Antikörper-Nachweis, dem MAIPA (Monoclonal Antibody-specific Immobilization of Platelet Antigen), sowie auf einer molekulargenetischen HPA-Genotypisierung der Mutter, des Vaters und des Kindes (Petermann et al., 2018). Um niedrigfrequente Antikörper zu detektieren, soll ein Cross-Match zwischen väterlichen Blutplättchen und maternalem Serum erfolgen (Kroll et al., 2005). In manchen Fällen liegt der Titer der maternalen Alloantikörper nach Geburt unter der Nachweisgrenze, sodass bei klinischem Verdacht auf eine FNAIT eine Kontrolle einige Wochen postnatal empfohlen wird (Schallmoser et al., 2006). Niedrigaffine Alloantikörper, die dennoch eine schwere Klinik verursachen, sind nur durch hochsensitive Methoden, z.B. *Surface plasmon resonance*, nachweisbar, da es innerhalb des konventionellen diagnostischen Assays durch die vielen Waschschriffe zur Entfernung der Antikörper kommen kann (Socher et al., 2009).

In Bezug auf die Immunisierung während der Schwangerschaft ist die Mutter immer homozygot (HPA-1bb, Phänotypfrequenz 2%) und exprimiert das HPA-1b Antigen, während das Kind heterozygot (HPA-1ab) ist und das HPA-1a Antigen besitzt; für die Vererbung an den Fötus, muss der Vater homo- oder heterozygot (HPA-1aa oder HPA-1ab) sein, wobei bei einem heterozygoten Vater eine 50%ige, bei einem homozygoten eine 100%ige Wahrscheinlichkeit der Weitergabe an die Kinder besteht (Sachs et al., 2021a). Während der Schwangerschaft sollte bei heterozygotem Vater der fetale HPA-1a-Genotyp nicht-invasiv anhand der zellfreien DNA im mütterlichen Plasma bevorzugt durch *Next generation sequencing* bestimmt werden (Wienzek-Lischka, Bachmann, et al., 2020).

### 1.1.5 Differentialdiagnosen

Wie bei Erwachsenen sind fetale/neonatale Thrombozytopenien auf Bildungsstörungen, Verbrauch oder Verteilungsstörungen zurückzuführen und sind häufig multifaktoriell bedingt, von denen nichtimmunologische Gründe im Wesentlichen auf einer unzureichenden Megakaryopoese basieren; fetale/neonatale Thrombozytopenien treten beispielsweise bei Asphyxie oder kongenitalen Syndromen wie Trisomie 21 auf (Sachs et al., 2021b). Zudem können sie auch im Rahmen von TORCH-Infektionen oder dem Wiskott-Aldrich-Syndrom entstehen (J. Bussel, 2009). Des Weiteren sollte eine Sepsis, eine disseminierte intravasale Koagulopathie und eine Plazentainsuffizienz differentialdiagnostisch ausgeschlossen werden (Sachs, 2013). Neben der alloimmunen ist auch eine autoimmune Ätiopathogenese der fetalen/neonatalen Thrombozytopenie bei Vorliegen einer Immunthrombozytopenie der Schwangeren möglich (Nydegger, 2009).

### 1.1.6 Prophylaxe

Ni et al. konnten in einem FNAIT-Mausmodell zeigen, dass die Gabe von intravenösen Immunglobulinen (IVIg) zu einer Titerreduktion der maternalen Alloantikörper führt und den Grad der klinischen Ausprägung der FNAIT im Hinblick auf Thrombozytopenien sowie Blutungen reduziert; dieser Effekt ist auf die Hemmung des plazentaren Transports der maternalen Alloantikörper und auf die Sättigung des FcRn zurückzuführen (Ni et al., 2006). Im Rahmen der klinischen Sekundärprophylaxe wird bei hohem ICH-Risiko (ICH bei einem vorangegangenen Geschwisterkind) IVIg zwischen der 12. und 20. und bei niedrigem Risiko zwischen der 20. und 24. SSW wöchentlich bis zum Schwangerschaftsende eingesetzt (Winkelhorst, Murphy, et al., 2017). Der intravenöse Einsatz der Immunglobuline erfolgt *Off-label* und kann infolge der hohen Dosierung (1g/kg KG wöchentlich bis zur Entbindung) Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen und Fieber bis hin zur septischen Meningitis und Nierenversagen auslösen (Rossi et al., 2016; Wienzek-Lischka, Sawazki, et al., 2020). Ein zusätzlicher Nutzen durch die Gabe von Dexamethason konnte aufgrund von Nebeneffekten wie Oligohydramnion nicht nachgewiesen werden (J. B. Bussel et al., 1996). Die Gabe von IVIg zur fetalen Blutungsprophylaxe bei Schwangeren mit FNAIT in der Vorgeschichte und niedrigem Risiko (kein Geschwisterkind mit ICH in der Vorgeschichte) ist umstritten (Kjeldsen-Kragh et al., 2023).

In Untersuchungen an Mäusen konnte durch die Inhibierung des FcRn mithilfe von monoklonalen Anti-FcRn-Antikörpern oder durch die Hemmung der Aktivität Natürlicher Killerzellen mittels FcγRIIIa oder NKp46-Inhibitoren, die Rate der Fehlgeburten und das

klinische Erscheinungsbild der FNAIT verhindert werden, sodass dieser Rezeptor ein mögliches therapeutisches Ziel darstellt (C. Li et al., 2011; Yougbaré et al., 2017). Zur Prophylaxe der HDFN wird Nipocalimab (FcRn-Rezeptorblocker) erprobt und würde bei Erfolg theoretisch auch zur Prophylaxe der FNAIT in Frage kommen (Sachs et al., 2021b). Ein Nachteil dieser Therapieform besteht in der möglichen Unterbindung des Transports weiterer Antikörper, die im Rahmen der Leihimmunität von der Mutter übertragen werden, was zu einem generell erhöhten Infektionsrisiko des Kindes beitragen könnte; der iatrogen induzierte neonatale Immunglobulin-Mangel könnte jedoch gegebenenfalls durch IVIG ausgeglichen werden (Curtis, 2015). Weitere mögliche zukünftige, bisher noch nicht klinisch geprüfte Therapieprinzipien beruhen auf dem Einsatz von rekombinant hergestellten Anti-HPA-1a-Antikörpern wie B2G1 $\Delta$ nab mit hoher Bindungsaffinität zum  $\beta$ 3-Integrin, welche die maternalen Alloantikörper verdrängen und ihre biologische Wirkung verhindern könnten (Ghevaert et al., 2013). Da die mütterlichen Anti-HPA-1a-Antikörper polyklonal sind und sich gegen verschiedene Epitope des HPA-1a-Antigens richten, könnte sich eine Mischung aus unterschiedlichen HPA-1a-spezifischen monoklonalen Antikörpern als fetale Blutungsprophylaxe eignen (Zhi et al., 2018). Zu prüfen ist einerseits, ob der Einsatz blockierender Antikörper zur Verdrängung maternaler Antikörper, die Funktion der fetalen  $\alpha$ v $\beta$ 3- und  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Integrine hemmt; andererseits ist zu untersuchen, ob Nebenwirkungen beim Fetus hervorgerufen werden. Tiller et al. konnten mithilfe von murinen Experimenten zeigen, dass die Immunisierung gegen HPA-1a durch den Einsatz hyperimmuner Anti-HPA-1a-Antikörper diverser schwangerer Frauen im Rahmen einer *Antikörpervermittelten Immunsuppression* verhindert werden kann (Tiller, Killie, Chen, et al., 2012).

### 1.1.7 Therapie

Die postnatale Therapie der Wahl ist eine Transfusion von HPA-1a-, -5b-negativen Thrombozyten bei einer Plättchenanzahl von  $< 30.000/\mu$ l (Bundesärztekammer auf Empfehlung ihres Wissenschaftlichen Beirats, 2021). In dringenden Fällen wie einer akuten Blutung kann neben der kompatiblen Plättchentransfusion, ein Einsatz von nicht-kompatiblen Plättchen erfolgen (Kiefel et al., 2006). Postnatal werden beim Kind eine Überwachung der Thrombozytenzahl und Kontrollsonografien des Gehirns im Hinblick auf intrakranielle Blutungen empfohlen (Winkelhorst, Oepkes, et al., 2017).

### 1.1.8 Prognose und Screening

Bei einer neonatalen Thrombozytopenie infolge einer FNAIT in der ersten Schwangerschaft (SS) tritt häufig auch eine Thrombozytopenie in der darauffolgenden auf, weshalb im Falle eines heterozygoten Vaters (HPA-1ab) der Fötus in der Sekundärgravidität frühzeitig auf die Antigenpositivität hin untersucht werden sollte (Sachs et al., 2021b). Es besteht ein hohes Risiko, dass das Kind an einer ICH leidet, wenn diese bei einem Geschwisterkind in der vorherigen SS bereits auftrat und ein noch höheres Risiko, wenn das Geschwisterkind die ICH vor der 28. SSW entwickelt hat (Sachs, 2013). Ungefähr 35% der Kinder mit ICH versterben prä-, peri- oder postnatal und von den Überlebenden leiden wiederum ungefähr 50 % der Kinder lebenslanglich an neurologischen Folgeschäden (Tiller et al., 2013). Viele Fälle bleiben durch das fehlende Screening im Zuge der Mutterschaftsvorsorge unentdeckt, sodass wiederum das Auftreten eines intrauterinen Fruchttodes nicht immer auf die eigentlich vorhandene fetomaternale HPA-Inkompatibilität zurückgeführt wird und deswegen Screeningmaßnahmen eingeführt werden sollten (Davoren et al., 2002). Screening- und Interventionsprogramme würden insgesamt zu einer Steigerung der Jahre mit hoher Lebensqualität führen und Gesundheitskosten von 2.2 Millionen Euro pro 100.000 Schwangere im Hinblick auf den Wegfall lebenslänglicher neuropädiatrischer Therapien einsparen (Kjeldsen-Kragh et al., 2007). International ist derzeit kein Screening-Programm zur Erkennung einer FNAIT im Rahmen der Mutterschaftsvorsorge etabliert. Nur in deutlich weniger als 10 % treten fetale/neonatale Blutungen auf (siehe oben); daher gilt die Erkennung Anti-HPA-1a-immunisierter Schwangere mit einem hohen fetalen Blutungsrisiko als Voraussetzung für die Einführung eines Screeningprogramms. Die diagnostische Differenzierung der vorhandenen Anti-HPA-1a-Antikörper Subtypen im polyklonalen maternalen Serum könnte Hinweise auf das fetale Blutungsrisiko geben und bildet Gegenstand aktueller Forschung (Zhi et al., 2018).

## 1.2 Angiogenese

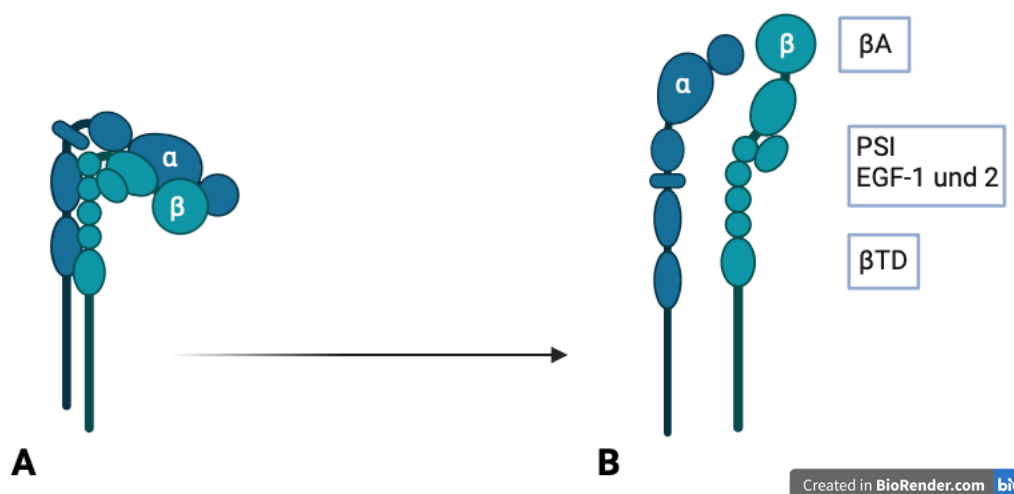
Die Bildung des Gefäßsystems liegt primär der Vaskulogenese und sekundär der Angiogenese zugrunde; die Vaskulogenese erfolgt embryonal durch die Differenzierung von aus dem Mesoderm stammenden Hämangioblasten zu Endothelzellen, die wiederum Blutgefäße bilden; in Abgrenzung dazu baut die Angiogenese auf die Vaskulogenese auf, da es den Prozess der Netzbildung aus bereits bestehenden Gefäßen beschreibt; dabei können zwei Arten differenziert werden: zum einen die Sprossung von Gefäßen (*sprouting angiogenesis*), was vor allem im embryonalen Gehirn vorkommt, und zum anderen die intraluminale Invagination, was häufig im

Lungengewebe auftritt (Risau, 1997). Die Angiogenese ist essentiell für die Embryogenese, Wundheilung, Tumorgenese, Gefäßerkrankungen des Auges sowie inflammatorische Prozesse wie rheumatische Erkrankungen (Brooks et al., 1994).

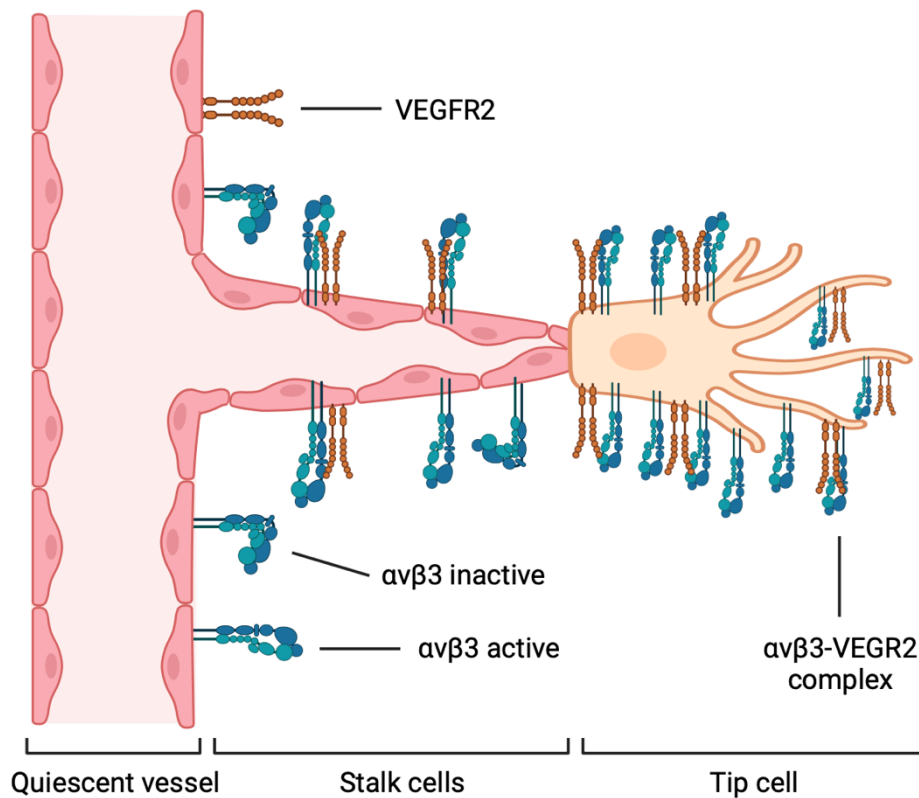
### 1.3 $\alpha\beta3$ Integrin

Das  $\alpha\beta3$ -Integrin weist ein breites Expressionsspektrum auf und kommt unter anderem auf glatten Muskelzellen, Thrombozyten, Leukozyten und Endothelzellen vor (Felding-Habermann & Cheresch, 1993). Als Reaktion auf angiogenetische Stimuli hin wird das  $\alpha\beta3$ -Integrin hochreguliert, da es das Überleben und die Migration der Endothelzellen während der Gefäßbildung moduliert (Brooks et al., 1994). Es ist zum RGD-Peptid, welches aus der Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure besteht, bindungsaffin; dadurch kann es mit verschiedenen Proteinen der Extrazellulärmatrix wie Vitro- oder Fibronektin, die diese Aminosäuresequenz aufweisen, eine Bindung eingehen (Felding-Habermann & Cheresch, 1993). Bei Ligandenbindung wird die Outside-In Signal-Kaskade ausgelöst; es kommt zur Aktivierung der Integrine durch Konformationsänderung (Mehrbood et al., 2013) (Abb. 4).

Abbildung 4: **Schematische Darstellung der  $\alpha\beta3$  Integrinstreckung**; (A) Inaktive Form des  $\alpha\beta3$ -Integrins. (B) Aktive Form des  $\alpha\beta3$ -Integrins. Die PSI (Plexin-Semaphorin-Domäne) sowie die EGF-1 und -2 (epidermal growth factor) Domäne der  $\beta3$  Einheit bilden ein Streckzentrum des  $\alpha11\beta3$  sowie  $\alpha\beta3$  Integrins (Zhu et al., 2008). Die Bindung des RGD-Peptids erfolgt zwischen der  $\beta$ TD-Einheit und dem  $\beta$ A-Propeller des  $\beta3$  Integrins, sodass die Domänen sich trennen, das Integrin sich aufklappen und in den gestreckten, aktiven Zustand übergehen kann (Mehrbood et al., 2013). Abbildung modifiziert nach Bennett et al., 2009; erstellt mittels BioRender.com



Brooks et al. haben die Chorioallantoismembran (CAM) von Küken-Embryonen verwendet, um den Einfluss von  $\alpha\beta 3$  im Rahmen der Blutgefäßbildung zu untersuchen; sie haben feststellen können, dass die mit LM609 (Anti- $\alpha\beta 3$ -Antikörper) behandelte CAM eine Inhibition der Angiogenese und eine höhere Zellapoptose im Vergleich zu der mit PBS (Phosphate Buffered Saline) oder P3G2 (Anti- $\alpha\beta 5$ -Antikörper) behandelte CAM aufweist (Brooks et al., 1994). LM609 richtet sich gegen den  $\alpha\beta 3$ -Komplex und beeinträchtigt seine Bindung an Vitronektin, Fibrinogen und an den von-Willebrandt-Faktor (vWF), sodass dadurch der Prozess der Angiogenese und Zellmigration gehemmt wird (Brooks et al., 1995). Drake et al. konnten zeigen, dass das Zielantigen  $\alpha\beta 3$  besonders im Rahmen der embryonalen Neovaskularisation zugänglich ist, da es vor allem auf aktivierten Endothelzellen stark exprimiert wird (Abb. 5) (Drake et al., 1995). Auch bezüglich der Pathogenese der neuentstehenden Gefäßversorgung eines Tumors spielt das  $\alpha\beta 3$ -Integrin eine wesentliche Rolle; durch den Einsatz von anti-angiogenetisch wirkenden RGD-Antagonisten wie SC-68448 (Carron et al., 1998) oder DisBa-01 (Danilucci et al., 2019) konnte die Tumorneovaskularisation experimentell verhindert werden. Von einem Einfluss der  $\alpha\beta 3$ -Inhibitoren auf bereits entwickelte Gefäße wird eher nicht ausgegangen (Drake et al., 1995).

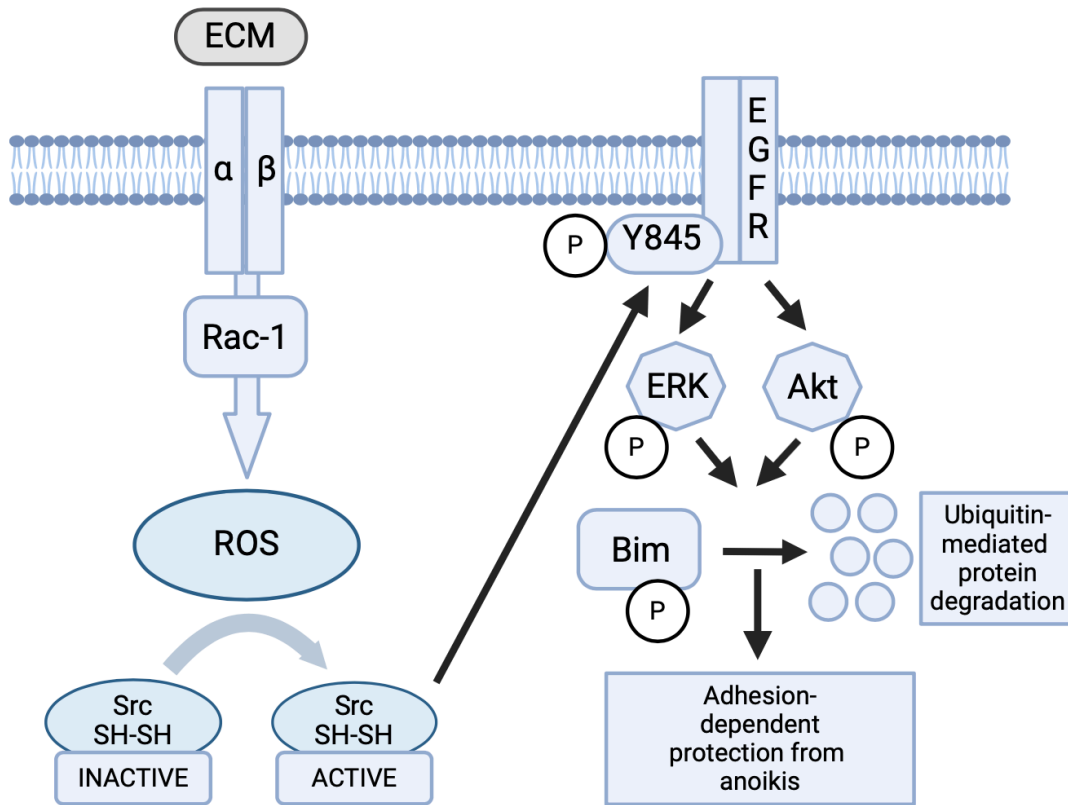


Created in BioRender.com 

Abbildung 5: **Schematische Darstellung des  $\alpha\beta_3$ -Integrins während der Angiogenese**; In ruhenden Gefäßen ist die  $\alpha\beta_3$ -Integrin Expression auf Endothelzellen niedrig, während sie auf Zellen der Gefäßneubildung ansteigt (Drake et al., 1995). Die *tip cells* sitzen an der Spitze der Gefäßverzweigungen, besitzen viele Filopodien und sind für die Migration verantwortlich, die *stalk cells* folgen den *tip cells* und sorgen durch Proliferation unter anderem für die Formation des Lumens (Gerhardt et al., 2003). Die Phosphorylierung von VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2) ist hochreguliert, wenn  $\alpha\beta_3$  durch Liganden wie Vitronektin gebunden wird oder VEGF (vascular endothelial growth factor) mit dem VEGFR2 reagiert; der Cross-talk zwischen  $\alpha\beta_3$  und VEGFR2 stellt eine wesentliche Funktion im Prozess der Gefäßneubildung dar (Mahabeleshwar et al., 2007). Abbildung modifiziert nach Hodivala-Dilke et al. 2008; erstellt mittels BioRender.com

## 1.4 Anoikis

Anoikis beschreibt den programmierten Zelltod (Apoptose), der durch den Adhäsionsverlust von Integrinen oder E-Cadherinen zur Extrazellulärmatrix induziert wird; sobald die Ligation an  $\alpha\beta_3$  verhindert wird, gehen die Endothelzellen zugrunde und die vaskuläre Netzwerkbildung wird inhibiert (Strömblad & Cheresch, 1996) (Abb. 6).



Created in BioRender.com bio

Abbildung 6: **Schematische Darstellung des Schutzes vor Anoikis durch Integrinligation**; Die Bindung eines Liganden führt zur Aktivierung der Rac-1 GTPase, welche wiederum unter anderem die mitochondriale oder die durch Arachidonat-5-Lipoxygenase (5-LOX) gebildete zytoplasmatische Produktion von ROS (Reaktive Sauerstoffspezies) auslöst (Chiarugi et al., 2003). ROS erfüllen zum einen Funktionen der Zellorganisation und -ausbreitung durch die entsprechende Anordnung zytoskelettaler Aktin-Filamente; zum anderen dienen sie als *second messenger* für die Phosphorylierung der Src Tyrosinkinasen Fyn und Yes durch Interaktion mit Caveolin (Gilmore, 2005). Die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) EGFR und VEGFR werden durch Phosphorylierung an Tyrosin 845 stimuliert, was zur Aktivierung der Signalwege ERK (*extracellular-signal regulated kinases*) und PI3K/Akt (*Phosphoinositid-3-Kinase/Akt*) führt; letztlich kommt es zur Inaktivierung der pro-apoptotischen Proteine, sodass die Anoikis verhindert wird (Giannoni et al., 2008). Im Falle der Zellapoptose bei Ligandenungebundenen Integrinen, setzt sich das pro-apoptotische Bim aus dem Zytoskelett frei (Reginato et al., 2003) und sorgt für eine Neutralisation des anti-apoptotischen Bcl-XL (ein Bcl-2 Protein) mit folgender Aussendung eines pro-apoptotischen Signals für die Cytochrom C-Ausschüttung sowie Caspasenaktivierung (Cheng et al., 2001). Abbildung modifiziert nach Giannoni et al., 2008; erstellt mittels BioRender.com

## 1.5 Die Rolle der Angiogenese, des $\alpha\beta 3$ Integrins und der Anoikis im Rahmen der FNAIT

Santoso et al. haben im Rahmen der FNAIT spezifisch für den Anti-HPA-1a-Antikörper vom  $\alpha\beta 3$ -Subtyp eine hemmende Wirkung auf die Zelladhäsion und Angiogenese nachweisen können und damit die Störung der Gefäßneubildung als wichtigen Verursacher der fetalen ICH bezeichnet (Santoso et al., 2016). Die Beobachtung einer rapiden, schauerartigen Gefäßbildung (*shower-like vessels*) zwischen der 19. und 24. SSW im embryonalen Gehirn (Pooh & Kurjak, 2010), könnte das Auftreten der ICH besonders während des 2. Trimenons erklären (Santoso et al., 2016). Das Serum der Patientinnen, deren Kinder von einer ICH betroffen waren, wiesen signifikant höhere Mengen des endothelspezifischen Anti-HPA-1a-Antikörpers mit Spezifität zum  $\alpha\beta 3$ -Komplex auf und führten zu einer signifikanten Hemmung der *in vitro* Angiogenese (Santoso et al., 2016). Die Studie von Yougbaré et al. beinhaltet ebenso die Annahme, dass die Thrombozytopenie allein nicht dem Pathomechanismus der ICH zugrunde liegen kann; durch die Seren isoimmunisierter Integrin- $\beta 3$  Knockout-Mäuse haben diese Autoren feststellen können, dass Antikörper gegen das  $\beta 3$ -Integrin Verursacher der endothelialen Dysfunktion *in vivo* mit abgeschwächter Gefäßneubildung sowie verringerter retinaler Gefäßdichte sind (Yougbaré et al., 2015). Auch Van Gils et al. konnten eine reduzierte Adhäsionsfähigkeit sowie Ausbreitung der Endothelzellen *in vitro* durch einen monoklonalen Anti- $\beta 3$ -Antikörper nachweisen; die Behandlung mit Anti-HPA-1a-Antikörpern mütterlicher Seren führte ebenso zu einer Verringerung der Ausbreitungsfähigkeit der Zellen und Beeinträchtigung der Zell-Zell-Kontakte (van Gils et al., 2009).

## 2 Ziel der Dissertation und Hypothese

Die Immunisierung einer Schwangeren gegen das fetale HPA-1a-Antigen führt in weniger als 10 % der Fälle zu einer fetalen/neonatalen intrakraniellen Blutung (ICH) mit ggf. desaströsen Folgen. Die Bestimmung des fetalen Blutungsrisikos im Rahmen der Sekundärprophylaxe bei Schwangeren mit FNAIT in der Vorgeschichte oder im Rahmen eines Screenings in der Mutterschaftsvorsorge ist bislang nicht möglich. Bisher angewendete Algorithmen, die regelmäßige Ultraschalluntersuchungen einschließen, führen lediglich zum Nachweis bereits aufgetretener ICH (Sachs et al., 2021b). Da die fetale ICH infolge einer mütterlichen Immunisierung gegen HPA-1a durch eine Prophylaxe mit IVIG während der Schwangerschaft sehr zuverlässig verhindert werden kann, ist ein prädiktiver Assay notwendig, mit dem das Risiko einer fetalen ICH abgeschätzt werden kann. In dieser Arbeit soll geprüft werden, ob die Hemmung der *in vitro* Angiogenese durch Anti-HPA-1a-Antikörper ein geeignetes Untersuchungsverfahren wäre, um das Risiko der fetalen ICH einschätzen zu können. Im Zuge der vorliegenden Arbeit wird zunächst der *Tube Formation Assay*, ein *in vitro* Modell der endothelialen Gefäßneubildung, etabliert. Mit diesem Assay sollen folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Eignet sich der Einsatz von einzelnen oder gepoolten *human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs) besser für die Untersuchungen im Tube Formation Assay? Welcher Zeitpunkt sollte im Assay untersucht werden?
- Welchen Einfluss haben monoklonale Anti- $\alpha\beta 3$ - und Anti- $\beta 3$ -Antikörper auf die *in vitro* Angiogenese? Ist die Auswirkung von Anti- $\alpha\beta 3$ - oder Anti- $\beta 3$ -Antikörpern bei der endothelialen Gefäßneubildung von Relevanz?
- Sind die anti-angiogenetischen Mechanismen Fc $\gamma$ -Rezeptor-abhängig?
- Kann der Prozess der Angiogenese-Hemmung durch inflammatorische Trigger (Lipopolysaccharide (LPS), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )) beeinflusst werden?
- Führen humane FNAIT Seren und Absorbate zur Hemmung der *Tube formation* in dem gewählten Testsystem?

Die Untersuchungen sollen ein genaueres Verständnis über den Einfluss endothelspezifischer Antikörper auf die *in vitro* Angiogenese und ggf. auf den Pathomechanismus der ICH im Rahmen der FNAIT liefern sowie den potenziellen Einsatz des Tube Formation Assays als prädiktiven Test für FNAIT-Fälle mit ICH validieren.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Antikörper

Antikörper	Firma	Katalognummer	Lotnummer	Klon
Anti-Integrin $\alpha$ v	Santa Cruz Biotechnology	sc-9969	C1417	P2W7
Anti-Integrin $\alpha$ $\beta$ 3	BioLegend	304402	B240612	23C6
Anti-Integrin $\alpha$ $\beta$ 3	Merck KGaA	MAB1976	3670775	LM609
Anti-Integrin $\beta$ 3	Beckman Coulter	IM0540	200042	SZ21
Anti-Integrin $\beta$ 3	Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Gießen, Deutschland	-	-	AP3
Anti-Integrin $\beta$ 3 HPA-1a Typ 2	Dr. Bjørn Skogen, Dr. Tor B Stuge (Department of Medical Biology, University of Tromsø, Norway)	-	-	B2G1
Anti-Integrin $\beta$ 3 HPA-1a Typ 2	Dr. Celdric Ghevaert, Dr. Winnie Lau (NHS Blood and Transplant, Cambridge, UK)	-	-	B2G1 delta nab
Anti-CD31 (PECAM-1)	Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Gießen, Deutschland	-	-	Gi18
Anti-human HLA I Isotyp Maus IgG2a	BioLegend	311402	B32529	W6/32
Anti-Fc $\gamma$ RI	BioLegend	305002	B288965	10.1
Anti-Fc $\gamma$ RII	Merck KGaA	MABF925	3449583	AT10
Anti-Fc $\gamma$ RIIIa	Stemcell	60012	1000035115	IV.3
Anti-Fc $\gamma$ RIIIb	Invitrogen	MA1-10112	535436	3G8
Maus-IgG1	Ancell	278-810	264002	MOPC31C
Maus-IgG2a	Ancell	281-810	212902	RPC5
Maus-IgG2b	Ancell	284-810	263101	BPC4
Anti-human IgG	Merck KGaA	I4506	SLBR0560V	-
Anti-human IgG	Dako	F0315	20080845	Polyclonal, FITC

Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG (H+L)	Invitrogen Thermo Fisher Scientific	A21202	2229195	Polyclonal, FITC
Affini Pure Goat anti-mouse IgG	Immuno Reseranch	115-005-071	132560	Polyclonal
Peroxidase markierter Ziege Anti-Human-IgG	Immuno Reseranch	109-035-098	78005	Polyclonal

Tabelle 3: **Antikörper**; Quelle: eigene Darstellung

### 3.2 Geräte und Materialien

Gerät/Material	Firma	Modell
Präzisionswaage	PCE-Instruments	Typ AB100C 2016 Nr. 4005777
pH Meter	Mettler Toledo	Five Easy Nr. 30266626-250ML
Filtrationssystem	Sarstedt	Nr. 83.3940.101
Mulltupfer	Fuhrmann	Nr. 107633
Skalpell	Feather Disposable	No. 24, Nr. 02.001.30.024
Kabelbinder	TY-IST	UB100 A-B, Nr. 138-00000
Drei-Wege-Hahn	Discofix	Nr. 16494C
Brutschrank	Kendro Laboratory Products	HeraCell 240 Heraeus, Nr. 2007573
Blue Cap	Bellco	Nr. SKU: 2304- 21B00
T75-Zellkulturflasche	Sarstedt	83.3911.302
Zentrifuge	Hettich	Rotina 380 R, Herstellungsjahr 2012, Nr. 0001322- 01-00
Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific	Heraeus Pico 17, Herstellungsjahr 2020, Nr. 4007316
Sterilbank	Thermo-Science	Safe 2020
Lichtmikroskop	Leica	DMIL LED
Lichtmikroskop	Leica	DMi8 Thunder Imager Live-cell Mikroskop
Cryoröhrchen	Sarstedt	CryoPure Tube 1.6 ml, Nr. 72.380.004

Wasserbad	Memmert	WNB10
96-Well-Platte	Sarstedt	Nr. 83.3924
Direktverdränger-Pipette	Gilson Pipetman	MICROMANTM M250E
Pipettenspitzen	Capillary Pistons	Nr. F148714
Zählkammer	Labor Optik	Nr. MEG621008
12-Well-Platte	Greiner Bio-one	Nr. 665180
Vortexer	Phoenix Instrument	Nr. RS-VA10
Eppendorfer Gefäße	Sarstedt	72.706.600
Vakuumpumpe	Integra	Vacusaft 1583XX
Heizblock	StarLab	Mixer HC Nr. 4007329
Elektrophoresekammer	Sigma Aldrich	800 Series E833 Nr. Z337501
Mirkotiterplatte	Greiner	655061
MagStrep „type 3“XT bead	iba	Nr. 2-4090-002
Magnetischer Separator	iba	Nr. 2-1602-000

Tabelle 4: **Geräte/Materialien**; Quelle: eigene Darstellung.

### 3.3 Chemikalien

Chemikalie	Firma	Nummer
NaCl	Sigma Aldrich	31434-1KG-R
KCL	Supelco	60138-250ML
HEPES	Roth	6763.1
Glucose	Millipore	1083370250
CaCl <sub>2</sub>	Supelco	1023780500
MaCl <sub>2</sub>	Merck Schuchardt	8147330100
Kollagenase Typ 2	Pan Biotech	LS0004174
FBS	Pan Biotech	P40-37500
EBM-2	Lonza	CC-3156
EGM-2	Lonza	CC-4176
P/S	Gibco	15070063
Amphotericin B	Gibco	15290-026
DMEM High Glucose 10%	Capricorn Scientific	CP21-4030
PBS	anprotec	AC-BS-0002
Accutase®-Lösung	Sigma-Aldrich	A6964-100ML
Dimethylsulfoxid	Roth	4720.4
Cultrex® Reduced Growth Factor Basement Membran Matrix Type R1	Trevigen	3433-005-01
Zygosporium masonii	Sigma	C8273
LPS	Sigma	L2654-1MG
TNF-α	ImmunoTools	11343015
Bovines Serum Albumin 22%	Ortho-Clinical Diagnostics	601301451

10X GlycoBuffer 1	New England Biolabs	B1727S
Endo S	New England	P0741S
Rotiphorese Gel 30	Roth	3029.1
Temed	AppliChem	A1148.0025
MEM NEAA 100X	Gibco	11140-035
Alpha MEM	Pan Biotech	P04-21350
Geneticin™ (G418-Sulfat)	Genaxxon bioscience	M3118.0050
Zeocin	InvivoGen	ant-zn
AB Serum	Pan Biotech	P30-2901
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck	6392.0500
NaHCO <sub>3</sub>	Merck	1.06329.1000
Natriumazid	Merck	1066880100
Tris	Roth	48552
Tween	Sigma	P5927
Orthophenyldiamin Tabletten	Sigma	P8787-50TAB
Wasserstoffperoxid	Merck	1.07209.025
Schwefelsäure	Merck	100713
Strep-tag® washing buffer	iba	2-1003-100
Essigsäure	Riedel-de-Haen	33206
HCl	Merck	109057

Tabelle 5: **Chemikalien**; Quelle: eigene Darstellung.

### 3.4 HUVEC Isolation

Zunächst erfolgte die Herstellung der benötigten Reagenzien:

- 11x konzentrierte Hanks balanced salt solution (HBSS-Lösung) (44 g NaCl (Molekulargewicht MG 58,44), 1,65 g Kaliumchlorid (MG 74,55), 13,1 g N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES) (MG 238,3), 11 g Glucose (MW 180,16), 450 ml destilliert (dest.) Wasser; pH-Wert = 7,58)
- 1x konz. HBSS-Lösung (500 ml dest. Wasser, 50 ml 11x konz. HBSS)
- HBSS +/- (500 ml dest. Wasser, 50 ml 11x konz. HBSS, 5,6 ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung, 5,6 ml MaCl<sub>2</sub>-Lösung)
- Kollagenase (12,5 g Kollagenase-Typ 2, 50 ml HBSS +/-)

Für die Isolation von HUVECs aus der Umbilikalvene schwangerer Frauen wurde das Patientenrestmaterial aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe am Universitätsklinikum Gießen/Marburg verwendet (Ethik-Votum 132/9). Die circa 10-15 cm langen Nabelschnurproben wurden nach der Geburt im Kühlschrank aufbewahrt und innerhalb von 24 Stunden erfolgte die Zellisolation. Dafür wurde die Nabelschnur zunächst mit einem Mulltupfer abgewischt und auf mögliche Punktionslöcher hin untersucht. Anschließend wurden beide Enden der Probe mit einem Skalpell entfernt,

sodass eine Knopfkanüle in die Umbilikalvene (Abb. 7) eingeführt und mit einem Kabelbinder fixiert werden konnte.

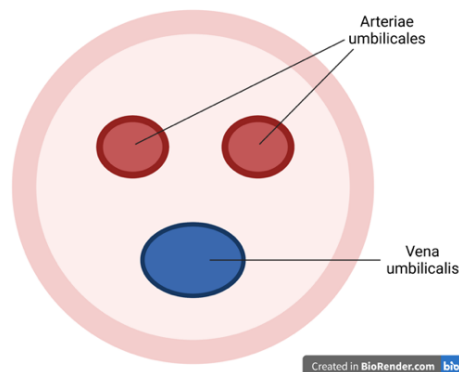


Abbildung 7: **Schematischer Aufbau einer Nabelschnur**; Die menschliche Nabelschnur weist in der Regel zwei Umbilikalarterien und eine Umbilikalvene auf. Makroskopisch kann die Vene von den Arterien durch eine höhere Elastizität und einem größeren Lumen unterschieden werden. Erstellt mittels BioRender.com

Das andere Ende der Nabelschnurprobe konnte dann in eine Abfallflasche platziert werden. Eine Spritze wurde an die Knopfkanüle angesetzt, sodass die Probe zweimal mit 50 ml 1x konz. HBSS-Lösung durchgespült werden konnte. Anschließend wurde das Ende der Nabelschnur mit einer sterilen OP-Klemme verschlossen. Eine Spritze mit 50 ml Kollagenase-Lösung wurde über einen Drei-Wege-Hahn an die Knopfkanüle gedreht und es erfolgte eine Injektion der Lösung bis zu einer prallen Befüllung der Nabelschnur. Der Rest der Kollagenase-Lösung konnte für eine Woche bei 4 °C aufgehoben und dann wiederverwendet werden. Die Nabelschnur wurde für 20 min im Brutschrank inkubiert. Währenddessen erfolgte eine Zugabe von 1 ml fetales bovines Serum (FBS) in ein 50 ml Blue Cap. Außerdem wurden 15 ml Endothelial Cell Growth Basal Medium-2 (EBM-2) mit Endothelial Cell Growth Basal Medium-2 Supplements and Growth Factors (EGM-2) Zusätzen (0.2 ml Hydrocortison, 2 ml Human Fibroblastic Growth Factor, 0.5 ml VEGF, 0.5 ml R3-IGF-1, 0.5 ml Ascorbic Acid, 0.5 ml Human Epidermal Growth Factor, 0.5 ml Heparin, 0.5 ml Gentamicin sulfate-Amphotericin), 10 % FBS, 1% P/S und 1 % Amphotericin B (Ampho. B) in einer T75-Zellkulturflasche mit Cell+ Oberfläche vorgelegt. Die Nabelschnur wurde nach der Inkubation vorsichtig bestrichen, um die Zellablösung vom restlichen Gewebe mechanisch zu unterstützen. Nach der Entfernung der Klemme konnte die Nabelschnurprobe mit 30 ml 1x konz. HBSS durchgespült werden, sodass die Flüssigkeit im 50 ml Blue Cap mit dem vorgelegtem FBS gesammelt und 10 min lang bei 1200 rpm zentrifugiert werden konnte. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet resuspendiert und die Zellen wurden in die mit Medium vorgelegte Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag

erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums, um Blutgerinnsel und nicht-adhärenente Zellen zu entfernen.

### **3.5 Zellkultur**

Die HUVECs wurden in 20 ml EBM-2 und EGM-2, 10 % FCS, 1 % P/S und 1% Ampho. B kultiviert. Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte alle zwei Tage. Bei einer Konfluenz von über 80 % wurden die Zellen zweimal mit 10 ml PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) gespült und 5 min lang bei 37 °C mit 2 ml Accutase®-Lösung inkubiert. Nachdem die vollständige Zellablösung unter dem Lichtmikroskop kontrolliert wurde, konnte die Aktivität der Accutase mithilfe von 5 ml Kulturmedium gestoppt werden. Die Zellsuspension wurde unter Verwendung einer weiteren Kulturflasche in einem Verhältnis von 1:2 aufgeteilt und mit zusätzlichem Medium kultiviert.

Zum Einfrieren erfolgte nach einer Zentrifugation (5 min, 1200 rpm) der abgelösten Zellen, eine Resuspension in 1 ml mit 60 % Kulturmedium, 30 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid. Nachdem die Zellen für mindestens vier Stunden bei - 80 °C eingefroren wurden, konnten die Proben in den Stickstofftank umgelagert werden.

Zum Auftauen wurde das Cryoröhrchen 2 min lang ins Wasserbad mit 37 °C gehalten, sodass der Inhalt direkt in eine Zellkulturflasche mit vorgewärmtem Medium überführt werden konnte.

### **3.6 Tube Formation Assay**

Der Tube Formation Assay beschreibt im Allgemeinen eine Methode der *in vitro* Angiogenese kultivierter Endothelzellen. Er kann einerseits verwendet werden, um Substanzen auf ihre pro- sowie antiangiogenetische Wirkung hin zu untersuchen und andererseits, um den Signalwegen der Angiogenese auf den Grund zu gehen (Arnaoutova et al., 2009). Zur Vorbereitung wurden eine 96-Well-Platte, eine Direktverdränger-Pipette mit den passenden Pipettenspitzen und das Basisgel Cultrex® Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix Type R1 einen Tag vorher in den Kühlraum (4 °C) gestellt. Zunächst wurde das Gel für eine homogene Durchmischung der Faktoren einige Male vorsichtig auf- und abpipettiert. Im Kühlraum erfolgte eine Zugabe von 50 µL Gel pro Well, welches anschließend mit kreisförmigen Bewegungen ebenmäßig verteilt wurde. Dabei wurde vor allem die Entstehung von Luftblasen vermieden. Die Platte wurde danach 5 min im Kühlraum stehen gelassen und anschließend erfolgte unter Zuhilfenahme des Lichtmikroskops eine Kontrolle der Gelverteilung im Hinblick auf Luftblasen sowie Unebenheiten. Es folgte eine 30-minütige Inkubation der Well-Platte im Brutschrank, sodass das Gel bei 37 °C polymerisieren

konnte. Da Primärzellen die *in vivo* Verhältnisse besser widerspiegeln als eine immortalisierte Zelllinie, wurden die Experimente mit HUVECs durchgeführt. Um der Probenspendervariabilität innerhalb der Versuche möglichst entgegenzuwirken, wurden HUVECs von 3 bis 5 Patientinnen mit niedriger Passage (P1 – 5) nach Primärkultur gepoolt. Bevor die Primärzellen im Assay verwendet wurden, erfolgte eine mind. zweimalige Passagierung der Zellen; zudem sollte eine Zell-Konfluenz von circa 80 % vorliegen (Arnautova et al., 2009). Mithilfe der Neubauer-Zählmethode konnte die Anzahl der jeweiligen Spenderzellen bestimmt werden. In die Zählkammer wurden 10  $\mu$ l der Zellsuspension gegeben, wobei die in den vier Großquadranten, jedoch nicht die auf den Grenzlinien gelegenen Zellen, miteinberechnet wurden. Zur Ermittlung der Konzentration [Zellen/ $\mu$ l] konnte die Gesamtzahl dann durch vier geteilt und mit zehn multipliziert werden. Letztlich erfolgte eine Kultivierung der Spenderzellen zu gleichen Volumenanteilen.

Für den Tube Formation Assay wurden die Zellen mit PBS gewaschen, abgelöst und für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in Medium aufgenommen und 30-mal resuspendiert, was für die spätere homogene Zellverteilung innerhalb des Wells unabdingbar war. Nach einer Konzentrationsbestimmung [Zellen/ $\mu$ l] konnte das benötigte Volumen der Zellsuspension für 15.000 Zellen pro Well berechnet werden, welches dann mit EBM-2 Medium zuzüglich EGM-2 Zusätzen sowie 2,5% FCS auf ein Gesamtvolumen von 80  $\mu$ l pro Well aufgefüllt wurde. Der Assay wurde vorab mit EGM-2 Medium ohne EGM-2 Zusätzen und FCS getestet, wodurch festgestellt werden konnte, dass sowohl die EGM-2 Zusätze einschließlich der Wachstumsfaktoren als auch FCS (mind. 2,5%) für die Entstehung der *in vitro* Angiogenese benötigt wurden. Die Festlegung der verwendeten Zellzahl (15.000 HUVECs pro Well) beruhte dabei unter anderem auf einer Anweisungsdurchführung von Ibidi (ibidi GmbH, 2019).

Die Well-Platte wurde nach der Zellaussaat für eine halbe Stunde in den Brutschrank gestellt, sodass die Zellen sich absetzen und adhärent werden konnten. In dieser Zeit wurde die Inkubationskammer des Mikroskops mit 35 ml Wasser befüllt und die STX-App von Tokai Hit gestartet, sodass die Kammertemperatur auf 37 °C und der CO<sub>2</sub>-Gehalt auf 5 % hochfahren konnte. Für die morphologische Auswertung der Tube Length im Rahmen der *in vitro* Angiogenese zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Zellen zunächst unbehandelt untersucht. Die Echtzeit-Aufnahme des Assays erfolgte mit dem Leica DMI8 Thunder Imager Live-cell Mikroskop (5x Objektiv) unter Verwendung der Software Leica Application Suite X 3.7.0.20979. Die Well-Platte wurde in die Inkubationskammer gestellt, woraufhin zunächst die Einstellung nach Köhlerscher Beleuchtung erfolgte: Die Zellen wurden fokussiert, die Leuchtfeldblende vollständig

geschlossen und der Kondensator so in seiner Höhe verstellt, dass das Bild der Leuchtfeldblende scharf erschien. Anschließend wurde die Blende wieder so weit geöffnet, dass sie aus dem Gesichtsfeld verschwand. Das Mikroskopier-Bild konnte über den Live-Modus auf dem Computer kalibriert werden. Durch die Einstellung der Belichtungszeit sowie der Lichtintensität konnte der Bildkontrast für jeden Versuch optimal eingestellt werden. In jedem Well wurden sowohl ein Fokus- als auch Aufnahmepunkt mittig positioniert, um einen einheitlichen Bereich der Bildaufnahme zu bestimmen. Außerdem wurde die Dicke ( $\mu\text{m}$ ), Anzahl der horizontalen Schichtenaufnahme (Z-Ebenen) und die Aufnahmedauer definiert. Da das 10x Objektiv nur einen kleinen Bereich des Wells darstellte (Abb. 8) und die Bildaufnahmen somit nur einen sehr geringen Informationsgehalt über den Angiogenese-Prozess im Well widerspiegelten, wurde für die Versuchsreihen das 5x Objektiv verwendet (Abb. 9).

Magnifikation	Name	Numerische Apertur	Kontrastmethode	Arbeitsentfernung	Artikel Nr.
5x	N PLAN	0.12	PH0	14000	11506303
10x	HC PL FLUOTAR L	0.32	PH1	11130	11506522

Tabelle 6: Informationen zum 5x und 10x Objektiv

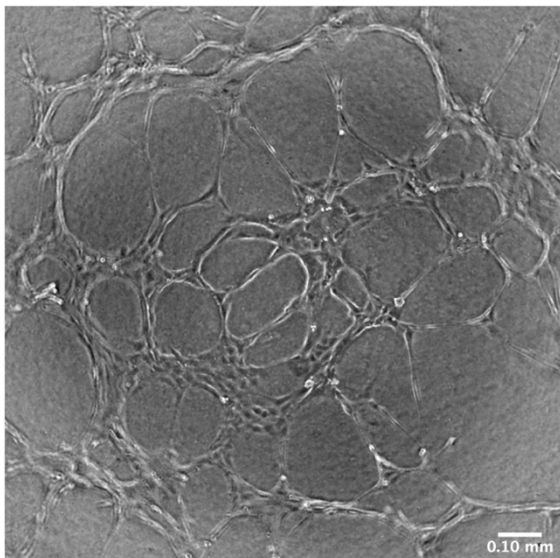


Abbildung 8: **Mikroskopische Aufnahme mit 10x Objektiv**; Die *in vitro* Angiogenese der HUVECs wurde mithilfe des 10x Objektivs aufgenommen.

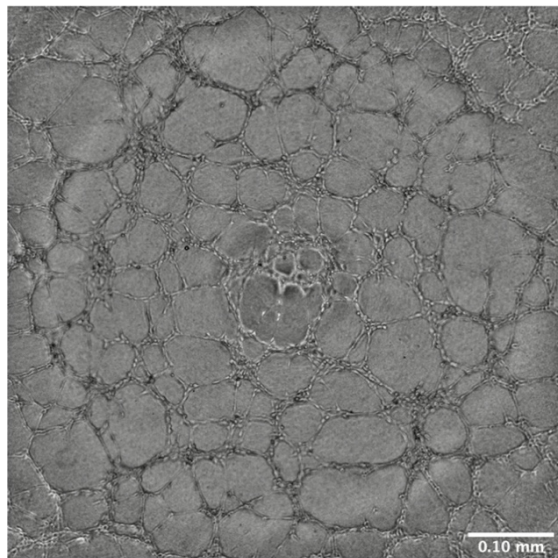


Abbildung 9: **Mikroskopische Aufnahme mit 5x Objektiv**; Die Angiogenese der HUVECs wurde mithilfe des 5x Objektivs dargestellt. Im Vergleich zum 10x Objektiv ist ein wesentlich größerer Bereich des Angiogenese-Netztes abgebildet.

Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte anhand von morphologischen Parametern (Tab. 7) mithilfe der Bildanalyse-Software WimTube (WimTube, Cordoba, Spanien,

Wimasis: Tube Formation Assay Image Analysis Solution, Release 4.0). Die Statistik wurde nicht-parametrisch mit dem Kruskal-Wallis-Test (Signifikanzniveau  $p < 0,05$ ) von GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, USA) ermittelt.

Tabelle 7: **Erklärung der morphologischen Parameter bei Wimasis.** Quelle: WimTube\_Analysis\_Results\_In\_Detail.pdf

Morphologische Parameter	Bedeutung
Tube-Length [px]	Tubenlänge = die Gesamtlänge der tubenförmigen Röhrenstrukturen in Pixeln (Abb. 10)
Branching-Points	Verzweigungspunkte, an denen mehrere röhrenförmige Strukturen zusammenlaufen (Abb. 10)
Total-Loops	Anzahl der Schleifen, wobei diese durch Bereiche des Bildhintergrundes definiert sind, die von einer röhrenförmigen Struktur umgeben werden (Abb. 10)
Total-Tubes	Anzahl der Strecken zwischen zwei Branching-Points oder einem Branching-Point und einer losen Endstrecke (Abb. 10)

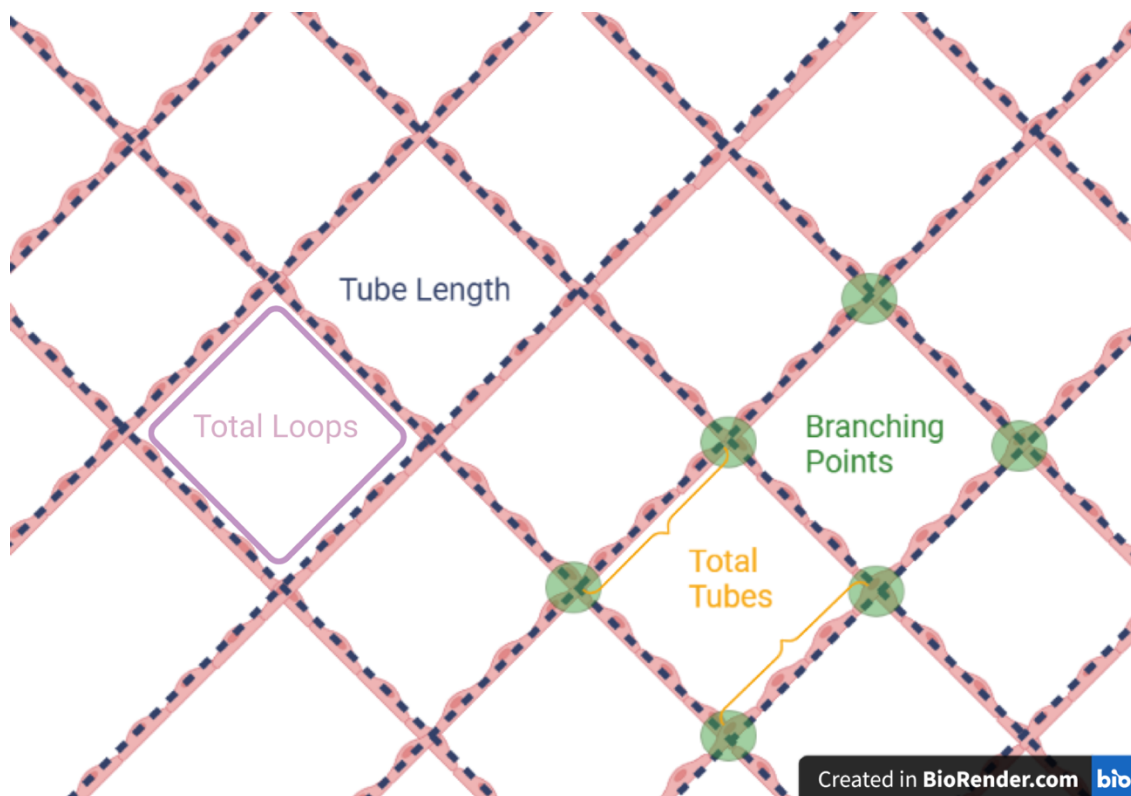


Abbildung 10: **Veranschaulichung der morphologischen Parameter;** Abgebildet sind die vier morphologischen Auswerteparameter des Wimasis Programmes. Die Tube-Length wird schematisch durch die gestrichelten Linien dargestellt. Die Total-Loops geben die Anzahl der Lumen, die Branching-Points die Anzahl der Verzweigungspunkte und die Total-Tubes die Anzahl der Strecken zwischen den Verzweigungspunkten an. Abbildung modifiziert nach [wimasis.com/tube-formation-assay](http://wimasis.com/tube-formation-assay) (unter: Results that make a difference); erstellt mittels BioRender.com

Nach der Optimierung der Methodendurchführung des Tube Formation Assay konnten Antikörper in diesem System getestet werden. Vorab erfolgte dafür eine Überprüfung der Antikörperbindung an die Zellen (siehe Antikörper-Bindungsnachweis mittels Durchflusszytometrie). Für den Assay wurden die Antikörper zunächst gevortext und für eine Minute bei 13.300 rpm zentrifugiert. Die gewollte Konzentration wurde dem entsprechenden Well in einem Volumen von 20  $\mu$ L mittig hinzu pipettiert, sodass das Endvolumen bei 100  $\mu$ L pro Well lag.

Folgende monoklonale Antikörper wurden zunächst jeweils in den Konzentrationen 10 und 40  $\mu$ g/mL getestet: Anti-Integrin- $\alpha$ v (Klon P2W7), Anti-Integrin- $\alpha$ v $\beta$ 3 (Klon 23C6, LM609), Anti-Integrin- $\beta$ 3 (Klon AP3, SZ21), Anti-CD31 (Klon Gi18) sowie Maus-IgG1-Antikörper (Klon MOPC31C) als Negativkontrolle. In jedem Versuch wurden unbehandelte Wells mitgeführt, da das Hemmungspotential und die Analyseergebnisse der mit Antikörper oder Serum behandelten Wells in Prozent [%] von der unbehandelten Probe (100%) angegeben wurden. Anschließend wurde die Wirkung folgender Antikörper (10  $\mu$ g/mL) getestet: Anti- $\beta$ 3 (Klon B2G1, delta B2G1), Anti-human HLA-A, B, C (Klon W6/32) sowie Maus-IgG2a (Klon RPC5) und Anti-human IgG als Negativkontrollen.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Zellen mit LPS und TNF- $\alpha$  vorstimuliert, um die Angiogenese von mit Inflammationsfaktoren behandelten Endothelzellen zu untersuchen. Dafür wurden 300.000 HUVECs pro Well in einer 12 Well Platte ausgesät und mit 1,5 ml EBM-2 und EGM-2, 10% FCS, 1% P/S sowie 1% Ampho. B versetzt. Nach einigen Stunden waren die Zellen adhärent, sodass das Medium abgenommen und die Zellen dann für 24 Stunden mit 1,5 ml EBM-2 und EGM-2, 0,5% FCS (*starving medium*) pro Well sowie LPS (Stockkonzentration = 1  $\mu$ g/ $\mu$ l) in 3 unterschiedlichen Konzentrationen (0,5, 1 und 2  $\mu$ g/ $\mu$ l) oder TNF- $\alpha$  (Stockkonzentration = 0,1  $\mu$ g/ $\mu$ l) in ebenfalls 3 Konzentrationen (10, 20 und 40 ng/ml) inkubiert werden konnten. Außerdem erfolgte eine gemeinsame Vorstimulation der Endothelzellen mit 0,5, 1 oder 2  $\mu$ g/ $\mu$ l LPS zuzüglich 20 ng/ml TNF- $\alpha$ .

Die vorstimulierten Zellen wurden im Tube Formation Assay zunächst unbehandelt getestet. Anschließend erfolgte die Durchführung des Assay mit LPS (0,5 und 1  $\mu$ g/ml) vorstimulierten Zellen unter Behandlung mit Anti-Integrin- $\alpha$ v $\beta$ 3 (Klon 23C6), Anti-Integrin- $\beta$ 3 (Klon AP3) sowie Maus-IgG1-Antikörpern (Klon MOPC31C) als Negativkontrolle, um zu untersuchen, ob die Zellen nach einer vorherigen Inkubation mit LPS anders auf die Antikörperbehandlung reagieren als ohne Präinkubation.

### **3.7 Antikörper-Bindungsnachweis mittels Durchflusszytometrie**

Zum grundlegenden Nachweis eines Bindungsverhaltens der verwendeten Antikörper an die HUVECs wurden die abgelösten Zellen resuspendiert, in ein 50 ml blue cap überführt und zentrifugiert (5 min, 1200 rpm). Das Pellet wurde nach Entfernung des Überstandes mit 15 ml PBS (1:10 Verdünnung von Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline 10X w/o Calcium, w/o Magnesium) versetzt. Durch eine weitere Zentrifugation (5 min, 1200 rpm) konnten die Zellen in 1 ml Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline (DPBS)/0,2% BSA aufgenommen werden. Jeweils 200.000 Zellen wurden in Eppendorfer Gefäße vorgelegt und das Volumen mit DPBS/0,2% BSA auf 50 µl aufgefüllt. Es folgte eine Zugabe von 20 µl des jeweiligen Antikörpers (0.02 mg/ml), dessen Bindung man an die HUVEC Zellen überprüfen wollte. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit bei 4 °C wurden die Proben mit 500 µl DPBS/0,2% BSA gewaschen und zentrifugiert (1 min, 7000 rpm). Der Überstand wurde mithilfe einer Vakuumpumpe abgenommen und es folgte eine Inkubation (30 min, 4 °C) vom Zellpellet mit dem markierten Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 Esel Anti-Maus-IgG (H+L) (1:500 Verdünnung). Nach einem erneuten Waschschrift und Zentrifugation (7000 rpm), wurde das Pellet in 200 µl DPBS/0,2% BSA aufgenommen. Der Bindungsnachweis der Antikörper an die HUVECs wurde mit dem Durchflusszytometer BD FACS Canto II (BD Biosciences) unter Verwendung der BD FACSDiva Version 6.1.3 ermittelt und mithilfe von FlowJo™ (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA, Version 10.8) ausgewertet.

### 3.8 Antikörper-Deglykosylierung

Generell beschreibt die Deglykosylierung eines Antikörpers die enzymatische Spaltung und Entfernung der N-Glykan-Einheit am Fc-Fragment der schweren Ketten eines IgG-Antikörpers mithilfe einer Endoglykosidase (Abb. 11); daraus resultiert eine Inaktivierung des Fc-Fragmentes, sodass der Antikörper keine Bindung mit Fc-Rezeptoren eingehen kann und folglich zelluläre Effektor- sowie Aktivierungsprozesse ausbleiben (McLeod & McClung, 2018). Für die Deglykosylierung wurden 10 µl des jeweiligen Antikörpers mit 1 µl 10X GlycoBuffer 1 und 1 µl Endo S für 1 h bei 37 °C in einem Heizblock inkubiert.

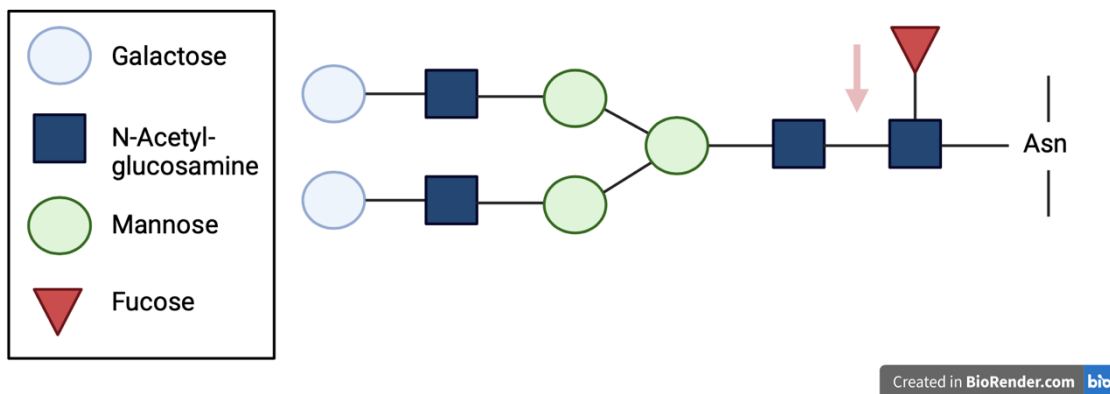
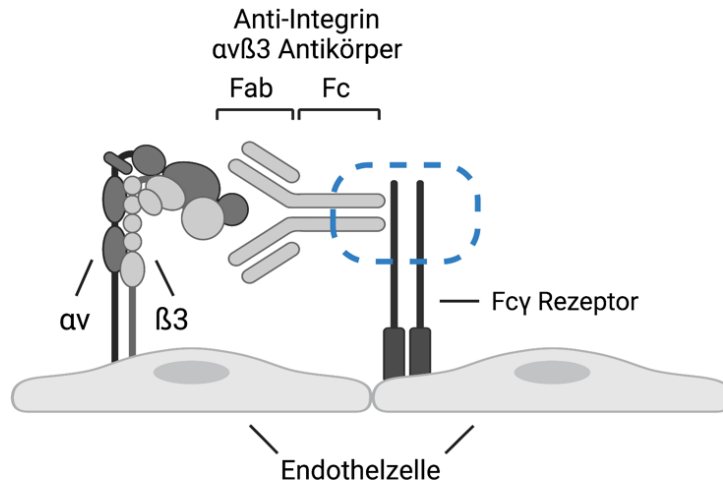


Abbildung 11: **Schematische Darstellung der Spaltungsstelle der Endoglykosidase S**; Ein Antikörper besteht aus jeweils einem F(ab')<sub>2</sub>- und einem Fc-Fragment. Die Spaltung von Endo S erfolgt im Fc-Fragment zwischen 2 N-Acetylglucosamine-Einheiten (roter Pfeil). Abbildung modifiziert nach McLeod & McClung, 2018; erstellt mittels BioRender.com

Es erfolgte eine Deglykosylierung der folgenden Antikörper: 23C6 (Anti-Integrin- $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ ), 10.1 (Anti-Fc $\gamma\text{RI}$ ), AT10 (Anti-Fc $\gamma\text{RII}$ ), IV.3 (Anti-Fc $\gamma\text{RIIa}$ ) und 3G8 (Anti-Fc $\gamma\text{RIII}$ ) sowie der jeweiligen Negativkontrollen Maus-IgG1- und Maus-IgG2b-Antikörper. Die Antikörper wurden im Tube Formation Assay getestet. Durch die jeweilige Blockade der Fc $\gamma$ -Rezeptoren sollte die Rolle des Fc $\gamma$ R im Mechanismus der Anti- $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -vermittelten Hemmung der *in vitro* Angiogenese untersucht werden. So konnte der Einfluss des glykosylierten 23C6 mit Bindung an den Fc $\gamma$ R auf Endothelzellen (Abb. 12) mit dem Einfluss von deglykosyliertem (deg.) 23C6 ohne Fc $\gamma$ R Bindung verglichen werden.



Created in BioRender.com bio

Abbildung 12: **Schematische Darstellung der Bindung zwischen dem Fc-Teil des Antikörpers und dem Fc $\gamma$ -Rezeptor auf Endothelzellen;** Der Antikörper gegen das  $\alpha v \beta 3$ -Integrin richtet sich mit dem F(ab')<sub>2</sub>-Fragment gegen das Integrin und mit dem Fc-Teil gegen den Fc $\gamma$ -Rezeptor auf Endothelzellen; erstellt mittels BioRender.com.

Im Tube Formation Assay wurden die Zellen nach Aussaat mit jeweils einem der deg. Anti-Fc $\gamma$ R-Antikörper inkubiert (30 min), sodass diese sich über ihr F(ab')<sub>2</sub>-Fragment an die entsprechenden Fc $\gamma$ R anlagern konnten. Anschließend erfolgte die Zugabe des Antikörpers 23C6.

### 3.9 SDS-Page

Die Kontrolle der erfolgreichen Antikörper-Deglykosylierung erfolgte mittels SDS-Page mit dem Nachweis einer Abnahme des Molekulargewichtes der schweren Ketten des deg. Antikörpers im Vergleich zum Molekulargewicht des nativen Antikörpers.

#### Lösungen für SDS-Gele

<b>Lösung A</b>	Rotiphorese Gel 30; bei 4 °C aufbewahren
<b>Lösung B</b>	3 M Tris-Puffer pH 8,8: 36,3 g Tris in 60 ml dest. Wasser lösen und mit 12 N HCl auf einen pH-Wert von 8,8 einstellen (Gesamtvolumen von 100 ml); bei 4 °C aufbewahren
<b>Lösung C</b>	10% SDS: 10 g SDS bei 37 °C in 100 ml Wasser lösen; bei RT aufbewahren
<b>Lösung D</b>	0,5 M Tris-Puffer pH 6,8: 3 g Tris in 40 ml Wasser lösen und den pH-Wert mit 1 N HCl auf 6,8 einstellen; bei 4 °C aufbewahren
<b>APS</b>	Zu 312,5 mg Ammoniumpersulfat 25 ml Wasser geben; bei 4 °C in brauner Flasche aufbewahren und alle zwei Monate neu ansetzen
<b>Temed</b>	Temed

Tabelle 8: **Lösungen für SDS-Gele**; Quelle: eigene Darstellung

#### Lösungen für SDS-Page

<b>Laufpuffer</b>	100 ml Rotiphorese 10x SDS-Page (1,92 M Glycin, 0,25 M Tris, 1% SDS) mit dest. Wasser auf 1 L auffüllen
<b>Probenpuffer</b>	Ansatz für 10 ml: 16 ml 4% SDS, 6 ml 15% Glycerol, 5 ml 6,25 millimolar Tris-HCl (pH 6,8), 2 ml 0,0005% Bromphenolblau und 3 ml dest. Wasser mischen, in 400 µl Aliquots aufteilen und bei 4 °C aufbewahren; immer frisch dazugeben: non reduced: 100 µl dest. Wasser zu 400 µl Probenpuffer geben; reduced: 100 µl 1M DTT zu den 400 µl PP geben

Tabelle 9: **Lösungen für SDS-Page**; Quelle: eigene Darstellung

Zu Beginn erfolgte die Reinigung von zwei Glasplatten mithilfe von Isopropanol. Eine Gummidichtung wurde um die Spacer herumgelegt. Die Platten wurden rechts und links mit Klammern fixiert, der Kamm eingesetzt und die Höhe des Trenngels markiert (etwa 1 cm unterhalb des Kamms). Ein Trenngel bestand aus 3,375 ml dest. Wasser, 2,39 ml Lösung (Lsg.) A, 871,5 µl Lsg. B, 70,35 µl 10 % SDS, 9,4 µl Temed und 234,4 µl APS. Der Zwischenraum der Platten wurde mit dem Trenngel bis zur Markierung aufgefüllt und mit Isopropanol beschichtet. Im Anschluss der Polymerisation (30 min) wurde das Isopropanol mit dest. Wasser herausgespült. Für das Sammelgel wurden 1,75 ml dest. Wasser, 0,5 ml Lsg. A, 312,5 µl Lsg. D., 25 µl 10 % SDS, 7,5 µl Temed und 93,8 µl APS

vereint und auf das Trenngel gegossen, sodass der Kamm eingesetzt und nach 30 min wieder entfernt werden konnte. Die Taschen wurden mit einem Laufpuffer befüllt, der anschließend mit einer langen Pipettenspitze abgesaugt wurde. Nach Entfernung der Klammern und Gummidichtung, wurde der Laufpuffer in die untere Kammer gegeben. 1 L Laufpuffer setzt sich dabei aus 100 ml Rotiphorese SDS-Page 10x und 900 ml dest. Wasser zusammen. Das Gel wurde schräg in die untere Kammer eingesetzt, damit Luftblasen zwischen den Glasplatten nach oben laufen konnten und mit schwarzen Klammern fixiert. Zum Ausgleich wurde auf der anderen Seite eine Modellplatte befestigt und der Laufpuffer wurde in die obere Kammer gefüllt, bis er das Gel bedeckte. Die Proben wurden 1:2 mit 2x Probenpuffer verdünnt und vorsichtig in die Slots pipettiert. Die restlichen leeren Slots wurden mit 1x Probenpuffer befüllt und die Elektrophorese-Kammer wurde angeschlossen. Der Gel-Lauf erfolgte für eine Stunde bei einer Einstellung von 15 Milliampere (mA) im Sammel- sowie 20 mA im Trenngel.

### 3.10 Silberfärbung

<b>Fixierungslösung</b>	100 ml Eisessig (96 %) + 300 ml Ethanol + 600 ml dest. Wasser
<b>6 % Na<sub>2</sub>-EDTA x 2 H<sub>2</sub>O</b>	6 g in 100 ml
<b>2 % Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5 H<sub>2</sub>O</b>	10 g in 500 ml
<b>10 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	10 g in 100 ml
<b>1 % Silbernitrat</b>	1 g in 100 ml (in brauner Flasche aufbewahren)
<b>2,5 M Na-Acetat</b>	MG 82,03, 102,54 g in 500 ml

Tabelle 10: **Stammlösungen für Silberfärbung**; Quelle: eigene Darstellung

Durch die Silberfärbung können unter anderem Proteine, in diesem Fall die Antikörper, sichtbar gemacht werden. Dafür erfolgte zunächst ein Fixierungsschritt: 4 ml Essigsäure, 12 ml Methanol und 24 ml dest. Wasser wurden zusammengegeben. Das Gel wurde anschließend für mindestens 30 Minuten in die Lösung eingelegt. Über Nacht erfolgte eine Inkubation in 12 ml Ethanol, 200 µl 25 % Glutaraldehyd, 4 ml 2 % Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5 H<sub>2</sub>O, 8 ml 2,5 molar (M) Na-Acetat sowie 15,8 ml dest. Wasser. Am nächsten Tag wurde das Gel 3-Mal für 5 min in dest. Wasser gewaschen. Es konnte dann für 30 bis 40 min in eine 1% Silbernitrat-Lsg. und anschließend für einige Sekunden in dest. Wasser gelegt werden. Die 5- bis 10-minütige Entwicklung des Gels erfolgte durch die Zugabe von 10 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 4 µl 37 % Formaldehyd. Dies wurde dann mit dest. Wasser auf 40 ml aufgefüllt. Das Stoppen der Färbung erfolgte durch 10 ml 6 % Na<sub>2</sub>-EDTA x 2 H<sub>2</sub>O sowie 30 ml dest. Wasser für mind. 10 min. Dabei konnte das Gel in der Stopplösung für mehrere Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden.

### 3.11 Absorptionsversuche

Im Rahmen der Versuchsreihe mit humanem Serum sollte untersucht werden, ob die Absorbate der Seren eine abweichende angiogenetische Wirkung auf die Endothelzellen im Vergleich zum nativen Serum aufweisen. Die Verwendung der Patientenseren beruht auf einem von der Justus-Liebig-Universität genehmigtem Ethikvotum und Amendment (82/09). Es wird davon ausgegangen, dass im Serum sowohl Anti- $\alpha\beta_3$ - als auch Anti- $\beta_3$ -Antikörper vorhanden sind und nach Absorption überwiegend die Anti- $\alpha\beta_3$ -Antikörper verbleiben. Dafür wurden zunächst sowohl nicht-transfizierte Nierenzellen humaner Embryonen HEK293F-Zellen in DMEM High Glucose mit 10 % FCS sowie 1 % P/S als auch transfizierte HEK293S-J582 Zellen (Transfektion im Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Gießen, Deutschland), welche  $c\beta_3$  Protein-Monomere produzieren (Bayat et al., 2019), in Kultur gebracht. Der Überstand der transfizierten Zellen mit den darin produzierten  $c\beta_3$ -Monomeren wurde abgenommen. Die Absorption der Anti- $\beta_3$ -Antikörper durch  $c\beta_3$ -Monomere wurde zunächst vor der Anwendung am Serum mittels des Antikörpers AP3 erprobt. Dafür wurden zu je 100  $\mu$ l  $c\beta_3$ -Überstand und Medium der untransfizierten HEK-Zellen, der Antikörper AP3 (1  $\mu$ l, 0,5 mg/ml) hinzugefügt. Der Maus-IgG-Antikörper wurde als Kontrolle genutzt. Nach einer 1-stündigen Inkubationszeit erfolgte eine Zugabe von Thrombozyten oder HUVECs. Anschließend wurden die Zellen nach 30 min (4 °C) gewaschen und die Suspension wurde zentrifugiert (1 min, 7000 rpm). Das Zellpellet wurde mit dem markierten Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 donkey Maus-IgG (1:500 Verdünnung) 30 min lang bei 4 °C inkubiert. Nach dem Waschen und einer erneuten Zentrifugation (1 min, 7000 rpm), konnte das Pellet in 200  $\mu$ l DPBS/0,2% BSA aufgenommen werden und die Proben wurden am Durchflusszytometer gemessen (Abb. 17). Das humane Serum wurde dann durch eine 2-stündige Inkubation mit dem  $c\beta_3$ -Überstand (100  $\mu$ l, 4 °C) absorbiert. Magnetische beads (MagStrep „type 3“ XT beads) wurden nach der Absorption der Seren eingesetzt, um den Komplex aus  $c\beta_3$ -Monomeren und Anti-Integrin- $\beta_3$ -Antikörpern zu entfernen. Vorerst wurden 80  $\mu$ l der Suspension mit den darin enthaltenen beads in ein Eppendorfer Gefäß gegeben, welches dann in einen magnetischen Separator platziert wurde. So konnten die beads festgehalten und der Überstand abgenommen werden. Danach wurden sie insgesamt zweimal mit 0.8 ml Buffer W (Strep-tag® washing buffer) resuspendiert. Nach Zentrifugation der Seren (20 min, 4.000 g), konnten diese anschließend 30 min lang bei 4 °C mit den magnetischen beads inkubiert werden. Die Gefäße wurden erneut in den Separator gestellt und der aufgereinigte Überstand entnommen. Für die Durchführung des Tube Formation Assay

wurden 15.000 HUVECs in 40  $\mu$ L pro Well ausgesät und mit jeweils 60  $\mu$ L Serum/Absorbat behandelt. Als Kontrolle wurde das AB-Serum mitgeführt.

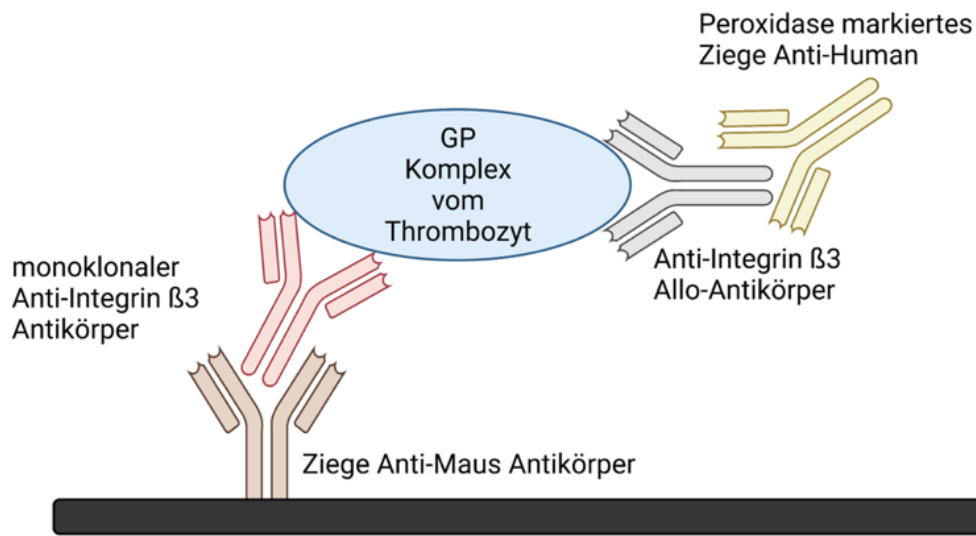
### **3.12 Puffer**

Es erfolgte die Herstellung folgender Reagenzien: Der Coating Puffer bestand aus 1,59 g  $\text{Na}_2\text{CO}$ , 2,93 g  $\text{NaHCO}_3$ , 0,2 g Natriumazid sowie 1000 ml dest. Wasser. Der Trispuffer setzte sich aus 3,63 g Tris in 3 l isotoner  $\text{NaCl}$  Lsg. und 15 ml Triton x 100 mit einem Lösungs-pH von 7,4 zusammen. Der Solubilisationspuffer wurde durch 100 ml Trispuffer, 15 ml Tween (Polysorbat) und 1,5 ml  $\text{CaCl}_2$  erstellt und für den Substratpuffer wurden 2 Orthophenyldiamin Tabletten in 6 ml dest. Wasser mit 2,5  $\mu$ L Wasserstoffperoxid gelöst. Für den Säurepuffer wurden 64,8 ml physiologischer  $\text{NaCl}$ , 28,4 ml dest. Wasser, 6,8 ml 22 % Rinderalbumin sowie 1 ml 96 % Essigsäure vereint. Anschließend wurde der pH-Wert mit Salzsäure ( $\text{HCl}$ ) auf 2,8 eingestellt und die eluierten Antikörper mit 3  $\mu$ L 2.5M Tris buffer (15,1 g Tris; 50 ml dest. Wasser; pH = 7.2) neutralisiert.

### **3.13 Indirekter MAIPA/MAIEA (Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet/Endothelial Antigens Assay)**

Der indirekte MAIPA ist eine wichtige labordiagnostische Methode und dient im Allgemeinen der Differenzierung sowie dem Screening von freien Antikörpern im Serum, die an thrombozytäre Glykoproteine binden; der herausgelöste Komplex aus dem monoklonalen Antikörper, dem thrombozytären Glykoprotein sowie dem thrombozytären Alloantikörper wird mittels Peroxidase-markiertem Anti-Human IgG erkennbar gemacht (Kiefel, 1992; Kiefel et al., 1987). Mithilfe des Assays wurde das Serum nach Adsorption auf die Anti- $\beta$ -Antikörper-Aktivität untersucht; zudem wurde die Reaktivität der Antikörper mit Thrombozyten und EA.hy926 Zellen überprüft. Zunächst wurde das FNAIT Serum mit fetaler Hirnblutung (ICH +), das FNAIT Serum ohne fetale Hirnblutung (ICH -) und das AB-Serum 3 min lang bei 13.300 rpm zentrifugiert. Insgesamt wurden 12 Ansätze vorgelegt, die bei 4 °C über Nacht inkubierten, wobei jeweils 4 mit 25  $\mu$ L ICH + und ICH - sowie AB Serum befüllt wurden. Außerdem wurde eine Mikrotiterplatte mit hoher Bindungskapazität mit 100  $\mu$ L Goat Anti-Maus-IgG und Coating Puffer im 1:500 Verhältnis pro Well beschichtet. Jeweils 2 Ansätze des ICH +, ICH - und AB Serums wurden mit 500.000 EA.hy926 Zellen versetzt, wobei eins den  $\text{c}\beta 3$ -Überstand und das andere Medium enthielt. Eine Wiederholung erfolgte bei den restlichen Gefäßen mit 3 Millionen Thrombozyten. Die Ansätze wurden für eine halbe Stunde inkubiert, einmal mit 100  $\mu$ L  $\text{NaCl}$  gewaschen und zentrifugiert (10.000 rpm, 1 min). Nach einer Entfernung des Überstands konnten die Zellen in 30  $\mu$ L DPBS/0,2% BSA resuspendiert werden, woraufhin jeder Ansatz mit 10  $\mu$ L AP3 versetzt wurde. Nach der Inkubation (30 min)

konnten die nichtgebundenen Bestandteile 3-mal mit 100  $\mu$ l NaCl herausgewaschen werden. Anschließend wurden die antikörperbeladenen EA.hy926 Zellen und Thrombozyten mit 100  $\mu$ l Solubilisationspuffer behandelt, sodass sich die Membrankontinuität auflöste, die Komplexe der Glykoproteine ( $\beta$ 3 Integrin) aber erhalten blieben. Auf eine 30-minütigen Inkubation bei 4 °C, folgte eine Zentrifugation (13.000 rpm) und erneute Inkubation, sodass die Mikrotiterplatte dann 4-Mal mit 200  $\mu$ l Trispuffer pro Well gewaschen werden konnte. Im Anschluss wurde die Platte mit weiteren 200  $\mu$ l Trispuffer pro Well für mind. 15 min bei 4 °C blockiert. 50  $\mu$ l des Überstands wurden nach Zentrifugation vorsichtig abpipettiert und in 200  $\mu$ l Trispuffer resuspendiert. Die geblockte Mikrotiterplatte wurde ausgeklopft und in jedes Well 100  $\mu$ l vom verdünnten Überstand hinzugegeben. Der Blindwert konnte mit Trispuffer eingestellt werden. Anschließend erfolgte eine 90-minütige Inkubation bei 4 °C. Die Platte wurde dann erneut 4-Mal mit 200  $\mu$ l Trispuffer pro Well gewaschen. Die vom AP3 gebundenen Glykoprotein-Komplexe konnten durch die Ziege Anti-Maus-Antikörper auf der Mikrotiterplatte immobilisiert werden. Es folgte eine 2-stündige Inkubation mit 100  $\mu$ l enzymmarkierte Ziege Anti-Human Antikörper pro Well, der die Anti-Integrin- $\beta$ 3-Antikörper der Seren bindet (Abb. 13). Anschließend wurde die Platte erneut 4-Mal mit 200  $\mu$ l Trispuffer gewaschen und es erfolgte eine Zugabe von 200  $\mu$ l Substratpuffer pro Well. Die Platte wurde 30 min lang im Dunkeln bei RT stehen gelassen, da die Enzym-Substratreaktion lichtempfindlich ist. Nachdem die Reaktion mit 50  $\mu$ l Schwefelsäure gestoppt wurde, konnte eine photometrische Messung erfolgen (Messwellenlänge im Photometer: 492 nm, 620 nm, Photometer von Sunrise-Tecan).



Created in [BioRender.com](https://www.biorender.com) 

Abbildung 13: **Indirekter MAIPA (Prinzip)**; Der Ziege Anti-Maus-Antikörper bindet an den Boden der Mikrotiterplatte. Mit dem F(ab')<sub>2</sub>-Segment bindet er den Fc-Teil des Anti- $\beta 3$ -Antikörpers. Der Glykoprotein-Komplex auf Thrombozyten wird von monoklonalen Anti- $\beta 3$ - sowie Anti- $\beta 3$ -Allo-Antikörpern gebunden. Die Anti-Integrin- $\beta 3$ -Allo-Antikörper werden durch Peroxidase-gekoppelte Antikörper detektiert; erstellt mittels BioRender.com.

## 4 Ergebnisse

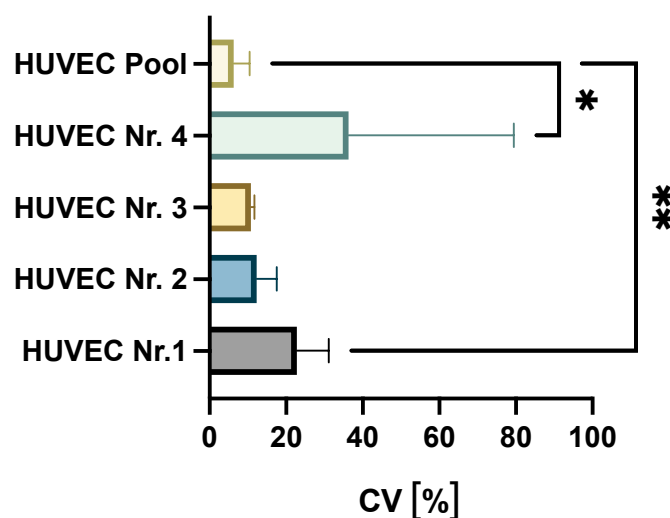
### 4.1 Gepoolte HUVECs weisen einen niedrigeren Variationskoeffizienten im Tube Formation Assay auf.

Zur Etablierung des *in vitro* Angiogenese Modells wurden HUVECs aus 4 verschiedenen Nabelschnurproben mit Zellen aus einem Pool von 4 Spenderinnen im Tube Formation Assay verglichen, um festzustellen, ob einzelne oder gepoolte Zellen für die Versuchsreihen besser geeignet sind. Dabei konnte gezeigt werden, dass gepoolte HUVECs einen niedrigeren Intra-Assay-Variationskoeffizienten (CV) in allen vier morphologischen Auswerteparametern im Vergleich zu den HUVECs aus einzelnen Nabelschnurproben aufweisen (Tab. 11). Die Versuche mit den Einzelproben Nr. 1 (CV-Mittelwert (MW) 22.75 %, Standardabweichung (SD) 8.3 %,  $p = 0,0047$ ) und 4 (CV MW 36.3 %, SD 43.2 %,  $p = 0,0208$ ) gingen mit höheren CV-Werten und somit einer erhöhten Heterogenität im Vergleich zu den Werten der gepoolten HUVECs (CV MW 6.3 %, SD 4.2 %) einher und deuteten auf eine niedrige Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hin (Abb. 14). Um innerhalb der Versuchsergebnisse den Einfluss der Spendervariabilität, die unter anderem auch von der Passage der Zellen und der  $\alpha\beta 3$ -Integrin Oberflächenexpression abhängig ist, entgegenzuwirken, wurden gepoolte HUVECs verwendet.

Tabelle 11: **Variationskoeffizienten der morphologischen Auswertung von gepoolten HUVECs im Vergleich zu den HUVECs von Einzelspenderinnen im Tube Formation Assay.** Im Rahmen der *in vitro* Angiogenese wurden Nabelschnurzellen von vier Einzelspenderinnen mit gepoolten Zellen aus vier Nabelschnurproben anhand morphologischer Auswertungsparameter (Tube-Length, Branching-Points, Total-Loops, Total-Tubes) verglichen. Insgesamt war die Variation der ausgewerteten Ergebnisse vom HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) Pool im Vergleich zur Variation von den Nabelschnurproben Nr.1, 2, 3 und 4 deutlich geringer. Der Parameter Total-Loops zeichnete sich sowohl bei den Einzelproben als auch bei den gepoolten Zellen durch den höchsten Variationskoeffizienten aus, was verdeutlicht, dass dieser relativ gesehen mit einer höheren Streubreite einhergeht.

	<b>Tube-Length</b>	<b>Branching-Points</b>	<b>Total-Loops</b>	<b>Total-Tubes</b>
	CV [%]	CV [%]	CV [%]	CV [%]
HUVEC Nr. 1	17	21	35	18
HUVEC Nr. 2	9	11	20	9
HUVEC Nr. 3	10	11	12	10
HUVEC Nr. 4	14	17	101	13
<b>HUVEC Pool</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>12</b>	<b>5</b>

Abbildung 14: **Mittelwert der Variationskoeffizienten von gepoolten HUVECs im Vergleich zu dem Mittelwert der Variationskoeffizienten von HUVEC-Einzelspenderinnen im Tube Formation Assay.** Die Variation (CV) der morphologischen Parameterauswertung vom HUVEC (human umbilical vein endothelial cell) Pool im *in vitro* Angiogenese-Assay war geringer als die Variation der Ergebnisse von Zellen, die von Einzelspenderinnen Nr. 1 (CV-Mittelwert (MW) 22.75 %, Standardabweichung (SD) 8.3 %,  $p = 0.0047$ , Friedman-Test) und 4 (CV MW 36.3 %, SD 43.2 %,  $p = 0.0208$ , Friedman-Test) stammten. Gepoolte HUVECs eigneten sich somit besser für die zu untersuchenden Versuchsreihen in Bezug auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (CV MW 6.3 %, SD 4.2 %, Friedman-Test). In der Abbildung wird der Mittelwert der CV-Werte von den vier Parametern Tube-Length, Branching-Points, Total-Loops und Total-Tubes der jeweiligen Spendergruppe (HUVEC Pool, Nr. 1/2/3/4) dargestellt (4 technische Replikate).



#### 4.2 Die Kinetik der *in vitro* Angiogenese von HUVEC Pool Zellen im Tube Formation Assay.

Ein weiterer Schritt im Rahmen der Etablierung des Tube Formation Assays stütze sich auf die Erstellung einer Kinetik, basierend auf der morphologischen Auswertung der Tube-Length, zur Bestimmung eines geeigneten Analysezeitpunktes bzw. -zeitrahmens. Dafür wurde die Tube-Length 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 und 18 Stunden nach Aussaat der Zellen untersucht (Abb. 15). 4 Stunden nach Beginn der *in vitro* Angiogenese lag die höchste Tube-Length in Kombination mit der geringsten Standardabweichung und einem niedrigen CV vor (MW 30.802  $\mu\text{m}$ , SD von 731  $\mu\text{m}$ , CV 1.9 %) (Abb. 15). Im Zeitrahmen von weniger als 4 Stunden nach Zellaussaat war eine hohe Standardabweichung und Variation zu beobachten (MW 30.752  $\mu\text{m}$ , SD 5061  $\mu\text{m}$ , CV 13 %) (Abb. 15). Bildmorphologisch betrachtet war die Entwicklung der *in vitro* Angiogenese 2 Stunden nach Beginn nur mäßig zu erkennen (Abb. 16). 4 Stunden nach Aussaat der Zellen wurde die Präformierung der Gefäße deutlich (Abb. 16). Nach 6 Stunden (MW

29.496  $\mu\text{m}$ , SD 1234  $\mu\text{m}$ , CV 4.3 %) und 8 Stunden (MW 27973  $\mu\text{m}$ , SD 222  $\mu\text{m}$ , CV 0.8 %) fiel die Tube-Length stetig ab und stagnierte dann ab 10 Stunden (MW 24.320  $\mu\text{m}$ , SD 273  $\mu\text{m}$ , CV 0.9 %) (Abb. 15). Das Angiogenese-Netz änderte sich bildmorphologisch entsprechend zum Zeitpunkt von 8, 12 und 16 Stunden nur noch wenig (Abb.16).

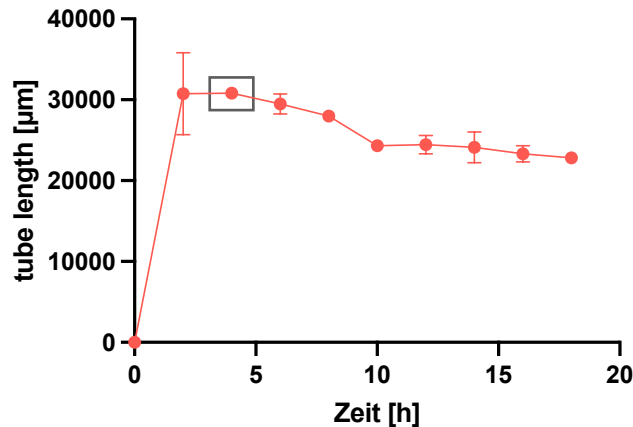


Abbildung 15: **Die Tube-Length von HUVECs im Tube Formation Assay im Zeitrahmen von 18 Stunden.** Das Diagramm stellt die Auswertung der Tube-Length der HUVECs in  $\mu\text{m}$  (y-Achse) gegen die Zeit in h (x-Achse) dar. Die höchste Tube-Length lag 4 Stunden nach Aussaat der Zellen vor (Mittelwert (MW) 30.802  $\mu\text{m}$ , Standardabweichung (SD) 731  $\mu\text{m}$ , CV 1.9 %) (3 biologische Replikate mit gepoolten Zellen humaner Umbilikalvenen). Die zweithöchste Tube-Length befand sich zum Zeitpunkt von 2 Stunden nach Beginn der *in vitro* Angiogenese (MW 30.752  $\mu\text{m}$ , SD 5061  $\mu\text{m}$ , CV 13 %). Ab 4 Stunden nahm die Tube-Length kontinuierlich ab und lag nach 10 Stunden bei durchschnittlich 24.320  $\mu\text{m}$  (SD 273  $\mu\text{m}$ , CV 0.9 %). Bis zum Zeitpunkt von 18 Stunden nach Zellaussaat, verringerte sich die Tube-Length insgesamt nur noch wenig (MW 22.827  $\mu\text{m}$ , SD 592  $\mu\text{m}$ , CV 2.1 %).

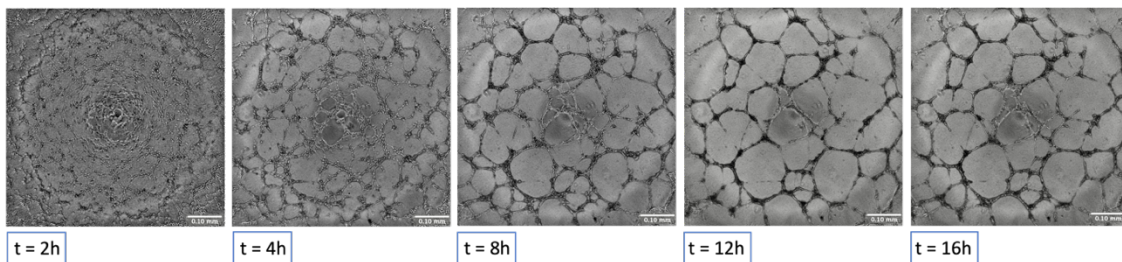


Abbildung 16: **Aufnahmen un behandelter HUVEC Poolzellen im Tube Formation Assay.** Die mikroskopischen Aufnahmen der *in vitro* Angiogenese von gepoolten HUVECs wurden 2, 4, 8, 12 und 16 Stunden nach Zugabe der Zellen zum Matrixgel aufgenommen. Zum Zeitpunkt von 4 Stunden nach Zellaussaat konnte die Präformierung der Gefäßlumen beobachtet werden. 8, 12 und 16 Stunden nach Beginn der *in vitro* Angiogenese war das Angiogenese-Netz deutlich abgrenzbar und änderte sich bildmorphologisch nur noch wenig. 5 x Objektiv

### 4.3 Durchflusszytometrische Phänotypisierung der HUVECs.

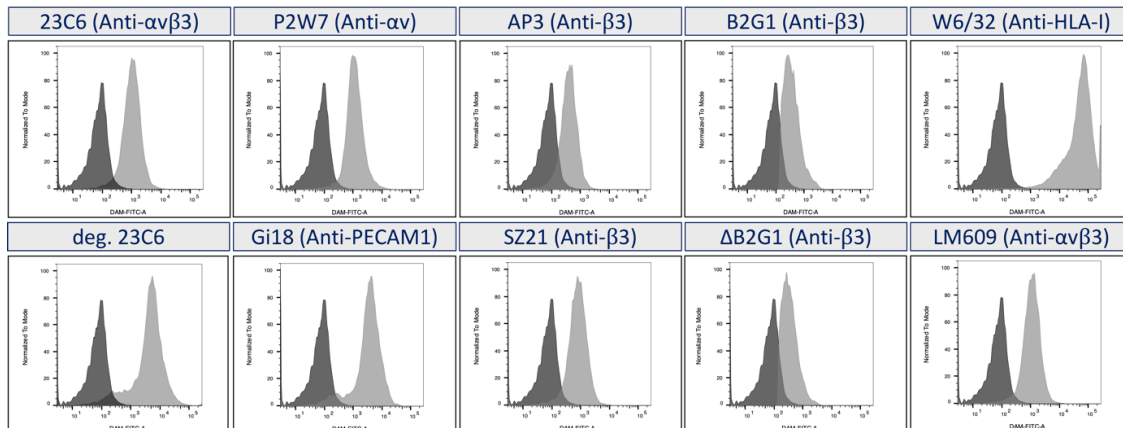
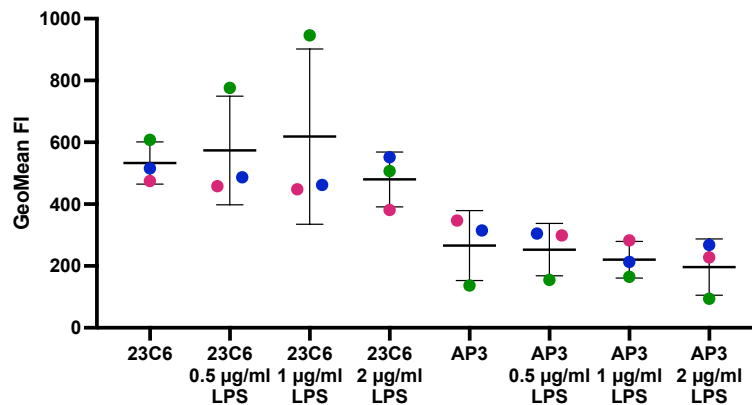


Abbildung 17: **Durchflusszytometrische Phänotypisierung der HUVECs.** In den durchflusszytometrischen Histogrammen stellte das schwarze Histogramm die Negativkontrolle dar (Maus-IgG1 bzw. Maus-IgG2-Antikörper bei W6/32 und Human IgG bei B2G1), während das graue Histogramm die Expression folgender Oberflächenmerkmale der HUVECs darstellte:  $\alpha v$ ,  $\alpha v\beta 3$ ,  $\beta 3$ , PECAM-1, HLA-Klasse I. B2G1 und SZ21 zählt zu den Anti-HPA-1a-Antikörpern gegen  $\beta 3$ .

Bevor die unterschiedlichen monoklonalen Antikörper auf ihre pro- sowie anti-angiogenetische Wirkung hin getestet wurden, erfolgte der durchflusszytometrische Nachweis der Antikörperbindung an die HUVECs, um die grundsätzliche Interaktion des jeweiligen monoklonalen Antikörpers mit den Endothelzellen sicherzustellen (Abb. 17). Die Bindung der deglykosylierten Anti-Fc $\gamma$ -Rezeptor-Antikörper vom Typ I, II, IIa und III konnte nicht durchflusszytometrisch nachgewiesen werden, da es zu einer Internalisierung der Antikörper in die HUVECs kommt (Bayat et al., 2021). Auch die Bindung der Antikörper 23C6 und AP3 an mit LPS vorinkubierte HUVECs wurde ermittelt; dabei sollte überprüft werden, ob durch die Präinkubation mit inflammatorischem LPS die Oberflächenexpression der Integrine auf den Endothelzellen hochreguliert wird. Es kam zu keiner Expressionszunahme des  $\alpha v\beta 3$ -Integrins oder der  $\beta 3$ -Integrinkette durch die Vorinkubation der Endothelzellen mit LPS in unterschiedlichen Konzentrationen; der mittlere GeoMean-Wert der Fluoreszenz-Intensität von 23C6 (MW 533 SD 68) und AP3 (MW 266 SD 113) blieb nach einer Vorinkubation mit LPS unverändert (Abb. 18).

Abbildung 18: **Bindung der Antikörper 23C6 und AP3 an HUVECs mit und ohne LPS-Vorinkubation.** Der GeoMean der Fluoreszenz-Intensität wurde für die Bindung von 23C6 (Anti- $\alpha\beta 3$ -Antikörper) und AP3 (Anti- $\beta 3$ -Antikörper) an unbehandelten HUVECS sowie an mit LPS behandelten Zellen ( $c = 0.5, 1, 2 \mu\text{g/ml}$ ) ermittelt. Erkenntlich an der fehlenden Zunahme der Fluoreszenz-Intensität, kam es zu keiner nachweisbaren Expressionszunahme der  $\alpha\beta 3$  und  $\beta 3$  Integrine auf den Endothelzellen (3 biologische Replikate; *23C6 plus LPS 0.5  $\mu\text{g/ml}$*  MW (Mittelwert) 574 SD (Standardabweichung) 176, *23C6 plus LPS 1  $\mu\text{g/ml}$*  MW 619 SD 284, *23C6 plus 2  $\mu\text{g/ml}$*  MW 480 SD 89, *AP3 plus LPS 0.5  $\mu\text{g/ml}$*  MW 253 SD 85, *AP3 plus LPS 1  $\mu\text{g/ml}$*  MW 220 SD 59, *AP3 plus LPS 2  $\mu\text{g/ml}$*  MW 91, jeweils  $p > 0.05$ , Kruskal-Wallis Test).



#### 4.4 Monoklonale Antikörper hemmen die *in vitro* Angiogenese.

Nach der Etablierung des Tube Formation Assays erfolgte die Untersuchung unterschiedlicher Antikörper gegen Oberflächen-Integrine von HUVECs hinsichtlich ihrer pro- sowie anti-angiogenetischen Wirkung in Bezug auf die endotheliale Gefäßneubildung. Mithilfe von monoklonalen Antikörpern sollte zunächst die potenzielle Wirkung mütterlicher Antikörper im Rahmen der FNAIT im Tube Formation Assay nachgestellt werden. Durch die Blockierung der jeweiligen Integrine kann die Beeinflussung der *in vitro* Angiogenese eingeschätzt werden und relevante Informationen über den Pathomechanismus der fetalen Hirnblutungen liefern.

Es konnten folgende Beobachtungen festgestellt werden: Zum Zeitpunkt von 4 Stunden (Abb.19) nach Beginn der *in vitro* Angiogenese, reduzierte die Inkubation der Endothelzellen mit dem monoklonalen Antikörper LM609  $10 \mu\text{g/ml}$  (MW 36.53 %, SD 21.56 %,  $p = 0.0377$ , Kruskal-Wallis-Test) und  $40 \mu\text{g/ml}$  (MW 29.74 %, SD 17.07 %,  $p = 0.0376$ , Kruskal-Wallis-Test) die Zahl der Branching-Points (Abb. 19). Die Zahl der Total-Tubes wurde durch die Inkubation der Zellen mit dem Antikörper LM609  $40 \mu\text{g/ml}$  verringert (MW 31.14 %, SD 7.84 %,  $p = 0.0282$ , Kruskal-Wallis-Test). Keiner der verwendeten Antikörper verminderte die Zahl der Tube-Length. Die Total-Loops stellten einen insgesamt sensitiven Parameter der Angiogenese-Hemmung dar, da die Inkubation der Zellen mit dem monoklonalen Antikörper LM609 im Vergleich zu den

anderen Parametern zur stärksten Abnahme führte (LM609 10 µg/ml: MW 51.51 %, SD 29.84 %,  $p > 0.05$ , Kruskal-Wallis-Test und 40 µg/ml MW 40.63 %, SD 36,14 %,  $p > 0.05$ , Kruskal-Wallis-Test).

Zum Zeitpunkt von 6 Stunden nach Zellaussaat führte die Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper LM609 10 µg/ml (MW 25.34 %, SD 12.85 %,  $p = 0.0243$ , Kruskal-Wallis-Test) und 40 µg/ml (MW 21.57 %, SD 16.15 %,  $p = 0.0243$ , Kruskal-Wallis-Test) sowie 23C6 10 µg/ml (MW 21.70 %, SD 8.27 %,  $p = 0.0209$ , Kruskal-Wallis-Test) und 40 µg/ml (MW 20.06 %, SD 14.82 %,  $p = 0.0153$ , Kruskal-Wallis-Test) zu einer Reduktion der Branching-Points (Abb. 21). Auch die monoklonalen Antikörper P2W7 (MW 18.16 %, SD 10.19 %,  $p = 0.0209$ , Kruskal-Wallis-Test) und SZ21 (MW 17.25 %, SD 18.78 %,  $p = 0.0243$ , Kruskal-Wallis-Test) mit einer Konzentration von jeweils 40 µg/ml verringerten durch die Inkubation mit den Endothelzellen die Anzahl der Branching-Points. Die Zahl der Total-Loops wurde durch die Antikörper LM609 10 µg/ml (MW 39.63 %, SD 24.52 %  $p = 0.0327$ , Kruskal-Wallis-Test) und Gi18 10 µg/ml (MW 34.09 %, SD 20.92%,  $p = 0.0433$ , Kruskal-Wallis-Test), welcher sich gegen CD31 (PECAM-1) richtet, reduziert (Abb. 21). Der Parameter Total-Loops zeigte innerhalb der vier morphologischen Parameter die stärkste Abnahme (LM609 10 µg/ml MW 39.63 %, SD 24.52 %). Erneut verminderte keiner der verwendeten Antikörper die Zahl der Tube-Length. Eine Inkubation mit dem Antikörper 23C6 10 µg/ml (MW 17.98 %, SD 7.00 %,  $p = 0.0433$ , Kruskal-Wallis-Test) reduzierte die Zahl der Total-Tubes (Abb. 21).

Acht Stunden nach Beginn der *in vitro* Angiogenese, hemmte lediglich der monoklonale Antikörper P2W7 mit einer Konzentration von 40 µg/ml die Zahl der Total-Loops (MW 20.05 %, SD 14.29 %,  $p = 0.0326$ , Kruskal-Wallis-Test) (Abb. 22).

Im Vergleich zu den 3 unterschiedlichen Zeitpunkten ( $t = 4, 6, 8$  h) lässt sich folgendes zusammenfassen: Der Parameter *Branching-Points* reagierte am häufigsten auf die Zugabe der Antikörper ( **$t = 4$  h:** LM609 10 µg/ml und 40 µg/ml;  **$t = 6$  h:** 23C6 10 µg/ml und 40 µg/ml, LM609 10 µg/ml und 40 µg/ml, P2W7 40 µg/ml, SZ21 40 µg/ml) ( $p < 0.05$ ). Der Parameter *Total-Loops* stellte sich als sensitiv für die Hemmung durch die Inkubation der Zellen mit einem monoklonalen Antikörper dar und zeigte die stärkste Abnahme ( **$t = 4$  h:** LM609 10 µg/ml MW 51.51 %, SD 29.84 %) (Abb. 19). Die Inkubation der Zellen mit monoklonalen Antikörpern, die an das  $\alpha v \beta 3$ -Integrin binden (LM609 und 23C6), verminderte die Anzahl der morphologischen Parameter am stärksten, wobei der Einfluss von LM609 größer als der von 23C6 war; monoklonale Antikörper die sich allein gegen das  $\alpha v$ -Integrin (P2W7) oder  $\beta 3$ -Integrin (AP3, SZ21) richten, führten nur in hoher Konzentration von 40 µg/ml zur Reduktion der Branching-Points (Abb. 21).

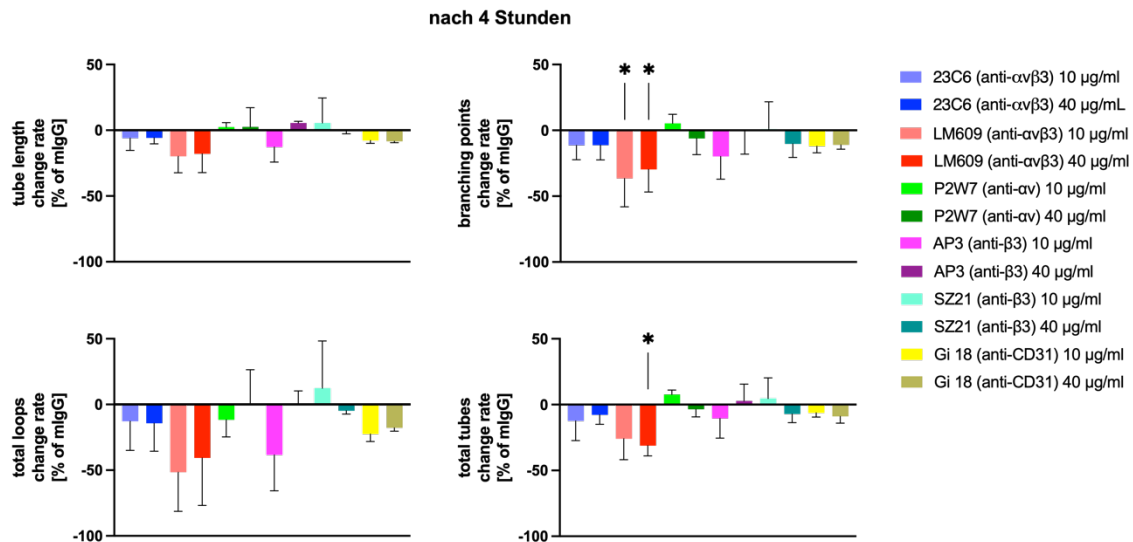
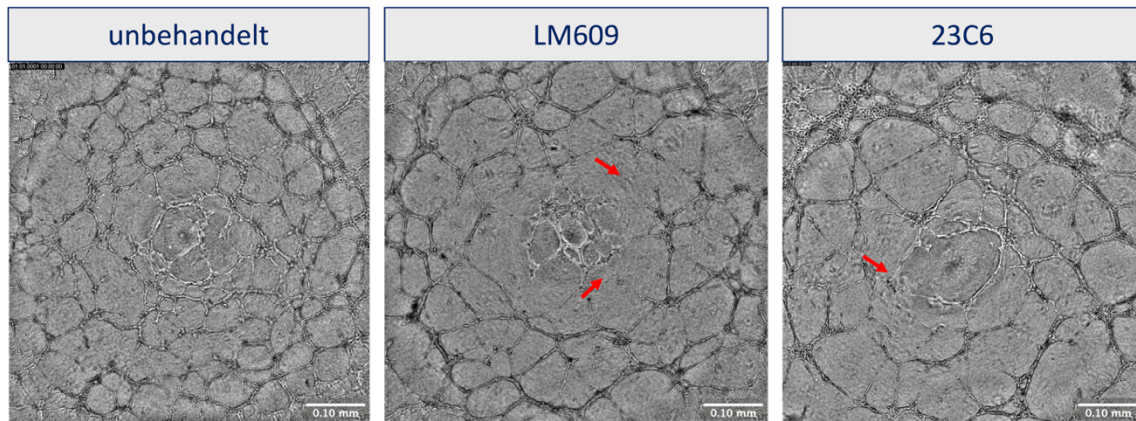


Abbildung 19: **Hemmung der *in vitro* Angiogenese von HUVECs durch Inkubation mit monoklonalen Antikörpern nach 4 Stunden.** Alle Werte spiegeln den Mittelwert von 3 unabhängigen Versuchen ( $\pm$  SD) wider ( $n = 3$ ). Die Analyseparameter der mit Antikörper behandelten Zellen wurden in Prozent [%] von der unbehandelten Probe (100%) angegeben. Der mögliche Unterschied zwischen einer mit Antikörper behandelten Probe im Vergleich zur mit der Negativkontrolle Maus-IgG (mIgG) behandelten Probe wurde nicht-parametrisch getestet (Kruskal-Wallis-Test). Dargestellt sind die Änderungsraten (change rate) der behandelten Zellen in Bezug auf die Kontrolle mIgG (Änderungsrate = 0). Die Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper LM609 (Anti- $\alpha$ v $\beta$ 3-Antikörper) führte zu einer Reduktion der Branching-Points (10  $\mu$ g/ml Mittelwert (MW) 36.53 %, Standardabweichung (SD) 21.56 %,  $p = 0.0377$ , Kruskal-Wallis-Test; 40  $\mu$ g/ml MW 29.74 %, SD 17.07 %,  $p = 0.0376$ , Kruskal-Wallis-Test). Außerdem reduzierte der Antikörper LM609 40  $\mu$ g/ml (MW 31.14 %, SD 7.84 %,  $p = 0.0282$ , Kruskal-Wallis-Test) die Zahl der Total-Tubes.



**Abbildung 20: Aufnahmen der durch LM609 und 23C6 behandelten Endothelzellen im Tube Formation Assay.** Die linke Aufnahme zeigt die *in vitro* Angiogenese der unbehandelten Zellen. Das mittlere Bild stellt die Endothelzellen dar, die mit dem monoklonalen Antikörper LM609 (Anti- $\alpha\beta 3$ -Antikörper) inkubiert wurden. In der rechten Aufnahme wurden die Endothelzellen mit dem monoklonalen Antikörper 23C6 (Anti- $\alpha\beta 3$ -Antikörper) gehemmt. Die roten Pfeile kennzeichnen Defekte in der angiogenetischen Netzausbildung, die durch eine Apoptose der Zellen durch die Inkubation mit den monoklonalen Antikörpern LM609 und 23C6 gegen das  $\alpha\beta 3$ -Integrin zu erklären sind. In den Bildern der *in vitro* Angiogenese fielen durch die Inkubation mit den Antikörpern LM609 und 23C6 im Vergleich zur unbehandelten Probe insbesondere großmaschigere Netze mit einer geringeren Anzahl und einem größeren Durchmesser der Loops sowie weniger Verzweigungspunkte auf ( $t = 4 \text{ h}$ ). 5 x Objektiv

Abbildung 21: **Hemmung der *in vitro* Angiogenese von HUVECs durch Inkubation mit monoklonalen Antikörpern nach 6 Stunden.** Alle Werte spiegeln den Mittelwert von 3 unabhängigen Versuchen ( $\pm$  SD) wider ( $n = 3$ ). Die Analyseparameter der mit Antikörper behandelten Zellen wurden in Prozent [%] von der unbehandelten Probe (100%) angegeben. Der mögliche Unterschied zwischen einer mit Antikörper behandelten Probe im Vergleich zur mit der Negativkontrolle Maus-IgG (mlgG) behandelten Probe wurde nicht-parametrisch getestet (Kruskal-Wallis-Test). Dargestellt sind die Änderungsraten (change rate) der behandelten Zellen in Bezug auf die Kontrolle mlgG (Änderungsrate = 0). Die Anzahl der Branching-Points wurde durch die monoklonalen Antikörper LM609 (Anti- $\alpha$ v $\beta$ 3-Antikörper) 10  $\mu$ g/ml (Mittelwert (MW) 25.34 %, SD 12.85 %,  $p = 0.0243$ , Kruskal-Wallis-Test) und 40  $\mu$ g/ml (MW 21.57 %, SD 16.15 %,  $p = 0.0243$ , Kruskal-Wallis-Test), 23C6 (Anti- $\alpha$ v $\beta$ 3-Antikörper) 10  $\mu$ g/ml (MW 21.70 %, SD 8.27 %,  $p = 0.0209$ , Kruskal-Wallis-Test) und 40  $\mu$ g/ml (MW 20.06 %, SD 14.82 %,  $p = 0.0153$ , Kruskal-Wallis-Test) reduziert. Außerdem verringerte die Inkubation der Endothelzellen mit den Antikörpern P2W7 (Anti- $\alpha$ v-Antikörper) (MW 18.16 %, SD 10.19 %,  $p = 0.0209$ , Kruskal-Wallis-Test) und SZ21 (Anti- $\beta$ 3-Antikörper, Anti-HPA-Antikörper Subtyp I) (MW 17.25 %, SD 18.78 %,  $p = 0.0243$ , Kruskal-Wallis-Test) in einer Konzentration von 40  $\mu$ g/ml die Anzahl der Branching-Points. Der Antikörper Gi18 (Anti-CD31-Antikörper) 10  $\mu$ g/ml (MW 34.09 %, SD 20.92%,  $p = 0.0433$ , Kruskal-Wallis-Test) und LM609 10  $\mu$ g/ml (MW 39.63 %, SD 24.52 %  $p = 0.0327$ , Kruskal-Wallis-Test) reduzierte die Zahl der Total-Loops. Die Total-Tubes wurden durch den Antikörper 23C6 10  $\mu$ g/ml gehemmt (MW 17.98 %, SD 7.00 %,  $p = 0.0433$ , Kruskal-Wallis-Test).

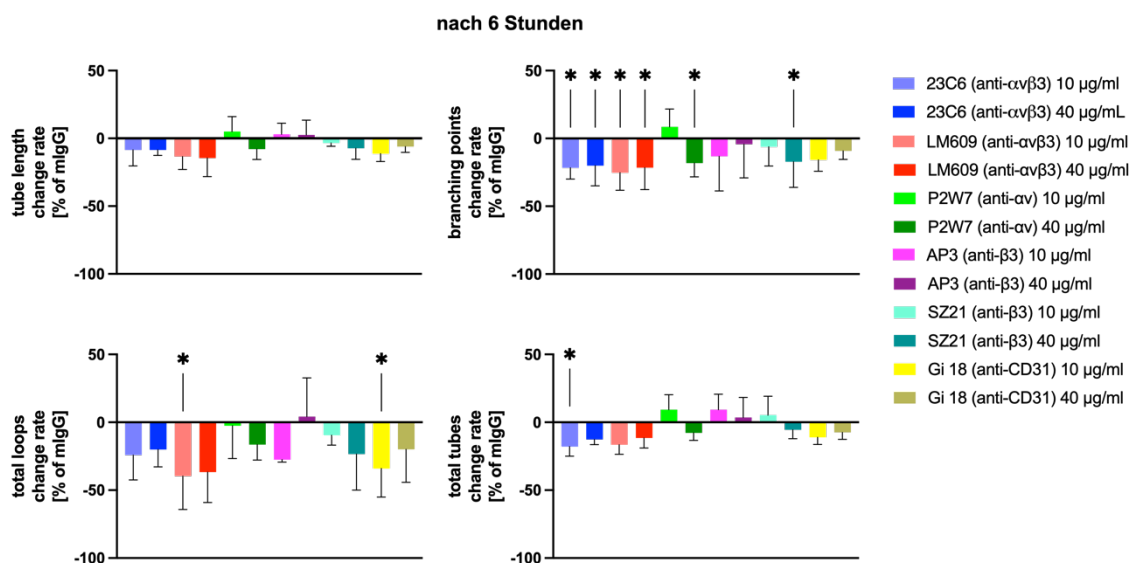
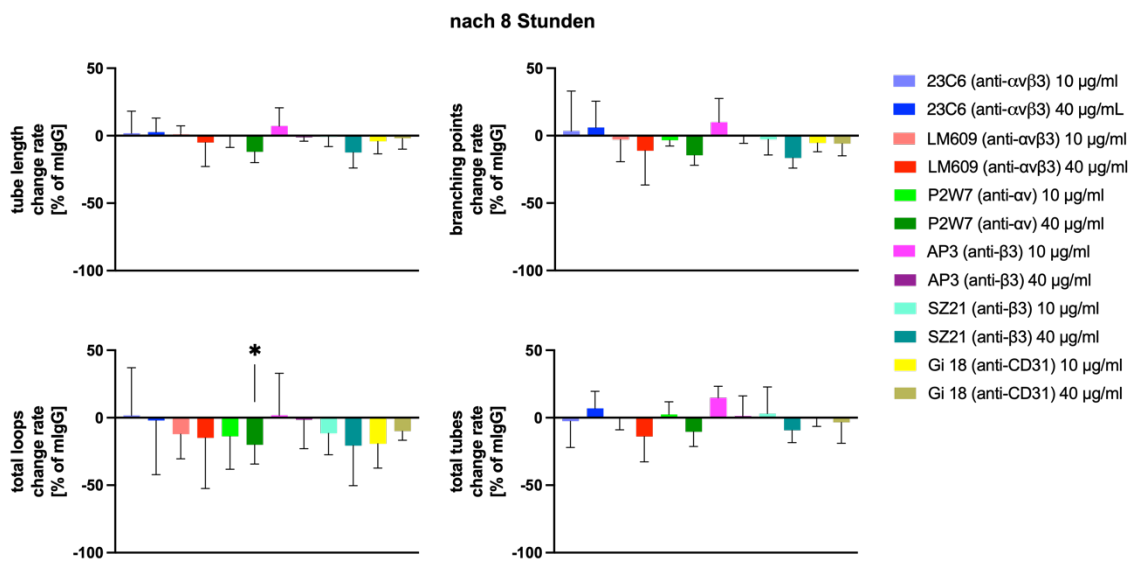


Abbildung 22: **Hemmung der *in vitro* Angiogenese von HUVECs durch Inkubation mit monoklonalen Antikörpern nach 8 Stunden.** Alle Werte spiegeln den Mittelwert von 3 unabhängigen Versuchen ( $\pm$  SD) wider ( $n = 3$ ). Die Analyseparameter der mit Antikörper behandelten Zellen wurden in Prozent [%] von der unbehandelten Probe (100%) angegeben. Der mögliche Unterschied zwischen einer mit Antikörper behandelten Probe im Vergleich zur mit der Negativkontrolle Maus-IgG (mlgG) behandelten wurde nicht-parametrisch getestet (Kruskal-Wallis-Test). Dargestellt sind die Änderungsraten (change rate) der behandelten Zellen in Bezug auf die Kontrolle mlgG (Änderungsrate = 0). Die Inkubation der Endothelzellen mit dem Antikörper P2W7 (Anti- $\alpha$ v-Antikörper) 40  $\mu$ g/ml führte zur Abnahme der Loop-Anzahl (MW 20.05 %, SD 14.29 %,  $p = 0.0326$ , Kruskal-Wallis-Test). Die Parameter Tube-Length, Branching-Points und Total-Tubes wurden nicht gehemmt.



#### 4.5 Monoklonale Anti-HLA- und Anti-HPA-1a-Antikörper hemmen die *in vitro* Angiogenese nicht.

Die Behandlung der Endothelzellen mit dem Antikörper W6/32 (Anti-HLA-Klasse), B2G1 (Anti- $\beta$ 3, HPA-1a Typ 2) und  $\Delta$ B2G1 (Anti- $\beta$ 3, HPA-1a Typ 2) sollte sowohl die Wirkung von Anti-MHC-Klasse-Antikörpern als auch den Effekt des Einsatzes humanisierter, rekombinant hergestellter Anti-HPA-1a-Antikörper gegen das  $\beta$ 3-Integrin auf Endothelzellen im Tube Formation Assay untersuchen. Dabei konnte für alle drei monoklonalen Antikörper keine Hemmung der *in vitro* Angiogenese festgestellt werden (Abb. 23, 24). Die Anzahl der Total-Loops war durch die Inkubation mit dem monoklonalen Antikörper W6/32 nach morphologischer Auswertung erhöht, was auf einen proangiogenetischen Effekt hindeutet (MW 37.96 %, SD 33.86 %,  $p = 0.0495$ , Kruskal-Wallis-Test).

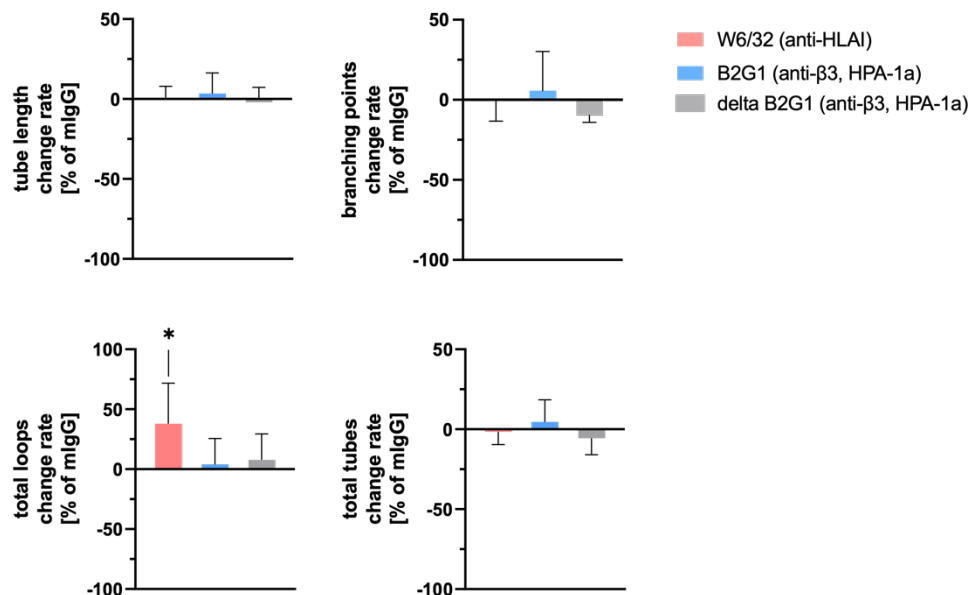


Abbildung 23: Hemmung der *in vitro* Angiogenese von HUVECs durch Inkubation mit monoklonalen Antikörpern (Anti- $\beta$ 3 (HPA-1a) und Anti-HLA-Klasse) nach 4 Stunden. Alle Werte spiegeln den Mittelwert von 3 unabhängigen Versuchen ( $\pm$  SD) wider ( $n=3$ ). Die Analyseparameter der mit Antikörper behandelten Zellen wurden in Prozent [%] von der unbehandelten Probe (100%) angegeben. Der mögliche Unterschied zwischen einer mit Antikörper behandelten Probe im Vergleich zur mit der Negativkontrolle Maus-IgG (mlgG) behandelten Probe wurde nicht-parametrisch getestet (Kruskal-Wallis-Test). Dargestellt sind die Änderungsraten (change rate) der behandelten Zellen in Bezug auf die Kontrolle mlgG (Änderungsrate = 0). Es zeigte sich in den vier morphologischen Parametern keine Hemmung durch die Antikörper W6/32 (Anti-HLA-Klasse), B2G1 (Anti- $\beta$ 3, HPA-1a Typ 2) und  $\Delta$ B2G1 (Anti- $\beta$ 3, HPA-1a Typ 2). Die Anzahl der Total-Loops wurde durch die Inkubation mit dem Antikörper W6/32 erhöht (MW 37.96 %, SD 33.86 %,  $p = 0.0495$ , Kruskal-Wallis-Test) ( $t = 4$ ).

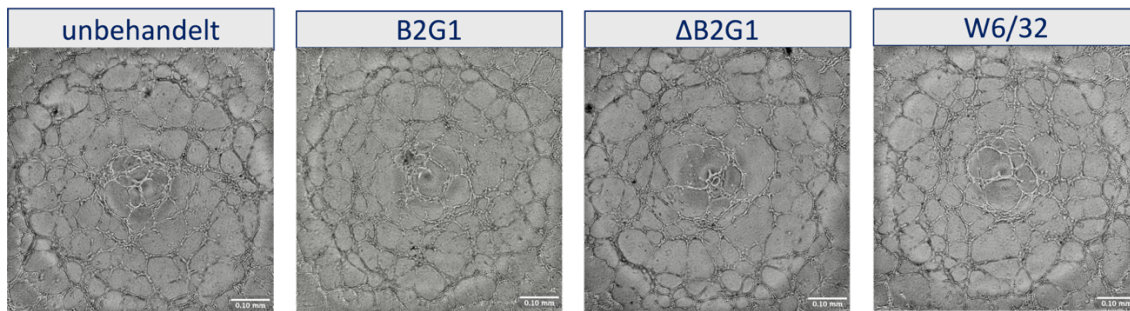


Abbildung 24: **Aufnahmen der durch B2G1,  $\Delta$ B2G1 und W6/32 behandelten Endothelzellen im Tube Formation Assay.** Die *in vitro* Angiogenese wurde durch die Inkubation der HUVECs (Endothelzellen humaner Umbilikalvenen) mit den Antikörpern B2G1 (Anti- $\beta$ 3, HPA-1a Typ 2),  $\Delta$ B2G1 (Anti- $\beta$ 3, HPA-1a Typ 2) und W6/32 (Anti-HLA-Klasse II) nach morphologischer Auswertung nicht gehemmt. In den Bildern fällt eine leichte Größenzunahme der Loops unter  $\Delta$ B2G1 Inkubation auf (t = 4 h). 5 x Objektiv

#### 4.6 Deglykosylierung monoklonaler Antikörper.

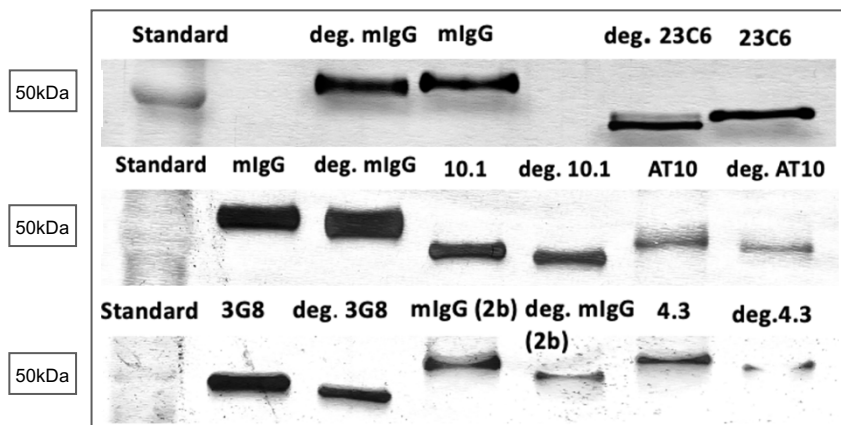


Abbildung 25: **Hinweis der Deglykosylierung mittels SDS-Page.** Die Zuckerreste der schweren Ketten (50 kDa) der Antikörper werden durch die Deglykosylierung gespalten. Durch den Shift der Banden der deglykosylierten Antikörper nach unten wurde der Hinweis auf eine Deglykosylierung mittels SDS-Page gezeigt.

23C6 wurde deglykosyliert, um die N-Glykan-Einheit am Fc-Fragment zu entfernen, welcher sonst eine Bindung mit Fc $\gamma$ -Rezeptoren der Endothelzellen eingehen kann (McLeod & McClung, 2018). Im Tube Formation Assay wurde die Wirkung von glykosyliertem 23C6 mit Fc-Fragment und Bindung an den Fc $\gamma$ -Rezeptor mit der Wirkung von deg. 23C6 ohne Fc $\gamma$ -Rezeptor-Bindung verglichen. Zudem wurden die Antikörper der Fc $\gamma$ -Rezeptoren I, II, IIa und III deglykosyliert. Diese wurden eingesetzt, um durch die Blockade der Subtypen zu untersuchen, ob und welcher Fc $\gamma$ -Rezeptor bei der Aufhebung der Inhibition der *in vitro* Angiogenese durch 23C6 eine Rolle spielt. In der SDS-Page markieren die Banden bei 50 kDa die schweren Ketten des Antikörpers; der Banden-Shift nach unten gilt als Hinweis für die erfolgreiche Deglykosylierung, da die schweren Ketten durch die Abspaltung der N-Glykan-Einheit ein geringeres Molekulargewicht aufweisen (Abb. 25).

#### 4.7 Der Fcγ Rezeptor Typ II trägt zur anti-angiogenetischen Wirkung von 23C6 bei.

Die Reduktion der Parameter Tube-Length (MW 1.9 %, SD 6.57 %,  $p = 0.0349$ , Kruskal-Wallis-Test), Total-Loops (MW 0.84 %, SD 10.46 %,  $p = 0.0298$ , Kruskal-Wallis-Test) und Total-Tubes (MW 1.28 %, SD 5.65 %,  $p = 0.0321$ , Kruskal-Wallis-Test) durch den monoklonalen Antikörper 23C6, wurde durch die Inkubation mit dem Antikörper AT10 gegen den Fcγ-Rezeptor II aufgehoben (Abb. 26). Dies weist auf einen möglichen Fcγ-abhängigen Mechanismus des Anti- $\alpha v \beta 3$ -Antikörpers 23C6 hinsichtlich seiner Wirkung auf die Angiogenese hin. Die Antikörper gegen Fcγ-Rezeptor I, IIa oder III (Klon 10.1, IV.3, 3G8) zeigten keinen Einfluss auf die anti-angiogenetische Wirkung des Antikörpers 23C6.

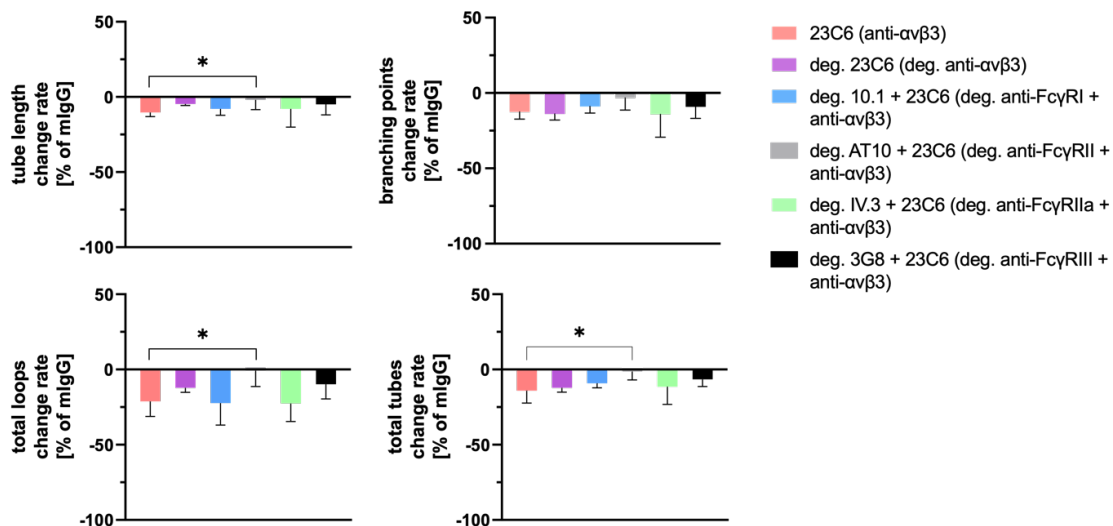


Abbildung 26: **Hemmung der *in vitro* Angiogenese von HUVECs durch Inkubation mit monoklonalen Antikörpern (Anti- $\alpha v \beta 3$ , Anti-Fcγ-Rezeptor I, II, IIa und III) nach 4 Stunden.** Alle Werte spiegeln den Mittelwert von 3 unabhängigen Versuchen ( $\pm$  SD) wider ( $n = 3$ ). Die Analyseparameter der mit Antikörper behandelten Zellen wurden in Prozent [%] von der unbehandelten Probe (100%) angegeben. Der mögliche Unterschied zwischen einer mit 23C6 (Anti- $\alpha v \beta 3$ -Antikörper) behandelten Probe im Vergleich zur mit Anti-Fcγ-Rezeptor Antikörper inkubierten Probe wurde nicht-parametrisch getestet (Kruskal-Wallis-Test). Dargestellt sind die Änderungsraten (change rate) der behandelten Zellen in Bezug auf mIgG (Änderungsrate = 0). Durch die Blockade des Fcγ-Rezeptor II durch den Antikörper AT10 und vorheriger Inkubation der Zellen mit dem Antikörper 23C6 (Anti- $\alpha v \beta 3$ -Antikörper), wurde der hemmende Einfluss des Antikörpers 23C6 hinsichtlich der Tube-Length (MW 1.9 %, SD 6.57 %,  $p = 0.0349$ , Kruskal-Wallis-Test), Total-Loops (MW 0.84 %, SD 10.46 %,  $p = 0.0298$ , Kruskal-Wallis-Test) und Total-Tubes (MW 1.28 %, SD 5.65 %,  $p = 0.0321$ , Kruskal-Wallis-Test) aufgehoben ( $t = 4$ ).

#### 4.8 *In vitro* Angiogenese nach Vorbehandlung der Endothelzellen mit LPS und TNF- $\alpha$ .

Die gepoolten HUVECs wurden mit LPS und TNF- $\alpha$  in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert, um den Einfluss der inflammatorischen Faktoren auf die Expression der Integrine (Abb. 18) und die *in vitro* Angiogenese zunächst ohne (Abb. 27, 28) und dann mit Inkubation der Antikörper 23C6 und AP3 (Abb. 29) zu untersuchen. Durch eine Vorbehandlung der Zellen mit LPS in der Konzentration von 0.5  $\mu\text{g/ml}$  wurde die Tube-Length (MW 29 %, SD 6.92%,  $p = 0.01$ , Kruskal-Wallis-Test), Branching-Points (MW 39.67 %, SD 9.29 %,  $p = 0.0286$ , Kruskal-Wallis-Test) und Total-Loops (MW 57%, SD 9.54 %,  $p = 0.0155$ , Kruskal-Wallis-Test) reduziert. Außerdem führte eine Inkubation der Endothelzellen mit TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) zuzüglich LPS 1  $\mu\text{g/ml}$  (MW 55.67 %, SD 31.79 %,  $p = 0.0251$ , Kruskal-Wallis-Test) und 2  $\mu\text{g/ml}$  (MW 57.67 %, SD 14.64 %,  $p = 0.0144$ , Kruskal-Wallis-Test) zu einer Abnahme der Total-Loops (Abb. 28).

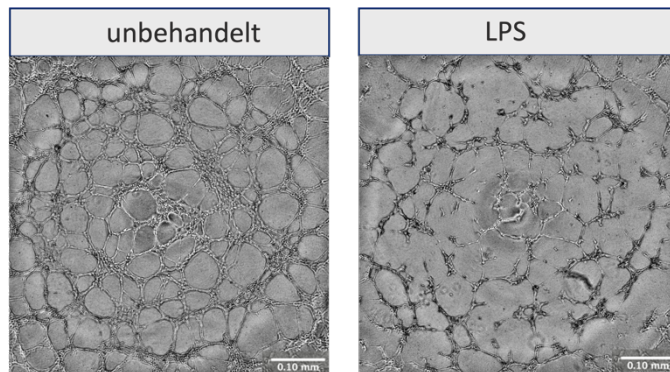
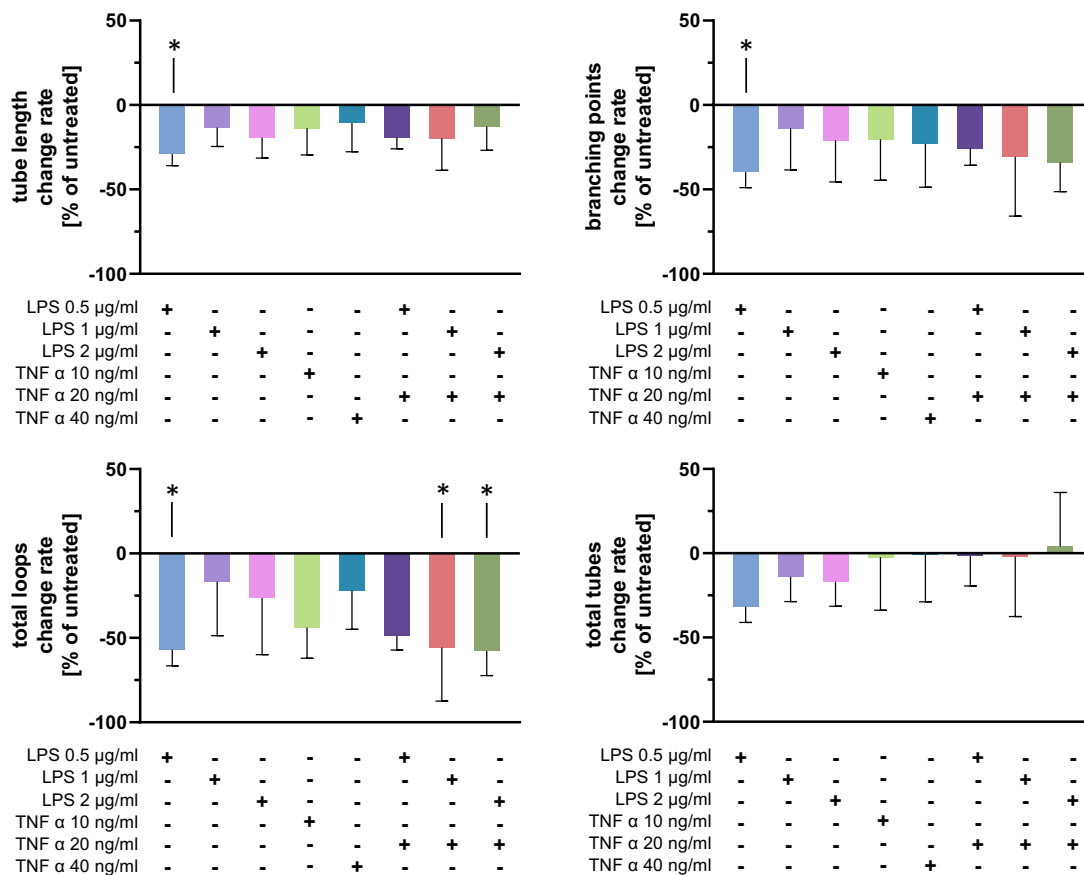
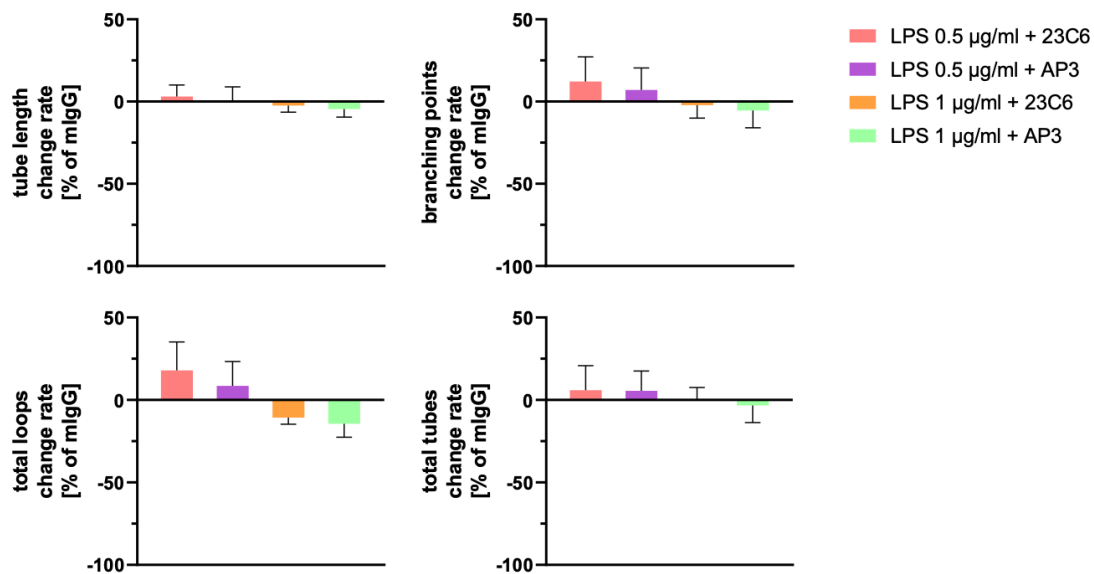


Abbildung 27: **Aufnahmen der durch LPS behandelten Endothelzellen im Tube Formation Assay.** Die linke Aufnahme zeigt die *in vitro* Angiogenese der unbehandelten Zellen, während die rechte Aufnahme die mit LPS (Lipopolysaccharide) (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) behandelten Zellen darstellt ( $t = 4 \text{ h}$ ). 5 x Objektiv

Abbildung 28: **Hemmung der *in vitro* Angiogenese von HUVECs durch Inkubation mit LPS und TNF- $\alpha$  nach 4 Stunden.** Alle Werte spiegeln den Mittelwert von 3 unabhängigen Versuchen ( $\pm$  SD) wider ( $n = 3$ ). Die Analyseparameter der mit LPS und TNF- $\alpha$  behandelten Zellen wurden in Prozent [%] von der unbehandelten Probe (100%) angegeben. Der mögliche Unterschied zwischen einer unbehandelten Probe und einer mit LPS und TNF- $\alpha$  behandelten Probe wurde nicht-parametrisch getestet (Kruskal-Wallis-Test). Dargestellt sind die Änderungsraten (change rate) der behandelten Zellen in Bezug auf die unbehandelten Zellen (Änderungsrate = 0). Die HUVECs wurden mit LPS und TNF- $\alpha$  inkubiert und anschließend auf ihre *in vitro* Angiogenese hin getestet. Die Anzahl der Tube-Length (MW 29 %, SD 6.92 %,  $p = 0.01$ , Kruskal-Wallis-Test), Branching-Points (MW 39.67 %, SD 9.29 %,  $p = 0.0286$ , Kruskal-Wallis-Test) und Total-Loops (MW 57 %, SD 9.54 %,  $p = 0.0155$ , Kruskal-Wallis-Test) wurde durch LPS (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) reduziert. Die Inkubation der Endothelzellen mit TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) und LPS 1  $\mu\text{g/ml}$  (MW 55.67 %, SD 31.79 %,  $p = 0.0251$ , Kruskal-Wallis-Test) sowie 2  $\mu\text{g/ml}$  (MW 57.67 %, SD 14.64 %,  $p = 0.0144$ , Kruskal-Wallis-Test) führte zu einer Abnahme der Total-Loops.



Die Inkubation von mit LPS vorstimulierten Zellen (0.5 µg/ml und 1 µg/ml) mit den Antikörpern 23C6 und AP3 zeigte keinen Unterschied zur Negativkontrolle. Sie führte nicht zu einer verstärkten Hemmung der *in vitro* Angiogenese, die bereits durch LPS ohne Zusatz monoklonaler Antikörper bestand (Abb. 27 und 28). Somit lässt sich die Reduktion der Tube-Length, Branching-Points und Total-Loops (Abb. 28) auf die alleinige Inkubation mit LPS, jedoch nicht auf eine zusätzliche anti-angiogenetische Wirkung der Antikörper schließen (Abb. 29). Zudem kommt es zu keiner Expressionszunahme des  $\alpha v\beta 3$ -Integrins und des  $\beta 3$ -Integrins durch LPS (Abb. 18).



**Abbildung 29: Hemmung der *in vitro* Angiogenese von HUVECs durch Inkubation mit LPS und monoklonalen Antikörpern nach 4 Stunden.** Alle Werte spiegeln den Mittelwert von 3 unabhängigen Versuchen ( $\pm$  SD) wider (n = 3). Die Analyseparameter der mit LPS (Lipopolysaccharide) und Antikörper behandelten Zellen wurden in Prozent [%] von der unbehandelten Probe (100%) angegeben. Der mögliche Unterschied zwischen einer mit Antikörper behandelten Probe im Vergleich zur mit der Negativkontrolle Maus-IgG (mlgG) behandelten Probe wurde nicht-parametrisch getestet (Kruskal-Wallis-Test). Dargestellt sind die Änderungsraten (change rate) der behandelten Zellen in Bezug auf die Kontrolle mlgG (Änderungsrate = 0). Bei mit LPS prä-inkubierten Zellen verminderte keiner der verwendeten Antikörper (23C6 (Anti- $\alpha v\beta 3$ -Antikörper) und AP3 (Anti- $\beta 3$ -Antikörper)) die Zahl der morphologischen Auswertungsparameter (t = 4).

#### 4.9 Das Serum von Patientinnen mit FNAIT und fetaler Hirnblutung hemmt die *in vitro* Angiogenese.

Um den Einfluss humaner Seren von Müttern, deren Feten eine ICH im Rahmen der FNAIT aufwiesen, zu bewerten, wurde jeweils ein Serum einer FNAIT-Patientin mit und ohne fetale Hirnblutung und die entsprechenden Absorbate im Tube Formation Assay getestet. Die Absorption von Anti- $\beta 3$ -Antikörpern mittels  $c\beta 3$ -Monomeren wurde vorab an dem Antikörper AP3 erprobt (Abb. 30). Nach Absorption des Serums erfolgte dann eine Kontrolle bezüglich der Rest-Aktivität von Anti- $\beta 3$ -Antikörpern (Abb. 31). Das Serum der FNAIT-Patientin mit fetaler Hirnblutung reduzierte die Anzahl aller vier Auswerteparameter im Tube Formation Assay (*Tube-Length* MW 46.66 %, SD 6.97 %,  $p = 0.0041$ , Kruskal-Wallis-Test; *Branching-Points* MW 57.66 %, SD 12.40 %,  $p = 0.0116$ , Kruskal-Wallis-Test; *Total-Loops* MW 68.35 %, SD 17.37 %,  $p = 0.0083$ , Kruskal-Wallis-Test; *Total-Tubes* MW 45.82 %, SD 9.72 %,  $p = 0.0092$ , Kruskal-Wallis-Test) (Abb. 32, 33). Das entsprechende Absorbat führte zur Verminderung der Tube-Length (MW 31.78 %, SD 11.85 %,  $p = 0.0387$ , Kruskal-Wallis-Test) und Total-Loops (MW 54.06%, SD 9.06%,  $p = 0.0387$ , Kruskal-Wallis-Test) (Abb. 32). Somit ist die anti-angiogenetische Wirkung des Serums von der Patientin mit fetaler Hirnblutung stärker als die des Absorbates (Abb. 32, 33). Das Serum und Absorbat einer Patientin ohne fetale Hirnblutung veränderten die *in vitro* Angiogenese nicht signifikant (Abb. 32).

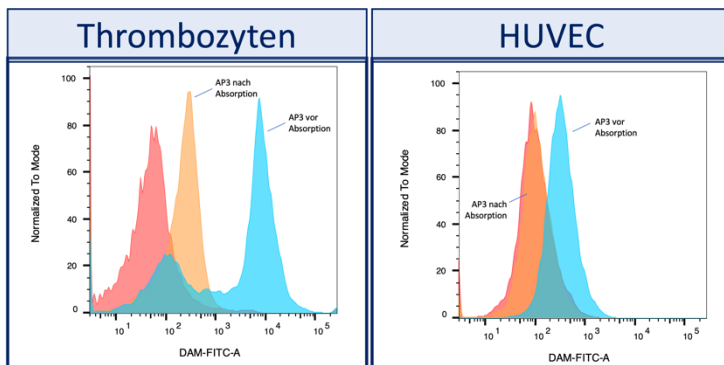


Abbildung 30: **Absorption von AP3 durch  $c\beta 3$  Monomere.** Der Antikörper AP3 (Anti- $\beta 3$ -Antikörper) wurde mit  $c\beta 3$ -Proteinen inkubiert, um die Absorption von Anti- $\beta 3$ -Antikörpern zu untersuchen. Die rote Kurve stellt die Negativkontrolle Maus-IgG (mIgG) dar. Die Histogramme zeigen die

Absorption von AP3 durch die Inkubation mit dem  $c\beta 3$ -Überstand. Darstellung der Bindung an Thrombozyten ( $\alpha IIb\beta 3$ -Integrin) und HUVECs (humane Endothelzellen der Umbilikalvene,  $\alpha v\beta 3$ -Integrin) vor und nach Absorption (blau steht für vor, orange für nach Absorption). Dabei ist nach Absorption ein Shift der Kurve nach links zu beobachten. Erstellt mittels FlowJo 10.8.0.

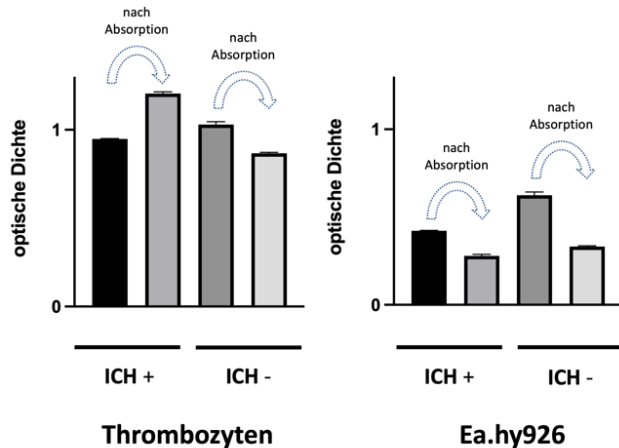


Abbildung 31: **MAIPA/MAIEA vor und nach Absorption der FNAIT Seren mit dem  $c\beta 3$ -Protein.** Das Serum der FNAIT Patientin ohne Hirnblutung (ICH -) und das Serum der FNAIT Patientin mit Hirnblutung (ICH +) wurde mit dem  $c\beta 3$ -Protein inkubiert. Eine Kontrolle der Absorption und der verbliebenen Rest-Aktivität der Seren erfolgte mit dem MAIPA/MAIEA (Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet/Endothelial Antigens Assay). Eine Erhöhung der

optischen Dichte des ICH + Serums nach Absorption an den Thrombozyten ist durch das Prozone-Phänomen zu erklären. (n=1)

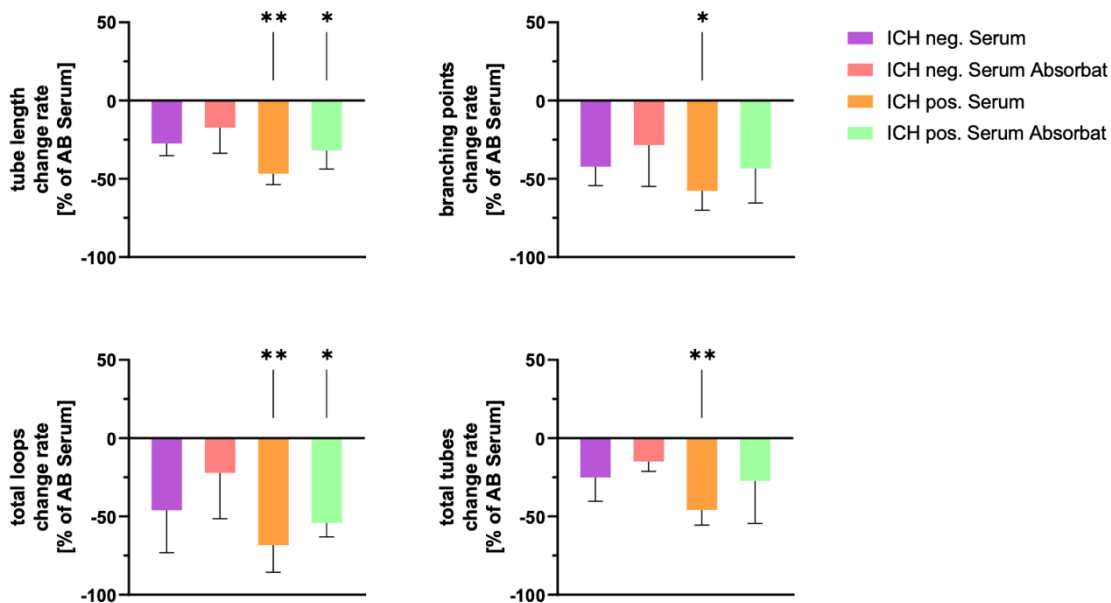
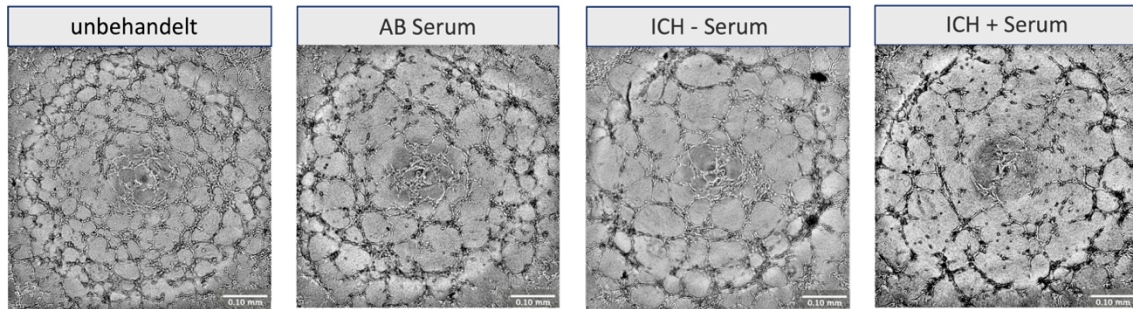


Abbildung 32: **Hemmung der *in vitro* Angiogenese von HUVECs durch Inkubation mit Serum von Patientinnen mit fetaler/neonataler Alloimmunthrombozytopenie nach 4 Stunden.** Alle Werte spiegeln den Mittelwert von 3 unabhängigen Versuchen ( $\pm$  SD) wider (n = 3). Die Analyseparameter der mit Antikörper behandelten Zellen wurden in Prozent [%] von der unbehandelten Probe (100%) angegeben. Der mögliche Unterschied zwischen einer mit Serum/Absorbat behandelten Probe im Vergleich zur Negativkontrolle (mit AB-Serum behandelte Probe) wurde nicht-parametrisch getestet (Kruskal-Wallis-Test). Dargestellt sind die Änderungsraten (change rate) der behandelten Zellen in Bezug auf das AB-Serum (Änderungsrate = 0). Das Serum einer FNAIT-Patientin mit fetaler Hirnblutung (ICH pos. Serum) inhibierte die *in vitro* Angiogenese in allen vier Auswerteparametern (*Tube-Length* MW 46.66 %, SD 6.97 %,  $p = 0.0041$ , Kruskal-Wallis-Test; *Branching-Points* MW 57.66 %, SD 12.40 %,  $p = 0.0116$ , Kruskal-Wallis-Test; *Total-Loops* MW 68.35 %, SD 17.37 %,  $p = 0.0083$ , Kruskal-Wallis-Test; *Total-Tubes* MW 45.82 %, SD 9.72 %,  $p = 0.0092$ , Kruskal-Wallis-Test). Das entsprechende Absorbat führte zur Verkürzung der Tube-Length (MW 31.78 %, SD 11.85 %,  $p = 0.0387$ , Kruskal-Wallis-Test) und Reduktion der Loop-Anzahl (MW 54.06%, SD 9.06%,  $p = 0.0387$ , Kruskal-Wallis-Test) (t=4 h).

Abbildung 33: **Aufnahmen des AB-Serums und Serum von FNAIT Patienten mit und ohne fetale Hirnblutung im Tube Formation Assay.** Die beiden linken Aufnahmen zeigen die unbehandelten Endothelzellen und die Kontrolle mit dem AB-Serum. Die rechten Bilder stellen die *in vitro* Angiogenese durch Inkubation mit dem Serum der FNAIT Patientin ohne fetale Hirnblutung (ICH -) und mit fetaler Hirnblutung (ICH+) dar. Die Inkubation mit dem Serum einer Patientin mit fetaler Hirnblutung (ICH+) zeigte eine schwächere Netzausbildung im Vergleich zu den Kontrollbildern, bedingt durch eine höhere Apoptoserate der Endothelzellen (t = 4 h). 5 x Objektiv



## 5 Diskussion

Die FNAIT führt aufgrund der fetomaternalen HPA-Inkompatibilität zur Bildung von mütterlichen Anti-HPA-Alloantikörpern, die über die Plazenta auf das Kind übertragen werden, an antigenpositive fetale Zellen wie Thrombozyten binden und diese aus dem Kreislauf eliminieren (J. B. Bussel et al., 1997). In 10 % aller FNAIT-Fälle durch mütterliche Immunisierung gegen HPA-1a wurden fetale intrakranielle Blutungen festgestellt (M. M. Kamphuis et al., 2014).

Das  $\beta$ 3-Integrin, auf dem das HPA-1a-Antigen ausgeprägt ist, hat ein breites Expressionsmuster auf verschiedenen Zelltypen und wird auf der Zellmembran in komplexer Form mit einer weiteren Integrinkette ( $\alpha$ IIb- oder  $\alpha$ v-Integrin) exprimiert; die HPA-1a-Epitope werden auf der Blutplättchenoberfläche hauptsächlich durch das  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Integrin (Van Der Weerd et al., 1963) und auf der Endotheloberfläche durch das  $\alpha$ v $\beta$ 3-Integrin exprimiert (Leeksma et al., 1987).

Unsere Gruppe hat drei verschiedene Subtypen von Anti-HPA-1a-Alloantikörpern beschrieben: plättchenspezifische Antikörper, die an  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 binden, endothelspezifische Antikörper, welche mit  $\alpha$ v $\beta$ 3 eine Bindung eingehen, sowie panreaktive Antikörper, die mit dem  $\beta$ 3-Integrin, unabhängig von seinem Partnerprotein, sowohl mit Plättchen als auch mit Endothelzellen reagieren; die Arbeit von Santoso et al. zeigte eine erhöhte endotheliale Reaktivität der Anti-HPA-1a-Seren von Müttern, deren Kinder eine Hirnblutung erlitten, im Vergleich zu den Seren von Müttern ohne fetale Hirnblutung; ihre Ergebnisse implizieren, dass Anti-HPA-1a-Alloantikörper gegen  $\alpha$ v $\beta$ 3 an Endothelzellen binden, Störungen der Gefäßneubildung induzieren und an der Entstehung von fetaler ICH beteiligt sind (Santoso et al., 2016). In einem FNAIT-Tiermodell mit  $\beta$ 3-Knockout-Mäusen haben Yougbaré et al. die Angiogenese-blockierende Wirkung von Anti- $\beta$ 3-Isoantikörpern im Angiogenese-Assay nachgewiesen (Yougbaré et al., 2015).

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst ein Assay zur Untersuchung der anti-angiogenetischen Wirkung von vor allem Anti- $\alpha$ v $\beta$ 3-Antikörpern auf Endothelzellen humaner Umbilikalvenen eingeführt werden. Dafür wurde zunächst der Tube Formation Assay, ein *in vitro* Modell der Angiogenese, in unserer Gruppe etabliert, um die Wirkung von Antikörpern auf humane Endothelzellen während der Gefäßneubildung zu untersuchen. Der Tube Formation Assay stellt eine bekannte, wirksame Methode zur Bewertung potenzieller pro- sowie anti-angiogenetischer Faktoren dar; in der Literatur sind zudem weitere *in vitro* (z.B. Proliferation, Migration) und *in vivo* (z.B. Thoracic Aorta Ring, Corneal Angiogenesis) Testverfahren beschrieben, um die Auswirkung von Faktoren zu bewerten, die die Angiogenese fördern oder hemmen (Stryker et al., 2019).

Die Gefäßbildung wurde im Tube Formation Assay unter Einfluss von Faktoren untersucht, von denen bekannt ist, dass sie am Mechanismus der FNAIT beteiligt sind.

In der vorliegenden Studie wurde die Angiogenese von HUVECs, die von einem Spender isoliert wurden, mit der von gepoolten Zellen verglichen. Es zeigte sich eine geringere Variabilität der Ergebnisse unter Verwendung von Poolzellen (Tab. 11, Abb. 14). Die Untersuchung der *in vitro* Angiogenese zu verschiedenen Zeitpunkten ergab, dass die Tube-Length 4 Stunden nach Zellaussaat am größten war (Abb. 15, 16). Der Zeitpunkt 4 oder auch 6 Stunden nach Aussaat der Zellen eignete sich gut zur Analyse, da die *in vitro* Angiogenese zu diesem Zeitpunkt im Prozess der endothelialen Gefäßneubildung auf die anti-angiogenetische Wirkung eines Antikörpers oder eines Serums hin untersucht werden konnte. Drake et al. zeigten, dass das  $\alpha\beta 3$ -Intergrin nicht auf bereits bestehenden Gefäßen zugänglich ist, sondern im Rahmen der embryonalen Neovaskularisation (Drake et al., 1995).

Da während der Schwangerschaft häufig Anti-HLA-Klasse-I-Antikörper gebildet werden, wurde deren potenzieller Effekt auf die *in vitro* Angiogenese untersucht: Die Analyse der Wirkung von monoklonalen Anti-HLA-Klassel-Antikörpern auf die Angiogenese zeigte einen pro-angiogenetischen Effekt (Abb. 23). Obwohl bekannt ist, dass Anti-HLA-Klassel-Antikörper für die Thrombozyten-Refraktärität nach Transfusion und Allotransplantat-Abstoßung relevant sind, bleibt ihre Rolle in der Schwangerschaft ungewiss (Dahl et al., 2017). Sachs et al. haben gezeigt, dass mütterliche Anti-HLA-Klassel-Antikörper keinen Risikofaktor für die FNAIT darstellen und nicht mit dem Schweregrad der Erkrankung assoziiert sind (Sachs et al., 2020). Die Beobachtungen der vorliegenden Arbeit stützen die Ergebnisse von Eleftheriadis et al., die zeigten, dass durch die Bindung von Antikörpern gegen HLA-Klassel-Antigene die Integrität der Endothelbarriere und die Zellproliferation gefördert wird; dies ist durch die Aktivierung von mTORC1 durch die Anti-HLA-Klassel-Antikörper zu erklären, die wiederum über den FAK-Signalweg (focal adhesion kinase) durch Phosphorylierung von unter anderem Cas und Grb8 (Zhao & Guan, 2011) den Prozess der Zellmigration und -proliferation stimulieren (Eleftheriadis et al., 2021).

Gi18 ist ein monoklonaler Antikörper gegen PECAM-1, welches als junctionales Molekül auf Endothelzellen eine wichtige Rolle in Bezug auf die Zell-Zell-Interaktion und Integrität der Gefäßwand spielt (DeLisser et al., 1994). Die Ergebnisse zeigten eine Hemmung der Anzahl der Total-Loops 6 Stunden nach Zellaussaat mit einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$ , aber nicht mit einer von 40  $\mu\text{g/ml}$  (Abb. 21). Um die Plausibilität dieses Ergebnisses zu klären, sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Obwohl die Hauptwirkung eines Antikörpers durch den Fab-Teil vermittelt wird, werden zahlreiche Effektorfunktionen durch die Bindung des Fc-Teils an den FcγR hervorgerufen (Pyzik et al., 2019). Ein IgG-Antikörper kann durch die Deglykosylierung nicht mehr an den FcγR binden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten eine Aufhebung der Angiogenese-Hemmung durch Anti-αvβ3-Antikörper nach einer Inkubation der Endothelzellen mit Anti-FcγRII-Antikörpern, nicht aber mit Antikörpern gegen FcγRI, FcγRIIa und FcγRIII (Abb. 26). Dies lässt vermuten, dass die *in vitro* Angiogenese-Hemmung der Endothelzellen durch Anti-αvβ3-Antikörper, FcγRII abhängig sein könnte. Bayat et al. konnten eine leichte Expression von FcγRI und II auf den Zelloberflächen von HPMECs (Human pulmonary microvascular endothelial cells) nachweisen; die Blockade von FcγRI/II/IIIa durch deglykosylierte monoklonale Antikörper gegen FcγRI/II/IIIa führte zu einer signifikanten Reduktion der ROS (Reaktive Sauerstoffspezies)-Produktion in einem *in vitro* TRALI (Transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz) Modell (Bayat et al., 2021). Der Nachweis von FcγRIIb erfolgte unter anderem auf Endothelzellen der Plazenta (Mishima et al., 2007) sowie Endothelzellen der Aorta und des Herzens, weshalb dieser in der Forschung im Fokus von der Entstehung kardiovaskulärer Systemerkrankungen steht (Mineo et al., 2005; Peng et al., 2019). Da die vorliegenden Versuchsergebnisse beschreiben, dass die *in vitro* Angiogenese-Hemmung der Endothelzellen durch Anti-αvβ3-Antikörper, FcγRII, aber nicht FcγRIIa, abhängig sein könnten (Abb. 26), wäre eine Einflussnahme bzw. Wirkung über den FcγRIIb denkbar, wofür weitere Untersuchungen erforderlich sind. Zudem sollte die Versuchsreihe unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers LM609 (stärkere Hemmung der Endothelzellen, Abb. 19, 21) anstelle des Antikörpers 23C6 wiederholt werden; in der vorliegenden Studie wurde der Antikörper 23C6 (unter anderem aufgrund von Lieferengpässen von LM609 während der Corona-Pandemie) bevorzugt. Bisher wurde beschrieben, dass die Bindung des Fc-Teils humaner Immunglobuline an den FcγR von Monozyten zur Ausschüttung von sFlt-1 führte; die Inkubation des IgG-stimulierten Monozyten-Überstandes mit HUVECs im Tube Formation Assay sorgte für eine Inhibition der *in vitro* Angiogenese durch Blockierung von VEGFR2 (Justiniano et al., 2013); durch die Inkubation der HUVECs mit IgG-stimuliertem Monozyten-Überstand und anti-Flt-1, wurde die Angioinhibition wiederum aufgehoben. Bogdanovich et al. zeigten in einer Versuchsreihe mit Mäusen ohne FcγRI, dass die Angiogenese durch Antikörper wie Bevacizumab (Anti-VEGF-Antikörper) im Vergleich zu Mäusen mit FcγRI auf den Makrophagen, nicht gehemmt wird, da die Makrophagen weniger stark stimuliert werden (Bogdanovich et al., 2016); zudem erfolgte keine Hemmung der Angiogenese durch deglykosyliertes Bevacizumab in Wildtyp-Mäusen. Die Autoren vermuten eine Verstärkung der Angiogenese-Hemmung durch die

Bindung des Fc-Teils eines Antikörpers an den FcγR von Monozyten/Makrophagen. In der vorliegenden Arbeit basiert die Versuchsreihe auf einem monozellulären Modell; die Antikörper binden mit dem Fab-Teil an die untersuchten Integrin-Domänen und mit dem Fc-Teil die FcγR der Endothelzellen. Xu et al. nutzen ein murines Anti-CD36-FNAIT-Modell und zeigten, dass die Injektion von deglykosylierten Anti-CD36-Antikörpern in Feten von CD36-immunisierten Mäusen die fetale Mortalität reduzierte; maternale Anti-CD36-Antikörper sind innerhalb der asiatischen und afrikanischen Population ein häufiger Verursacher der FNAIT; der Tube Formation Assay wurde mit plazentaren Endothelzellen durchgeführt und die *in vitro* Angiogenese konnte durch den monoklonalen Antikörper 32-106 (Anti-CD36-Antikörper) inhibiert werden; die Inkubation der Zellen mit deglykosyliertem Antikörper 32-106 allein oder zusammen mit einem monoklonalen Anti-FcγRIIa-Antikörper im Tube Formation Assay führte zu keiner Inhibition der *in vitro* Angiogenese (Xu, Chen, et al., 2021). Sie zeigten in Ihrer Arbeit nicht nur den Einfluss des FcγRIIa auf die *in vitro* Angiogenese, sondern erklärten zum einen, dass therapeutisch eingesetzte Antikörper zur Verdrängung maternalen Antikörper, deglykosyliert werden sollten, damit eine Rekrutierung anderer Immunzellen und entzündliche Nebenreaktionen ausbleiben (Xu, Chen, et al., 2021). Zum anderen legten Sie nahe, dass der Einsatz eines humanisierten deglykosylierten Antikörpers gegen CD36 im Vergleich zur herkömmlichen IVIG-Therapie mit Vorteilen eines späteren Therapiebeginns und dem Einsatz einer niedrigeren therapeutischen Dosis einhergeht.

Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um den genauen pathophysiologischen Einfluss des FcγRII der Endothelzelle auf die Angiogenese-Hemmung zu klären und ob dieser isoliert oder in Zusammenhang mit dem αβ3-Integrin steht. Ferner lassen die oben referierten Experimente anderer Arbeitsgruppen vermuten, dass die untersuchten Antikörper *in vivo* auch direkt oder indirekt mit Monozyten interagieren und Monozyten eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Angiogenese-Hemmung spielen können.

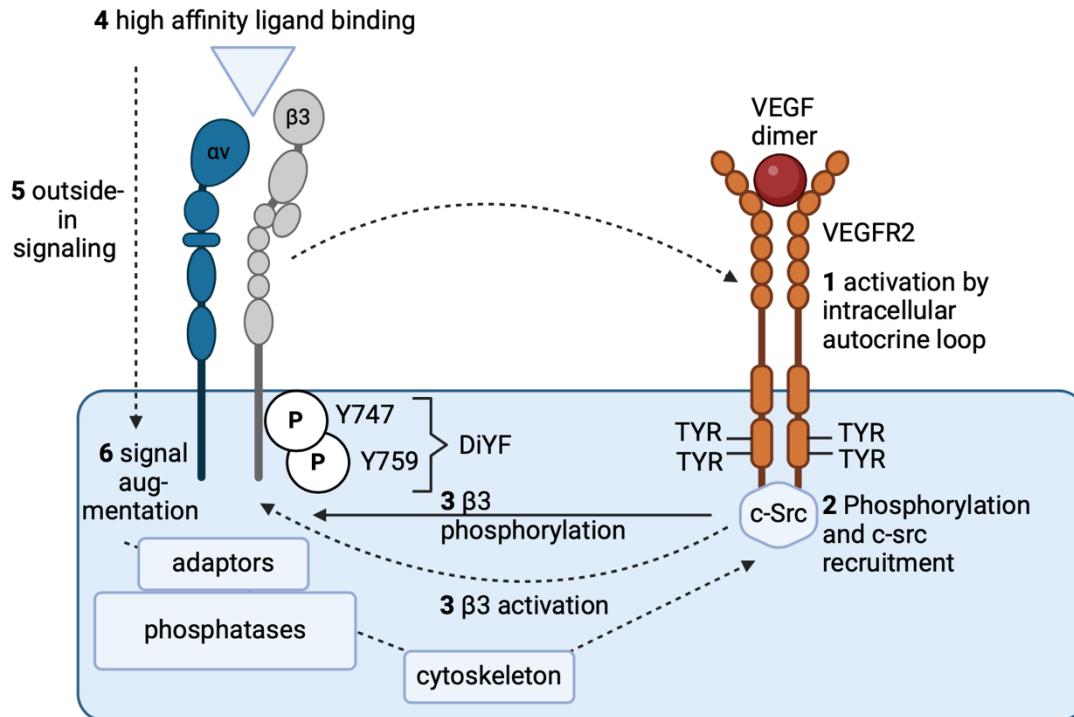
Die Blockade des FcRn stellt einen weiteren perspektivischen Therapieansatz der FNAIT dar, da der Transport maternalen Antikörper über die Plazenta in den fetalen Kreislauf unterbunden wird (Chen et al., 2010); gleichzeitig wird jedoch auch die Leihimmunität, die von der Mutter auf das Kind übertragen wird, eingeschränkt. Auch die Endothelzellen verfügen über FcRn, welche Antikörper innerhalb der Zelle binden und diese vor einem lysosomalen Abbau schützen; die Antikörper können wieder aus der Zelle freigesetzt werden (Antikörper-Recycling) und erreichen dadurch eine höhere Halbwertszeit (Ward et al., 2003). Durch die therapeutische Blockade des FcRn kann das Recycling der Antikörper ausbleiben, was zur Abnahme pathogener, maternalen

Antikörper im fetalen System führt (Pyzik et al., 2023). Dadurch könnte der Einfluss der Antikörper auf die fetalen Gefäße reduziert und Hirnblutungen potenziell verhindert werden. In der klinischen Entwicklung einer Anti-FcRn-Therapie wäre ein entscheidender Faktor, diejenigen Schwangeren mit Anti-HPA-1a-Antikörpern zu identifizieren, die ein hohes Risiko für fetale ICH aufweisen (<10%; siehe oben).

In der vorliegenden Arbeit wurde auch der Einfluss von monoklonalen Anti- $\alpha\beta 3$ - und  $\beta 3$ -Antikörpern im Tube Formation Assay an mit LPS/TNF- $\alpha$  inkubierten Endothelzellen untersucht. LPS ist ein Bestandteil der Wand gramnegativer Bakterien und TNF- $\alpha$  ist ein Zytokin des Immunsystems; beide wirken pro-inflammatorisch. Es sollte überprüft werden, ob die bereits untersuchte Angiogenese-Blockade (Abb. 21) durch eine vorherige Inkubation der Endothelzellen mit pro-inflammatorischen Mediatoren verändert wird. Durch dieses *in vitro* Modell sollte beobachtet werden, ob eine fetale Hirnblutung im Rahmen der FNAIT durch einen Infekt der Mutter beeinflusst werden könnte. Wie der inflammatorische Zustand der Schwangeren den Schweregrad der FNAIT und die fetale Hirnblutung beeinflusst, ist noch unbekannt. Die Experimente zeigten eine Hemmung der *in vitro* Angiogenese durch eine Inkubation der Zellen mit LPS allein oder in Kombination von LPS mit TNF- $\alpha$  unabhängig von der Zugabe eines monoklonalen Anti- $\alpha\beta 3$ - (23C6) oder - $\beta 3$ -Antikörpers (AP3) (Abb. 27, 28, 29). Jiangxue et al. beschrieben, dass die Rate intraventrikulärer Blutungen des Kindes nach Inflammation steigt, da die Untersuchung von Nabelschnurblut schwangerer Frauen mit Amnionitis im Vergleich zu dem Nabelschnurblut von Schwangeren ohne Amnionitis niedrigere VEGF-Werte ergaben; in einem Tiermodell mit Ratten wurden nach LPS-Exposition ebenso niedrigere Werte von VEGF ermittelt, was durch eine verminderte Aktivierung des VEGFR zu einer Dichteabnahme der Hirngefäße führte (Jiangxue et al., 2023). Durch die geringere Stimulation des VEGFR kommt es auch zu einer geringeren Aktivierung des  $\alpha\beta 3$ -Integrin und folglich wird die Zellmigration, -adhäsion und Angiogenese eingeschränkt (siehe unten) (Abb. 34) (Mahabeleshwar et al., 2007).

Im *in vitro* Angiogenesemodell wurden gepoolte HUVECs mit monoklonalen Antikörpern gegen das  $\alpha\beta 3$ - und  $\beta 3$ -Integrin sowie gegen den  $\alpha\beta 3$ -Komplex in zwei verschiedenen Konzentrationen (10 und 40  $\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert. Die Angiogenese wurde 4, 6 und 8 Stunden nach Inkubationsbeginn anhand der Ausprägung morphologischer Parameter bewertet. Die Bild-Analyse zeigte eine Angiogenese-blockierende Wirkung der monoklonalen Antikörper LM609 und 23C6, die gegen das  $\alpha\beta 3$ -Integrin gerichtet sind (t=6h, Branching-Points, Abb. 21). Die Hemmung der Angiogenese durch monoklonale

Antikörper gegen das  $\alpha\beta 3$ -Integrin wurde bereits in unterschiedlichen Modellen (chorioallantoismembran (CAM) (Brooks et al., 1994), quail embryo (Drake et al., 1995), rabbit cornea (Friedlander et al., 1995)) nachgewiesen. Brooks et al. zeigten, dass eine mit dem Antikörper LM609 besetzte Chorioallantoismembran eine deutliche Einschränkung der Angiogenese und eine hohe Zellapoptose aufweist (Brooks et al., 1995). Die anti-angiogenetische Wirkung des Antikörpers LM609 stellte einen therapeutischen Ansatz für Neoplasien und andere durch unkontrollierte Angiogenese gekennzeichnete Erkrankungen dar (Brooks et al., 1994). Klinische Studien über den Einsatz vom Antikörper LM609 bei der rheumatoiden Arthritis wiesen jedoch zu starke Nebenwirkungen auf (Lainer-Carr & Brahn, 2007). Aktuell stützt sich die Forschung der Krebstherapie vor allem auf die direkte Blockade des VEGF-Rezeptors (VEGFR), welcher mithilfe von Medikamenten wie beispielsweise Bevacizumab (Anti-VEGF-Antikörper) inhibiert wird; dies macht man sich vor allem bei der Darmkrebsbehandlung in Kombination mit Chemotherapeutika zunutze (Tsai et al., 2023). Das  $\alpha\beta 3$ -Integrin und der VEGFR2 beeinflussen sich im Rahmen der Angiogenese und der Zelladhäsion sowie -migration von Endothelzellen gegenseitig; die Blockade des  $\alpha\beta 3$ -Integrins durch Antikörper stört die wechselseitige Kooperation mit dem VEGFR2 (Mahabeleshwar et al., 2007) und kann vom bisherigen Theorieansatz wie folgt erklärt werden:



Created in BioRender.com bio

Abbildung 34: **Mechanismen des Crosstalks zwischen  $\alpha\beta_3$  und VEGFR2.** VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2) kann durch die VEGF (vascular endothelial growth factor) Dimerbindung über intrazelluläre, autokrine Prozesse aktiviert werden (1). Dies führt wiederum durch c-src Rekrutierung und Phosphorylierung des  $\beta_3$ -Integrin an Tyr747 und Tyr759 sowohl zur Komplexbildung zwischen dem  $\beta_3$ -Integrin und dem VEGFR2 als auch zur Aktivierung und somit verstärkten Bindungsaffinität eines Liganden zum  $\alpha\beta_3$ -Integrin (2), (3), (4). Die c-src Rekrutierung sorgt durch die Aktivierung des  $\beta_3$ -Integrins außerdem für die Adhäsion und Migration der Endothelzellen und setzt Prozesse der Angiogenese in Gang. Die Bindung an das  $\alpha\beta_3$ -Integrin durch Proteine der Extrazellulärmatix wie Vitronectin löst ein outside-in signaling aus und aktiviert wiederum den VEGFR2 Rezeptor (5), (6). So stehen das  $\alpha\beta_3$ -Integrin und VEGFR2 in Wechselwirkung, die sowohl durch die Bindung eines Liganden an das  $\alpha\beta_3$ -Integrin als auch durch die Bindung des VEGF an VEGFR2 beeinflusst wird. Die vollständige Phosphorylierung des VEGFR2 führt über FAK (focal adhesion kinase) zur Endothelzelladhäsion, -migration und Angiogenese (Mahabeleshwar et al., 2007; Somanath et al., 2009). Abbildung modifiziert nach Somanath et al. 2009; erstellt mittels BioRender.com

Auf Zellen mit Angiogenese-Aktivität wird das  $\alpha\beta_3$ -Integrin hochreguliert; Inhibitoren des  $\alpha\beta_3$ -Integrin führen vor allem zur Apoptose der Endothelzellen, die sich im Prozess der Neovaskularisation befinden, beeinträchtigen jedoch nicht die bereits bestehenden Gefäße (Drake et al., 1995); diese Erkenntnis korreliert mit den Analyse-Zeitpunkten 4 und auch 6 Stunden nach Aussaat der Zellen (siehe oben). Acht Stunden nach Aussaat der Endothelzellen auf das Gel wurde das Angiogenese-Netz durch die Inkubation mit monoklonalen Antikörpern kaum noch beeinflusst (Abb. 22). In Abbildung 16 wird deutlich, dass sich das Angiogenese-Netz nach 8, 12 und 16 Stunden bildmorphologisch

nur noch wenig verändert. Unter dem Aspekt, dass das Gehirn sehr gut durchblutet ist und ein angiogenetisch aktives Organ während der Fetogenese darstellt, wäre es denkbar, dass Anti-HPA-1a-Antikörper, die eine hohe Affinität für den  $\alpha\beta3$ -Integrinkomplex aufweisen, das  $\alpha\beta3$ -Integrin im Rahmen der Gefäßneubildung blockieren, dadurch auch die Wechselwirkung sowie Aktivierung von VEGFR2 reduziert wird und die Zellen insgesamt in ihrer Migration, Adhäsion an die extrazelluläre Matrix und Angiogenese eingeschränkt werden (Abb. 34); *in vivo* könnte somit durch Anti-HPA-1a-Antikörper die endotheliale Integrität und Barriere intrakranieller Gefäße gestört werden und der Fetus durch den Austritt von Blutbestandteilen eine hämorrhagische Blutung erleiden. Diese Hypothese lässt sich mit monoklonalen Antikörpern *in vitro* nicht überprüfen, da bisher kein monoklonaler Anti-HPA-1a-Antikörper mit Spezifität für den  $\alpha\beta3$ -Komplex (Antikörpersubtyp III) beschrieben wurde. Die eingesetzten humanisierten (SZ21) oder humanen (B2G1) Anti-HPA-1a-Antikörper repräsentieren den Subtyp I (SZ21) bzw. II (B2G1) gegen das  $\beta3$ -Integrin. Nur SZ21 weist dabei in einer hohen Konzentration von 40  $\mu\text{g/ml}$  eine Hemmung im Tube Formation Assay auf (Abb. 21). Dardik et al. zeigten in ihren Versuchen, dass Anti-HPA-1a-Seren zu höheren Apoptoseraten und Permeabilitätssteigerung der Endothelzellen des Gehirns führen; dieser Effekt wurde dann durch eine Behandlung mit dem Antikörper SZ21 aufgehoben (Dardik & Salomon, 2021). Bakchoul et al. stellten fest, dass der Antikörper SZ21 sowohl im nativen als auch im deglykosylierten Zustand, die Bindung von maternalen Anti-HPA-1a-Antikörpern an fetale Blutplättchen verhindert und somit fetale Thrombozytopenien reduziert (Bakchoul et al., 2013). Die Anwendung von B2G1,  $\Delta\text{B2G1}$  und weiteren Anti-HPA-1a-Antikörpern spielt im Rahmen der FNAIT allgemein bei der therapeutisch-prophylaktischen Verdrängung maternaler Alloantikörper im fetalen Blutsystem eine Rolle (Ghevaert et al., 2013). Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu überprüfen, ob der Hemmungs-Effekt von SZ21 im Tube Formation Assay wiederholt auftritt und ob der Effekt von der hohen Konzentration abhängig ist. Zudem sollte untersucht werden, wie sich der Antikörper deglykosyliert auf den Assay auswirkt. Der Antikörper P2W7 (Anti- $\alpha\text{v}$ -Antikörper) wirkte ebenso in einer Konzentration von 40  $\mu\text{g/ml}$  hemmend auf den Tube Formation Assay (Abb. 21, 22). Kamata et al. erklärten, dass der monoklonale Antikörper P2W7 durch seine Bindung an das Bein des  $\alpha\beta3$ -Integrins (C-terminal leg region) vor allem die Streckung des Integrins verhindert und es dadurch inaktiv bleibt (Abb. 4); zudem nehmen sie durch ihre Versuchsergebnisse an, dass der Antikörper 23C6 und LM609 im Gegensatz zu P2W7 eher am  $\beta$ -Propeller des Integrins bindet (Kamata et al., 2013); dies stützt die Auffassung, dass die beiden Antikörper nicht die Streckung des  $\alpha\beta3$ -Integrins beeinflussen, sondern vor allem die

Ligandenbindung an das Integrin und dadurch den Prozess des Outside-In Signaling sowie die Wechselwirkung mit VEGFR2 beeinträchtigen (Abb. 34).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten insbesondere einen hemmenden Einfluss auf die Zahl der Branching-Points (Abb. 19, 21) und auf die Zahl der Total-Loops (Abb. 21, 22, 28, 32). Beim Vergleich der Auswerteparameter des Assays, liefern Branching-Points eher Ergebnisse über das Verzweigungs- und Sprossungspotential des Gefäßnetzwerkes sowie über die Fähigkeit der Endothelzellorganisation; Total-Loops beschreiben die Anzahl der geschlossenen Schleifen und geben somit Informationen über die Koordination und Menge der Gefäßbildung innerhalb des Netzes; die Tube-Length beschreibt vor allem die Länge der Gesamtgefäße und Total-Tubes stellen die Streckenanzahl zwischen zwei Branching-Points oder einem Verzweigungspunkt mit einem losen Ende dar (Tab. 7, Abb. 10). Staton et al. betonten, dass Angiogenese-Parameter insgesamt spezifisch und abhängig von der zu untersuchenden Fragestellung sind, da die Einflussfaktoren auf unterschiedliche Eigenschaften der Gefäßbildung wirken (Staton et al., 2009). Bei der sogenannten *sprouting angiogenesis* spielen die aktivierten Endothelzellen, die *tip und stalk cells* eine wichtige Rolle; die *tip cells* liegen am Ende einer Gefäßsprosse und geben als leitende Position den Weg für die Gefäßneubildung an, sie folgen dabei einem VEGF-Gradienten (Gerhardt et al., 2003) (Abb. 5). Die Endothelzelle mit der höchsten VEGFR-Expression wird zur führenden *tip cell*; durch VEGFR wird mehr DII4 produziert, was über Notch die VEGFR-Expression der benachbarten *tip und stalk cells* reduziert (Holderfield & Hughes, 2008). Die *stalk cells* befinden sich hinter den *tip cells* und besitzen die Aufgabe der führenden *tip cell* streng zu folgen, zu proliferieren und die Sprosse der Angiogenese zu verlängern; die Proliferation der *stalk cells* richtet sich dabei nach der Höhe der VEGF-Konzentration (Gerhardt et al., 2003). Durch VEGF formieren die *tip cells* Filopodien, die mit den Filopodien weiterer *tip cells* eine Brücke bilden; die *stalk cells* produzieren unter dem Einfluss von VEGF das Gefäßlumen, eine Basalmembran und treten mit Perizyten in Kontakt (Bentley et al., 2009). Es wird angenommen, dass die *tip cells* durch ihre *tip-to-tip* oder *tip-to-stalk* Anastomosen Schleifen (loops) und durch die Positionierung weiterer *tip cells* an ihrer Spitze Verzweigungspunkte (branchings) innerhalb des Angiogenese-Netzes bilden (Pillay et al., 2018). Unter der Auffassung, dass vor allem die *tip cells* mit ihrer führenden VEGFR-Expression (siehe oben) und somit stärkeren Wechselwirkung und Aktivierung des  $\alpha\beta 3$ -Integrins (Abb. 34) durch den Einsatz monoklonaler Antikörper gegen  $\alpha\beta 3$  in ihrer Funktion gehemmt werden, wäre in der Theorie zu erklären, warum gerade die Anzahl der Branching-Points und Total-Loops im Tube Formation Assay reduziert wird. Für die Auswertung einer anti-angiogenetischen Wirkung auf die *tip cells* stellt sich der Parameter Total-Loops im Tube Formation Assay

als sensitiv dar (Abb. 21, 32), weist jedoch auch eine hohe Variation und Standardabweichung der Werte auf (siehe Tab. 11 CV [%] Total-Loops, Abb. 14). Unter Beobachtung der Abb. 20, 27 und 33 in denen eine Hemmung des Angiogenese-Netzes im Assay festgestellt wurde, wird deutlich, dass bildmorphologisch oftmals Verzweigungen im Netz erhalten bleiben (Branching-Points) (Abb. 20, 27, 33), wohingegen bei fehlender Fusion der *tip cells* und durch Lücken innerhalb der Zellbrücken, die Bildung und Erkennung eines Gefäßlumens ausbleibt (Total-Loops) und das Angiogenese-Netz direkt bildmorphologisch als weitmaschig und *im Entwicklungsprozess gehemmt* auffällt (Abb. 20, 27, 33). Um festzustellen, ob die anti-angiogenetische Wirkung durch vor allem monoklonale Antikörper das Verzweigungspotential der *tip cells* stärker beeinflusst als die Schleifenbildung der Zellen, sind weitere Untersuchungen erforderlich. Die *stalk cells* besitzen eine geringere VEGFR-Expression als die *tip cells*, die durch die höhere VEGFR-Expression die Rolle der führenden Zelle übernehmen (Holderfield & Hughes, 2008), und könnten somit weniger durch unter anderem monoklonale Antikörper gegen  $\alpha\beta 3$  beeinflusst werden, da die  $\alpha\beta 3$ -Aktivierung und -Expression insgesamt schwächer ausfällt. Da die Funktion der *stalk cells* vor allem auf der Proliferation und Sprossenverlängerung basiert, wird insgesamt vor allem die Zahl der Tube-Length (Abb. 19, 21, 22, 23) und zweitrangig die der Total-Tubes (Abb. 22, 23, 28) weniger beeinflusst; die Auswertungen der beiden Parameter beruhen im Wesentlichen auf einer Streckenermittlung des Angiogenese-Netzwerks (Abb. 10).

Frühere Daten zeigten einen anti-angiogenetischen Effekt der Seren von Schwangeren mit FNAIT und fetaler/neonataler ICH (Santoso et al., 2016). Auch in der vorliegenden Arbeit führt die Inkubation der Endothelzellen mit einem Serum von einem FNAIT-Fall mit ICH, aber nicht mit einem Serum vom FNAIT-Fall ohne ICH, zu einer Blockade der *in vitro* Angiogenese (Abb. 32, 33). Die Untersuchung einer Vielzahl unterschiedlicher Patientenserum wäre erforderlich, um den Tube Formation Assay als potenzielles Diagnostikum für die Vorhersage von fetaler Hirnblutung im Rahmen der FNAIT zu validieren. Der MAIPA/MAIEA der Seren, der eingesetzt wurde, um die Aktivität der Anti- $\beta 3$ -Antikörper der Seren nach Absorption zu ermitteln und die Reaktivität der Seren vor und nach Absorption mit Thrombozyten und Endothelzellen zu untersuchen, konnte aufgrund der limitierten Menge der Seren nicht repliziert werden, weshalb die Aussagekraft des Experiments eingeschränkt ist (Abb. 31).

Zusammenfassend stellt der Tube Formation Assay ein Testverfahren dar, in dem pro- sowie anti-angiogenetische Wirkungen von Antikörpern überprüft werden können. Vor

allein die Hemmung und Reduktion der Parameter Branching-Points und Total-Loops im Tube Formation Assay lässt den Rückschluss zu, dass der Fokus auf der Untersuchung der Angiogenese-Sprossen liegen sollte. Der Sprouting Assay ist ein weiteres Angiogenese-Modell; in diesem werden Sphäroide in eine Kollagenmatrix eingebettet und bilden Sprossen aus (Tetzlaff & Fischer, 2018). Der Assay wird unter anderem im Hinblick auf die Parameter *Länge und Endpunkt der Zellsprosse* untersucht; es könnte sich somit insgesamt besser zur Untersuchung der *tip cells* eignen. Der Sprouting Assay könnte, verglichen mit dem hier untersuchten Tube Formation Assay, ein sensitiveres Modell für die hemmende Wirkung von monoklonalen Antikörpern und Seren auf die Angiogenese darstellen. Da der Sprouting-Assay im Vergleich zum 2D-Tube Formation Assay den Vorteil eines 3D-Modelles aufweist, spiegeln die Ergebnisse die *in vivo* Verhältnisse eines Gefäßsystems besser wider (Nowak-Sliwinska et al., 2018). Ein Sphäroid mit der entsprechenden Sprossenbildung wird genauer untersucht und nicht die Netzwerkbildung in seiner Gesamtheit. Die eingesetzte Analyse-Software WimTube ist ein objektives Tool, welches speziell für mikroskopische Bildaufnahmen programmiert wurde und wertet die Bilder schnell und informativ aus. Für den Sprouting Assay gibt es ebenfalls objektive und automatisierte Auswertungsprogramme wie WimSprout. Um zu evaluieren, ob sich der Sprouting Assay besser als Untersuchungsmodell für die FNAIT Fälle mit Hirnblutungen als der Tube Formation Assay eignet, sind zukünftig weitere Experimente notwendig. Die Sphäroide sollten im Sprouting Assay durch Inkubation mit monoklonalen Antikörpern gegen das  $\alpha\beta 3$ -Integrin und dem Serum von Patientinnen mit FNAIT untersucht werden.

## 6 Zusammenfassung

Die Auslöser der fetalen und neonatalen Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT) sind mütterliche Antikörper, die gegen kindliche Thrombozyten-Antigene (*Human Platelet Antigen*, HPA) gerichtet sind; das HPA-positive Antigen ererbt das Kind väterlicherseits. Am häufigsten werden Anti-HPA-1a-Antikörper nachgewiesen, die über die Plazenta auf das Kind übertragen werden, an HPA-1a-positive fetale Zellen wie Thrombozyten binden und diese aus dem Kreislauf eliminieren; in circa 10 % der Fälle werden fetale intrakranielle Blutungen (ICH) ausgelöst. Bisher ist die Bestimmung des fetalen Hirnblutungsrisikos im Rahmen eines Screenings in der Mutterschaftsvorsorge nicht möglich. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob die Hemmung der *in vitro* Angiogenese durch Anti-HPA-1a-Antikörper ein geeignetes Untersuchungsverfahren wäre, um das Risiko der fetalen ICH einschätzen zu können. Dafür wurde zunächst der Tube Formation Assay, ein *in vitro* Modell der endothelialen Gefäßneubildung, etabliert. Mit dem gewählten Testsystem wurden Fragestellungen zum besseren Verständnis des Pathomechanismus der Hirnblutungen untersucht: Wie wirken sich monoklonale Anti- $\alpha\beta 3$ - und - $\beta 3$ -Antikörper *in vitro* auf die endotheliale Gefäßneubildung aus? Besteht im Rahmen der anti-angiogenetischen Wirkung eine Abhängigkeit in Bezug auf den Fc $\gamma$ -Rezeptor? Wird die *in vitro* Angiogenese durch Inflammationstrigger wie Lipopolysaccharide oder Tumornekrosefaktor- $\alpha$  beeinflusst? Entsteht eine Hemmung der Tube Formation durch humane FNAIT Seren und Absorbate?

Außerdem sollte der Tube Formation Assay als potenziell prädiktiver Assay für FNAIT-Fälle mit fetaler Hirnblutung validiert werden. Die Ergebnisse zeigten, dass vor allem monoklonale Anti- $\alpha\beta 3$ -Antikörper die *in vitro* Gefäßneubildung inhibieren und der Fc $\gamma$ -Rezeptor Typ II zur anti-angiogenetischen Wirkung von monoklonalen Anti- $\alpha\beta 3$ -Antikörpern beiträgt. Zudem wurde die Tube Formation durch inflammatorische Trigger und durch ein Serum sowie Absorbat von einem FNAIT-Fall mit fetaler Hirnblutung beeinflusst. Anti-angiogenetische Faktoren reduzierten vor allem die Zahl der Branching-Points (Verzweigungspunkte der Gefäß-Netzausbildung) sowie die Zahl der Total-Loops (Schleifenbildung der Endothelzellen) im Tube Formation Assay. Da die Annahme besteht, dass die *tip cells* (Endzelle einer Angiogenese-Sprosse) im Wesentlichen an der Bildung dieser beiden Parameter beteiligt sind, sollte der Fokus zukünftiger Untersuchungen auf den Angiogenese-Sprossen liegen, die aus *stalk cells* (für die Proliferation) sowie *tip cells* (führende Zelle an der Spitze) bestehen. Dafür könnte sich ein dreidimensionaler Sprouting Assay eignen. Das Testverfahren könnte weitere Pathomechanismen der Hirnblutungen aufklären und die Entwicklung eines zukünftig prädiktiven Assays für fetale Hirnblutungen im Rahmen der FNAIT fördern.

## 7 Summary

Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia (FNAIT) is caused by maternal antibodies against fetal platelet antigens (Human Platelet Antigen, HPA), which the child has inherited from the father. Mostly anti-HPA-1a antibodies are detected; they are transferred to the child through the placenta, bind to HPA-1a-positive fetal cells such as platelets and eliminate them from the circulation; in approximately 10 % of all FNAIT cases, maternal immunization against HPA-1a causes fetal intracranial hemorrhage (ICH). Until now it is not possible to determine the fetal cerebral hemorrhage risk by screening in maternity care. The aim of the present work is to investigate whether the inhibition of *in vitro* angiogenesis by anti-HPA-1a-antibodies would be a suitable examination method to assess the risk of fetal ICH. For this purpose, the tube formation assay, an *in vitro* model of endothelial vessel formation, was established. The chosen test system was used to investigate questions for a better understanding of the pathomechanism of cerebral hemorrhages: How do monoclonal anti- $\alpha\beta 3$  and  $\beta 3$ -antibodies affect endothelial new vessel formation *in vitro*? Does the Fc $\gamma$  receptor contribute to the anti-angiogenic effect? Is the process of *in vitro* angiogenesis affected by inflammatory triggers such as lipopolysaccharides or tumor necrosis factor- $\alpha$ ? Do human FNAIT sera and absorbates show an inhibition of tube formation?

In addition, through the examinations the tube formation assay should be validated as a potential predictive assay for FNAIT cases with fetal cerebral hemorrhage. The results showed that monoclonal anti- $\alpha\beta 3$ -antibodies inhibit tube formation *in vitro* and that the Fc $\gamma$ -receptor type II contributes to the anti-angiogenic effect of monoclonal anti- $\alpha\beta 3$  antibodies. Furthermore, tube formation was influenced by inflammatory triggers and a serum/absorbate from a FNAIT case with fetal cerebral hemorrhage. Anti-angiogenic factors particularly reduced the number of the parameters branching points and total loops in the tube formation assay throughout the investigations. Since it is assumed that the tip cells (end cell of an angiogenesis sprout) are essentially involved in the formation of these two parameters, the focus of future investigations should be based on the angiogenesis sprout, which consists of stalk cells (for proliferation) and tip cells (leading cell at the top). A 3D sprouting assay could be suitable for that. The test procedure could elucidate further understanding of the pathomechanism of cerebral hemorrhages and promote the development of a future predictive assay for fetal cerebral hemorrhage in the context of FNAIT.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

Ampho. B	Amphotericin B
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CV	Variationskoeffizient
deg.	deglykosyliert
dest.	destilliert
DPBS	Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline
EBM-2	Endothelial Cell Growth Basal Medium-2
EGM-2	Endothelial Cell Growth Basal Medium-2 Supplements and Growth Factors
FBS	Fetales bovines Serum
FcRn	Neonataler Fc-Rezeptor
FcγR	Fcγ Rezeptor
FNAIT	fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie
g	gramm
h	Stunde
HBSS	Hanks balanced salt solution
HCl	Salzsäure
HEK	Human embryonic kidney
HPA	Humanes Plättchenantigen
HUVECs	human umbilical vein endothelial cells
IgG	Immunglobulin G
ICH	interkraniale Hämorrhagie
IVIG	intravenöse Immunglobuline
KCl	Kaliumchlorid
konz.	konzentriert
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharide
Lsg.	Lösung
M	Molar
mA	Milliampere
MaCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MAIEA	Monoclonal Antibody Immobilization of Endothelial Antigens Assay
MAIPA	Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigens Assay
mIgG	Maus-IgG-Antikörper
min	Minuten
mind.	mindestens
mM	Millimolar
mg	Milligram
MG	Molekulargewicht
ml	Milliliter
MW	Mittelwert
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
Na <sub>2</sub> -EDTA x 2 H <sub>2</sub> O	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	Natriumthiosulfatlösung
NaCl	Natriumchlorid
neg.	negativ
Nr.	Nummer
P/S	Benzylpenicillin-Procaïn/Dihydrostreptomycin
PBS	Phosphate Buffered Saline

PECAM-1	platelet/endothelial cell adhesion molecule 1
pos.	positiv
Rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
R3-IGF-1	R3 Insulin-like Growth Factor-1
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
t	timepoint
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <b>Immunisierung der Mutter im Rahmen der FNAIT</b>	1
Abbildung 2: <b>Schematische Darstellung des <math>\alpha 11\beta 3</math> und <math>\alpha v\beta 3</math> Integrin</b>	4
Abbildung 3: <b>Diaplazentare Übertragung der Immunglobuline G</b>	8
Abbildung 4: <b>Schematische Darstellung der <math>\alpha v\beta 3</math> Integrinstreckung</b>	13
Abbildung 5: <b>Schematische Darstellung des <math>\alpha v\beta 3</math>-Integrins während der Angiogenese</b>	15
Abbildung 6: <b>Schematische Darstellung des Schutzes vor Anoikis durch Integrinligation</b>	16
Abbildung 7: <b>Schematischer Aufbau einer Nabelschnur</b>	23
Abbildung 8: <b>Mikroskopische Aufnahme mit 10x Objektiv</b>	26
Abbildung 9: <b>Mikroskopische Aufnahme mit 5x Objektiv</b>	26
Abbildung 10: <b>Veranschaulichung der morphologischen Parameter</b>	27
Abbildung 11: <b>Schematische Darstellung der Spaltungsstelle der Endoglykosidase S</b>	30
Abbildung 12: <b>Schematische Darstellung der Bindung zwischen dem Fc-Teil des Antikörpers und dem Fc<math>\gamma</math>-Rezeptor auf Endothelzellen</b>	31
Abbildung 13: <b>Indirekter MAIPA (Prinzip)</b>	37
Abbildung 14: <b>Mittelwert der Variationskoeffizienten von gepoolten HUVECs im Vergleich zu dem Mittelwert der Variationskoeffizienten von HUVEC-Einzelspenderinnen im Tube Formation Assay</b>	40
Abbildung 15: <b>Die <i>Tube-Length</i> von HUVECs im Tube Formation Assay im Zeitrahmen von 18 Stunden</b>	41
Abbildung 16: <b>Aufnahmen unbehandelter HUVEC Poolzellen im Tube Formation Assay</b>	41
Abbildung 17: <b>Durchflusszytometrische Phänotypisierung der HUVECs</b>	42
Abbildung 18: <b>Bindung der Antikörper 23C6 und AP3 an HUVECs mit und ohne LPS-Vorinkubation</b>	43
Abbildung 19: <b>Hemmung der <i>in vitro</i> Angiogenese von HUVECs durch Inkubation mit monoklonalen Antikörpern nach 4 Stunden</b>	45
Abbildung 20: <b>Aufnahmen der durch LM609 und 23C6 behandelten Endothelzellen im Tube Formatio Assay</b>	46
Abbildung 21: <b>Hemmung der <i>in vitro</i> Angiogenese von HUVECs durch Inkubation mit monoklonalen Antikörpern nach 6 Stunden</b>	47
Abbildung 22: <b>Hemmung der <i>in vitro</i> Angiogenese von HUVECs durch Inkubation mit monoklonalen Antikörpern nach 8 Stunden</b>	48

Abbildung 23: <b>Hemmung der <i>in vitro</i> Angiogenese von HUVECs durch Inkubation mit monoklonalen Antikörpern (Anti-β3 (HPA-1a) und Anti-HLA-Klassel) nach 4 Stunden</b>	49
Abbildung 24: <b>Aufnahmen der durch B2G1, ΔB2G1 und W6/32 behandelten Endothelzellen im Tube Formation Assay</b>	50
Abbildung 25: <b>Hinweis der Deglykosylierung mittels SDS-Page</b>	50
Abbildung 26: <b>Hemmung der <i>in vitro</i> Angiogenese von HUVECs durch Inkubation mit monoklonalen Antikörpern (Anti-αβ3, Anti-Fcγ-Rezeptor I, II, IIa und III) nach 4 Stunden</b>	51
Abbildung 27: <b>Aufnahmen der durch LPS behandelten Endothelzellen im Tube Formation Assay</b>	52
Abbildung 28: <b>Hemmung der <i>in vitro</i> Angiogenese von HUVECs durch Inkubation mit LPS und TNF-α nach 4 Stunden</b>	53
Abbildung 29: <b>Hemmung der <i>in vitro</i> Angiogenese von HUVECs durch Inkubation mit LPS und monoklonalen Antikörpern nach 4 Stunden.</b>	54
Abbildung 30: <b>Absorption von AP3 durch cβ3 Monomere</b>	55
Abbildung 31: <b>MAIPA/MAIEA vor und nach Absorption der FNAIT Seren mit dem cβ3-Protein</b>	56
Abbildung 32: <b>Hemmung der <i>in vitro</i> Angiogenese von HUVECs durch Inkubation mit Serum von Patientinnen mit fetaler/neonataler Alloimmunthrombozytopenie nach 4 Stunden</b>	56
Abbildung 33: <b>Aufnahmen des AB-Serums und Serum von FNAIT Patienten mit und ohne fetale Hirnblutung im Tube Formation Assay</b>	57
Abbildung 34: <b>Mechanismen des Crosstalks zwischen αβ3 und VEGFR2</b>	64

## 10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <b>Subtypen der Anti-HPA-1a-Antikörper</b>	3
Tabelle 2: <b>Frequenzen menschlicher Plättchenantigene in Bezug auf die ethnischen Zugehörigkeit</b>	6
Tabelle 3: <b>Antikörper</b>	19
Tabelle 4: <b>Geräte/Materialien</b>	20
Tabelle 5: <b>Chemikalien</b>	21
Tabelle 6: <b>Informationen zum 5x und 10x Objektiv</b>	26
Tabelle 7: <b>Erklärung der morphologischen Parameter bei Wimasis</b>	27
Tabelle 8: <b>Lösungen für SDS-Gele</b>	32
Tabelle 9: <b>Lösungen für SDS-Page</b>	32
Tabelle 10: <b>Stammlösungen für Silberfärbung</b>	33
Tabelle 11: <b>Variationskoeffizienten der morphologischen Auswertung von gepoolten HUVECs im Vergleich zu den HUVECs von Einzelspenderinnen im Tube Formation Assay</b>	39

## 11 Literaturverzeichnis

Anani Sarab, G., Moss, M., Barker, R. N., & Urbaniak, S. J. (2009). Naturally processed peptides spanning the HPA-1a polymorphism are efficiently generated and displayed from platelet glycoprotein by HLA-DRB3\*0101-positive antigen-presenting cells. *Blood*, *114*(9), 1954–1957. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-211839>

Arnautova, I., George, J., Kleinman, H. K., & Benton, G. (2009). The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: State of the science and the art. *Angiogenesis*, *12*(3), 267–274. <https://doi.org/10.1007/s10456-009-9146-4>

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>

Bakchoul, T., Kubiak, S., Krautwurst, A., Roderfeld, M., Siebert, H. C., Bein, G., Sachs, U. J., & Santoso, S. (2011). Low-avidity anti-HPA-1a alloantibodies are capable of antigen-positive platelet destruction in the NOD/SCID mouse model of alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*, *51*(11), 2455–2461. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03171.x>

Bakchoul, T., Sachs, U. J., Wittekindt, B., Sclösser, R., Bein, G., & Santoso, S. (2008). Treatment of fetomaternal neonatal alloimmune thrombocytopenia with random platelets. *Pediatric Blood & Cancer*, *50*(6), 1293–1294. <https://doi.org/10.1002/pbc.21531>

Bayat, B., Nielsen, K. R., Bein, G., Traum, A., Burg-Roderfeld, M., & Sachs, U. J. (2021). Transfusion of target antigens to preimmunized recipients: A new mechanism in transfusion-related acute lung injury. *Blood Advances*, *5*(20), 3975–3985. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020003843>

Bayat, B., Traum, A., Berghöfer, H., Werth, S., Zhu, J., Bein, G., Sachs, U. J., & Santoso, S. (2019). Current Anti-HPA-1a Standard Antibodies React with the  $\beta 3$  Integrin Subunit but not with  $\alpha \text{IIb}\beta 3$  and  $\alpha \text{v}\beta 3$  Complexes. *Thrombosis and haemostasis*, *119*(11), 1807–1815. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1696716>

Bennett, J. S. (2005). Structure and function of the platelet integrin  $\alpha \text{IIb}\beta 3$ . *Journal of Clinical Investigation*, *115*(12), 3363–3369. <https://doi.org/10.1172/JCI26989>

Bennett, J. S., Berger, B. W., & Billings, P. C. (2009). The structure and function of platelet integrins. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *7*(s1), 200–205. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03378.x>

Bentley, K., Mariggi, G., Gerhardt, H., & Bates, P. A. (2009). Tipping the balance: Robustness of tip cell selection, migration and fusion in angiogenesis. *PLoS Computational Biology*, *5*(10), e1000549. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000549>

Bogdanovich, S., Kim, Y., Mizutani, T., Yasuma, R., Tudisco, L., Cicatiello, V., Bastos-Carvalho, A., Kerur, N., Hirano, Y., Baffi, J. Z., Tarallo, V., Li, S., Yasuma, T., Arpitha, P., Fowler, B. J., Wright, C. B., Apicella, I., Greco, A., Brunetti, A., Ambati, J. (2016). Human IgG1 antibodies suppress angiogenesis in a target-independent manner. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *1*, 15001. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.1>

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>

Breier, G., & Risau, W. (1996). The role of vascular endothelial growth factor in blood vessel formation. *Trends in Cell Biology*, 6(12), 454–456. [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(96\)84935-x](https://doi.org/10.1016/0962-8924(96)84935-x)

Brooks, P. C., Clark, R. A., & Cheresh, D. A. (1994). Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5158), 569–571. <https://doi.org/10.1126/science.7512751>

Brooks, P. C., Strömblad, S., Klemke, R., Visscher, D., Sarkar, F. H., & Cheresh, D. A. (1995). Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *The Journal of Clinical Investigation*, 96(4), 1815–1822. <https://doi.org/10.1172/JCI118227>

Bundesärztekammer auf Empfehlung ihres Wissenschaftlichen Beirats. (2021). *Querschnitts-Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten: Gesamtnovelle 2020*. Deutscher Ärzteverlag. <https://doi.org/10.47420/9783769137309>

Bussel, J. (2009). Diagnosis and management of the fetus and neonate with alloimmune thrombocytopenia. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7(s1), 253–257. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2009.03380.x>

Bussel, J. B., Berkowitz, R. L., Lynch, L., Lesser, M. L., Paidas, M. J., Huang, C. L., & McFarland, J. G. (1996). Antenatal management of alloimmune thrombocytopenia with intravenous gamma-globulin: A randomized trial of the addition of low-dose steroid to intravenous gamma-globulin. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 174(5), 1414–1423. [https://doi.org/10.1016/s0002-9378\(96\)70582-3](https://doi.org/10.1016/s0002-9378(96)70582-3)

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. <https://doi.org/10.1056/NEJM199707033370104>

Cai, W., & Chen, X. (2006). Anti-Angiogenic Cancer Therapy Based on Integrin  $\alpha\beta 3$  Antagonism. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 6(5), 407–428. <https://doi.org/10.2174/187152006778226530>

Carron, C. P., Meyer, D. M., Pegg, J. A., Engleman, V. W., Nickols, M. A., Settle, S. L., Westlin, W. F., Ruminski, P. G., & Nickols, G. A. (1998). A peptidomimetic antagonist of the integrin alpha(v)beta3 inhibits Leydig cell tumor growth and the development of hypercalcemia of malignancy. *Cancer Research*, 58(9), 1930–1935.

Chen, P., Li, C., Lang, S., Zhu, G., Rehem, 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>

Cheresh, D. A., Smith, J. W., Cooper, H. M., & Quaranta, V. (1989). A novel vitronectin receptor integrin ( $\alpha\beta x$ ) is responsible for distinct adhesive properties of carcinoma cells. *Cell*, 57(1), 59–69. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90172-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90172-4)

Curtis, B. R. (2015). Recent progress in understanding the pathogenesis of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *British Journal of Haematology*, 171(5), 671–682. <https://doi.org/10.1111/bjh.13639>

Dahl, J., Refsum, E., Ahlen, M. T., Egeland, T., Jensen, T., Viken, M. K., Stuge, T. B., Acharya, G., Husebekk, A., Skogen, B., & Tiller, H. (2017). Unraveling the role of maternal anti-HLA class I antibodies in fetal and neonatal thrombocytopenia-Antibody specificity analysis using epitope data. *Journal of Reproductive Immunology*, 122, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2017.06.003>

Danilucci, T. M., Santos, P. K., Pachane, B. C., Pisani, G. F. D., Lino, R. L. B., Casali, B. C., Altei, W. F., & Selistre-de-Araujo, H. S. (2019). Recombinant RGD-disintegrin DisBa-01 blocks integrin  $\alpha\beta 3$  and impairs VEGF signaling in endothelial cells. *Cell Communication and Signaling: CCS*, 17(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0339-1>

Dardik, R., & Salomon, O. (2021). Maternal Anti-HPA-1a Antibodies Increase Endothelial Cell Apoptosis and Permeability. *Journal of Vascular Research*, 58(5), 321–329. <https://doi.org/10.1159/000515703>

Davoren, A., McParland, P., Barnes, C. A., & Murphy, W. G. (2002). Neonatal alloimmune thrombocytopenia in the Irish population: A discrepancy between observed and expected cases. *Journal of Clinical Pathology*, 55(4), 289–292. <https://doi.org/10.1136/jcp.55.4.289>

DeLisser, H. M., Newman, P. J., & Albelda, S. M. (1994). Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunology Today*, 15(10), 490–495. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(94\)90195-3](https://doi.org/10.1016/0167-5699(94)90195-3)

Drake, C. J., Cheresh, D. A., & Little, C. D. (1995). An antagonist of integrin  $\alpha v \beta 3$  prevents maturation of blood vessels during embryonic neovascularization. *Journal of Cell Science*, 108 (Pt 7), 2655–2661. <https://doi.org/10.1242/jcs.108.7.2655>

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. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 194(12), 5751–5760. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401599>

Eleftheriadis, T., Pissas, G., Crespo, M., Filippidis, G., Antoniadis, N., Liakopoulos, V., & Stefanidis, I. (2021). The effect of anti-HLA class I antibodies on the immunological properties of human glomerular endothelial cells and their modification by mTOR inhibition or GCN2 kinase activation. *Molecular Medicine Reports*, 23(5), 355. <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.11994>

Felding-Habermann, B., & Cheresh, D. A. (1993). Vitronectin and its receptors. *Current Opinion in Cell Biology*, 5(5), 864–868. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(93\)90036-P](https://doi.org/10.1016/0955-0674(93)90036-P)

Friedlander, M., Brooks, P. C., Shaffer, R. W., Kincaid, C. M., Varner, J. A., & Cheresh, D. A. (1995). Definition of two angiogenic pathways by distinct  $\alpha v$  integrins. *Science (New York, N.Y.)*, 270(5241), 1500–1502. <https://doi.org/10.1126/science.270.5241.1500>

Gasparini, G., Brooks, P. C., Biganzoli, E., Vermeulen, P. B., Bonoldi, E., Dirix, L. Y., Ranieri, G., Miceli, R., & Cheresh, D. A. (1998). Vascular integrin  $\alpha(v)\beta 3$ : A new prognostic indicator in breast cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 4(11), 2625–2634.

Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., & Betsholtz, C. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of Cell Biology*, 161(6), 1163–1177. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302047>

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>

Ginsberg, M. H., Partridge, A., & Shattil, S. J. (2005). Integrin regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(5), 509–516. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.08.010>

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.

Hodivala-Dilke K.  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin and angiogenesis: a moody integrin in a changing environment. *Curr Opin Cell Biol*. 2008 Oct;20(5):514-9. doi: 10.1016/j.ceb.2008.06.007. Epub 2008 Aug 6. PMID: 18638550.

Holderfield, M. T., & Hughes, C. C. W. (2008). Crosstalk between vascular endothelial growth factor, notch, and transforming growth factor-beta in vascular morphogenesis. *Circulation Research*, 102(6), 637–652. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.167171>

ibidi GmbH. (2019). *Experimental Setup Optimization and Data Analysis of Tube Formation Assays*. ibidi GmbH. [https://ibidi.com/img/cms/support/AN/AN27\\_Tube\\_Formation\\_Data\\_Analysis.pdf](https://ibidi.com/img/cms/support/AN/AN27_Tube_Formation_Data_Analysis.pdf)

Jallu, V., Poulain, P., Fuchs, P. F. J., Kaplan, C., & de Brevern, A. G. (2012). Modeling and Molecular Dynamics of HPA-1a and -1b Polymorphisms: Effects on the Structure of the  $\beta$ 3 Subunit of the  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 Integrin. *PLoS ONE*, 7(11), e47304. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047304>

Jiangxue, H., Liling, Y., Fang, X., Shumei, Y., Gengying, L., Xuejun, R., Yao, Y., Chuan, N., Jie, Y., & Zhuxiao, R. (2023). Wnt5a-Flt1 activation contributes to preterm altered cerebral angiogenesis after prenatal inflammation. *Pediatrics and Neonatology*, 64(5), 528–537. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2023.01.002>

Justiniano, S. E., Elavazhagan, S., Fatehchand, K., Shah, P., Mehta, P., Roda, J. M., Mo, X., Cheney, C., Hertlein, E., Eubank, T. D., Marsh, C., Muthusamy, N., Butchar, J. P., Byrd, J. C., & Tridandapani, S. (2013). Fc $\gamma$  receptor-induced soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) production inhibits angiogenesis and enhances efficacy of anti-tumor antibodies. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(37), 26800–26809. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.485185>

Kamata, T., Handa, M., Takakuwa, S., Sato, Y., Kawai, Y., Ikeda, Y., & Aiso, S. (2013). Epitope Mapping for Monoclonal Antibody Reveals the Activation Mechanism for  $\alpha$ V $\beta$ 3 Integrin. *PLoS ONE*, 8(6), e66096. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066096>

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>

Kamphuis, M., Paridaans, N., Porcelijn, L., De Haas, M., van der Schoot, C., Brand, A., Bonsel, G., & Oepkes, D. (2010). Screening in pregnancy for fetal or neonatal alloimmune thrombocytopenia: Systematic review. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, *117*(11), 1335–1343. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2010.02657.x>

Kaplan, C., Morel-Kopp, M. C., Kroll, H., Kiefel, V., Schlegel, N., Chesnel, N., & Mueller-Eckhardt, C. (1991). HPA-5b (Br(a)) neonatal alloimmune thrombocytopenia: Clinical and immunological analysis of 39 cases. *British Journal of Haematology*, *78*(3), 425–429. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1991.tb04459.x>

Kiefel, V. (1992). The MAIPA assay and its applications in immunohaematology. *Transfusion Medicine (Oxford, England)*, *2*(3), 181–188. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.1992.tb00153.x>

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., Santoso, S., Weisheit, M., & Müller-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. <https://doi.org/10.1182/blood.V70.6.1722.1722>

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). <https://doi.org/10.1016/j.transci.2019.102707>

Kjeldsen-Kragh, J., Bein, G., & Tiller, H. (2023). Pregnant Women at Low Risk of Having a Child with Fetal and Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia Do Not Require Treatment with Intravenous Immunoglobulin. *Journal of Clinical Medicine*, *12*(17), 5492. <https://doi.org/10.3390/jcm12175492>

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>

Kroll, H., Yates, J., & Santoso, S. (2005). Immunization against a low-frequency human platelet alloantigen in fetal alloimmune thrombocytopenia is not a single event: Characterization by the combined use of reference DNA and novel allele-specific cell lines expressing recombinant antigens. *Transfusion*, *45*(3), 353–358. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2005.04218.x>

Kumpel, B. M., Sibley, K., Jackson, D. J., White, G., & Soothill, P. W. (2008). Ultrastructural localization of glycoprotein IIIa (GPIIIa, beta 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>

- Lainer-Carr, D., & Brahn, E. (2007). Angiogenesis inhibition as a therapeutic approach for inflammatory synovitis. *Nature Clinical Practice. Rheumatology*, 3(8), 434–442. <https://doi.org/10.1038/ncprheum0559>
- Lau, T.-L., Kim, C., Ginsberg, M. H., & Ulmer, T. S. (2009). The structure of the integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling. *The EMBO Journal*, 28(9), 1351–1361. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.63>
- Leavesley, D. I., Schwartz, M. A., Rosenfeld, M., & Cheresh, D. A. (1993). Integrin beta 1- and beta 3-mediated endothelial cell migration is triggered through distinct signaling mechanisms. *The Journal of Cell Biology*, 121(1), 163–170.
- Leeksa, O. C., Giltay, J. C., Zandbergen-Spaargaren, J., Modderman, P. W., van Mourik, J. A., & von dem Borne, A. E. (1987). The platelet alloantigen Zwa or PIA1 is expressed by cultured endothelial cells. *British Journal of Haematology*, 66(3), 369–373. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1987.tb06925.x>
- Li, C., Piran, S., Chen, P., Lang, S., Zarpellon, A., Jin, J. W., Zhu, G., Rehemian, A., van der Wal, D. E., Simpson, E. K., Ni, R., Gross, P. L., Ware, J., Ruggeri, Z. M., Freedman, J., & Ni, H. (2011). The maternal immune response to fetal platelet GPIIb/IIIa causes frequent miscarriage in mice that can be prevented by intravenous IgG and anti-FcRn therapies. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(11), 4537–4547. <https://doi.org/10.1172/JCI57850>
- Loghem, J. J. van, Dorfmeijer, H., Schreuder, F., & Hart, M. van der. (1959). Serological and Genetical Studies on a Platelet Antigen (Zw)\*. *International Society of Blood Transfusion*, 10, 859–862. <https://doi.org/10.1159/000426341>
- Mahabeleshwar, G. H., Feng, W., Reddy, K., Plow, E. F., & Byzova, T. V. (2007). Mechanisms of Integrin–Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Cross-Activation in Angiogenesis. *Circulation research*, 101(6), 570–580. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.155655>
- McLeod, B., & McClung, C. (2018). *Glycan Analysis of Murine IgG by Enzymatic Digestion with Endo S and PNGase F, Followed by Mass Spectrometric Analysis*. New England Biolabs, Inc.
- Mehrbod, M., Trisno, S., & Mofrad, M. R. K. (2013). On the Activation of Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3: Outside-in and Inside-out Pathways. *Biophysical Journal*, 105(6), 1304–1315. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2013.07.055>
- Mineo, C., Gormley, A. K., Yuhanna, I. S., Osborne-Lawrence, S., Gibson, L. L., Hahner, L., Shohet, R. V., Black, S., Salmon, J. E., Samols, D., Karp, D. R., Thomas, G. D., & Shaul, P. W. (2005). Fc $\gamma$ RIIB Mediates C-Reactive Protein Inhibition of Endothelial NO Synthase. *Circulation Research*, 97(11), 1124–1131. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000194323.77203.fe>
- Mishima, T., Kurasawa, G., Ishikawa, G., Mori, M., Kawahigashi, Y., Ishikawa, T., Luo, S.-S., Takizawa, T., Goto, T., Matsubara, S., Takeshita, T., Robinson, J. M., & Takizawa, T. (2007). Endothelial Expression of Fc Gamma Receptor IIb in the Full-term Human Placenta. *Placenta*, 28(2), 170–174. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2006.01.024>
- Mueller-Eckhardt, C., Kiefel, V., Grubert, A., Kroll, H., Weisheit, M., Schmidt, S., Mueller-Eckhardt, G., & Santoso, S. (1989). 348 cases of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Lancet (London, England)*, 1(8634), 363–366.

[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(89\)91733-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(89)91733-9)

Newman, P. J., Derbes, R. S., & Aster, R. H. (1989). The human platelet alloantigens, PIA1 and PIA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *Journal of Clinical Investigation*, 83(5), 1778–1781.

Ni, H., Chen, P., Spring, C. M., Sayeh, E., Semple, J. W., Lazarus, A. H., Hynes, R. O., & Freedman, J. (2006). A novel murine model of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: Response to intravenous IgG therapy. *Blood*, 107(7). <https://doi.org/10.1182/blood-2005-06-2562>

Nowak-Sliwinska, P., Alitalo, K., Allen, E., Anisimov, A., Aplin, A. C., Auerbach, R., Augustin, H. G., Bates, D. O., van Beijnum, J. R., Bender, R. H. F., Bergers, G., Bikfalvi, A., Bischoff, J., Böck, B. C., Brooks, P. C., Bussolino, F., Cakir, B., Carmeliet, P., Castranova, D., Griffioen, A. W. (2018). Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. *Angiogenesis*, 21(3), 425–532. <https://doi.org/10.1007/s10456-018-9613-x>

Nydegger, U. (2009). *Labordiagnose der Neonatalen Alloimmun-Thrombozytopenie. pipette*, 6-8.

Ohto, H., Miura, S., Ariga, H., Ishii, T., Fujimori, K., Morita, S., & Collaborative Study Group. (2004). The natural history of maternal immunization against foetal platelet alloantigens. *Transfusion Medicine (Oxford, England)*, 14(6), 399–408. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2004.00535.x>

Peng, J., Vongpatanasin, W., Sacharidou, A., Kifer, D., Yuhanna, I. S., Banerjee, S., Tanigaki, K., Polasek, O., Chu, H., Sundgren, N. C., Rohatgi, A., Chambliss, K. L., Lauc, G., Mineo, C., & Shaul, P. W. (2019). Supplementation With the Sialic Acid Precursor N-Acetyl-D-Mannosamine Breaks the Link Between Obesity and Hypertension. *Circulation*, 140(24), 2005–2018. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.043490>

Petermann, R., Bakchoul, T., Curtis, B. R., Mullier, F., Miyata, S., Arnold, D. M., & Subcommittee on Platelet Immunology. (2018). Investigations for fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: Communication from the SSC of the ISTH. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 16(12), 2526–2529. <https://doi.org/10.1111/jth.14294>

Pillay, S., Byrne, H. M., & Maini, P. K. (2018). The impact of exclusion processes on angiogenesis models. *Journal of Mathematical Biology*, 77(6), 1721–1759. <https://doi.org/10.1007/s00285-018-1214-1>

*Platelet Antigen Database | HPA | Versiti*. (2022). <https://www.versiti.org/medical-professionals/precision-medicine-expertise/platelet-antigen-database#hpa-database>

Pooh, R., & Kurjak, A. (2010). Fetal Brain Vascularity Visualized by Conventional 2D and 3D Power Doppler Technology. *Donald School Journal of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 4(3), 249–258. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10009-1147>

Pyzik, M., Kozicky, L. K., Gandhi, A. K., & Blumberg, R. S. (2023). The therapeutic age of the neonatal Fc receptor. *Nature Reviews Immunology*, 23(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00821-1>

Pyzik, M., Sand, K. M. K., Hubbard, J. J., Andersen, J. T., Sandlie, I., & Blumberg, R. S.

(2019). The Neonatal Fc Receptor (FcRn): A Misnomer? *Frontiers in Immunology*, 10, 1540. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01540>

Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 386(6626), Article 6626. <https://doi.org/10.1038/386671a0>

Roopenian, D. C., & Akilesh, S. (2007). FcRn: The neonatal Fc receptor comes of age. *Nature Reviews. Immunology*, 7(9), 715–725. <https://doi.org/10.1038/nri2155>

Rossi, K. Q., Lehman, K. J., & O’Shaughnessy, R. W. (2016). Effects of antepartum therapy for fetal alloimmune thrombocytopenia on maternal lifestyle. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine: The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 29(11), 1783–1788. <https://doi.org/10.3109/14767058.2015.1063607>

Sachs, U. J. (2013). Fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Thrombosis Research*, 131 Suppl 1, S42-46. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(13\)70020-3](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(13)70020-3)

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., Bedei, I., Wienzek-Lischka, S., Cooper, N., Ehrhardt, H., Axt-Fliedner, R., & Bein, G. (2021a). Fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie, Teil 1. *Transfusionsmedizin*, 11(2), 112–126. <https://doi.org/10.1055/a-1258-1238>

Sachs, U. J., Bedei, I., Wienzek-Lischka, S., Cooper, N., Ehrhardt, H., Axt-Fliedner, R., & Bein, G. (2021b). Fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie, Teil 2. *Transfusionsmedizin*, 11(2). <https://doi.org/10.1055/a-1258-1238>

Sachs, U. J., Wienzek-Lischka, S., Duong, Y., Qiu, D., Hinrichs, W., Cooper, N., Santoso, S., Bayat, B., & Bein, G. (2020). Maternal antibodies against paternal class I human leukocyte antigens are not associated with foetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *British Journal of Haematology*, 189(4), 751–759. <https://doi.org/10.1111/bjh.16419>

Santoso, S., Wihadmadyatami, H., Bakchoul, T., Werth, S., Al-Fakhri, N., Bein, G., Kiefel, V., Zhu, J., Newman, P. J., Bayat, B., & Sachs, U. J. (2016). Anti-endothelial  $\alpha\beta 3$  antibodies are a major cause of intracranial bleeding in fetal-neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 36(8), 1517–1524. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.307281>

Schallmoser, K., Kutschera, J., Macher, S., Ulrich, S., Eichler, P., Panzer, S., & Lanzer, G. (2006). Delayed detectability of anti-HPA-3a by the MAIPA assay in a severe neonatal alloimmune thrombocytopenia, but successful transfusion of incompatible donor platelets: A case report. *Vox Sanguinis*, 91(2), 181–183. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2006.00809.x>

Silva, F., Morais, S., Sevivas, T., Veiga, R., Salvado, R., & Taborda, A. (2011). Severe intracranial haemorrhage in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *BMJ Case Reports*, 2011, bcr0720114563. <https://doi.org/10.1136/bcr.07.2011.4563>

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>

Somanath, P. R., Malinin, N. L., & Byzova, T. V. (2009). Cooperation between integrin  $\alpha v \beta 3$  and VEGFR2 in angiogenesis. *Angiogenesis*, 12(2), 177–185. <https://doi.org/10.1007/s10456-009-9141-9>

Staton, C. A., Reed, M. W. R., & Brown, N. J. (2009). A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *International Journal of Experimental Pathology*, 90(3), 195–221. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2613.2008.00633.x>

Strömblad, S., & Cheresh, D. A. (1996). Integrins, angiogenesis and vascular cell survival. *Chemistry & Biology*, 3(11), 881–885. [https://doi.org/10.1016/s1074-5521\(96\)90176-3](https://doi.org/10.1016/s1074-5521(96)90176-3)

Stryker, Z. I., Rajabi, M., Davis, P. J., & Mousa, S. A. (2019). Evaluation of Angiogenesis Assays. *Biomedicines*, 7(2), 37. <https://doi.org/10.3390/biomedicines7020037>

Stupack, D. G., & Cheresh, D. A. (2002). ECM remodeling regulates angiogenesis: Endothelial integrins look for new ligands. *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*, 2002(119), pe7. <https://doi.org/10.1126/stke.2002.119.pe7>

Szekanecz, Z., & Koch, A. E. (2005). Endothelial cells in inflammation and angiogenesis. *Current Drug Targets. Inflammation and Allergy*, 4(3), 319–323. <https://doi.org/10.2174/1568010054022187>

Tan, J.-Y., Lian, L.-H., & Nadarajan, V. S. (2012). Genetic polymorphisms of human platelet antigens-1 to -6, and -15 in the Malaysian population. *Blood Transfusion*, 10(3), 368–376. <https://doi.org/10.2450/2012.0095-11>

Tetzlaff, F., & Fischer, A. (2018). Human Endothelial Cell Spheroid-based Sprouting Angiogenesis Assay in Collagen. *Bio-protocol*, 8(17), e2995. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2995>

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 of the United States of America*, 115(39), E9105–E9114. <https://doi.org/10.1073/pnas.1806205115>

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), e002490. <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 Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica*, 91(1), 79–86. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0412.2011.01269.x>

Tsai, H.-L., Huang, C.-W., Chen, Y.-C., Su, W.-C., Chang, T.-K., Chen, P.-J., Li, C.-C., Chang, Y.-T., & Wang, J.-Y. (2023). Real-World Outcomes of First-Line FOLFIRI Plus Bevacizumab with Irinotecan Dose Escalation versus FOLFOXIRI Plus Bevacizumab in BRAFV600E-Mutant Metastatic Colorectal Cancer: The Preliminary Data from a Single-Center Observational Study. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 59(12), 2108. <https://doi.org/10.3390/medicina59122108>

Van Der Weerd, C. M., Veenhoven-Vonriesz, L. E., Nijenhuis, L. E., & Van Loghem, J. (1963). THE ZW BLOOD GROUP SYSTEM IN PLATELETS. *Vox Sanguinis*, 8, 513–530. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1963.tb04179.x>

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>

Vanderpuye, O. A., Labarrere, C. A., & McIntyre, J. A. (1991). A vitronectin-receptor-related molecule in human placental brush border membranes. *The Biochemical Journal*, 280 ( Pt 1), 9–17. <https://doi.org/10.1042/bj2800009>

Ward, E. S., Zhou, J., Ghetie, V., & Ober, R. J. (2003). Evidence to support the cellular mechanism involved in serum IgG homeostasis in humans. *International Immunology*, 15(2), 187–195. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxg018>

Wienzek-Lischka, S., Bachmann, S., Froehner, V., & Bein, G. (2020). Potential of Next-Generation Sequencing in Noninvasive Fetal Molecular Blood Group Genotyping. *Transfusion Medicine and Hemotherapy: Offizielles Organ Der Deutschen Gesellschaft Fur Transfusionsmedizin Und Immunhamatologie*, 47(1), 14–22. <https://doi.org/10.1159/000505161>

Wienzek-Lischka, S., König, I. R., Papenkort, E.-M., Hackstein, H., Santoso, S., Sachs, U. J., & Bein, G. (2017). HLA-DRB3\*01:01 is a predictor of immunization against human platelet antigen-1a but not of the severity of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Transfusion*, 57(3), 533–540. <https://doi.org/10.1111/trf.13950>

Wienzek-Lischka, S., Sawazki, A., Ehrhardt, H., Sachs, U. J., Axt-Fliedner, R., & Bein, G. (2020). Non-invasive risk-assessment and bleeding prophylaxis with IVIG in pregnant women with a history of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: Management to minimize adverse events. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 302(2), 355–363. <https://doi.org/10.1007/s00404-020-05618-y>

<https://www.wimasis.com/tube-formation-assay>

Winkelhorst, D., Kamphuis, M. M., Steggerda, S. J., Rijken, M., Oepkes, D., Lopriore, E., & van Klink, J. M. M. (2019). Perinatal Outcome and Long-Term Neurodevelopment after Intracranial Haemorrhage due to Fetal and Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia. *Fetal Diagnosis and Therapy*, 45(3), 184–191. <https://doi.org/10.1159/000488280>

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>

Wu, Y., Chen, D., Xu, X., Mai, M., Ye, X., Li, C., Santoso, S., Xia, W., & Fu, Y. (2020). Hydrops fetalis associated with anti-CD36 antibodies in fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: Possible underlying mechanism. *Transfusion Medicine (Oxford, England)*, 30(5), 361–368. <https://doi.org/10.1111/tme.12705>

Xu, X., Chen, D., Ye, X., Xia, W., Xu, Y., Chen, Y., Shao, Y., Deng, J., Ding, H., Liu, J., Wang, J., Ni, H., Fu, Y., & Santoso, S. (2021). Successful prenatal therapy for anti-CD36-mediated severe FNAIT by deglycosylated antibodies in a novel murine model. *Blood*, 138(18), 1757–1767. <https://doi.org/10.1182/blood.2021011131>

Xu, X., Fu, Y., Kiefel, V., & Santoso, S. (2021). Fetal and neonatal immune thrombocytopenia caused by maternal alloantibodies and isoantibodies in Caucasian and Asian populations: A narrative review. *Annals of Blood*, 6(0), Article 0. <https://doi.org/10.21037/aob-21-47>

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>

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>

Yougbaré, I., Tai, W.-S., Zdravic, D., Oswald, B. E., Lang, S., Zhu, G., Leong-Poi, H., Qu, D., Yu, L., Dunk, C., Zhang, J., Sled, J. G., Lye, S. J., Brkić, J., Peng, C., Höglund, P., Croy, B. A., Adamson, S. L., Wen, X.-Y., Ni, H. (2017). Activated NK cells cause placental dysfunction and miscarriages in fetal alloimmune thrombocytopenia. *Nature Communications*, 8(1), 224. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00269-1>

Yougbare, I., Zdravic, D., & Ni, H. (2015). Angiogenesis and bleeding disorders in FNAIT. *Oncotarget*, 6(18), 15724–15725. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4757>

Zhao, X., & Guan, J.-L. (2011). Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(8), 610–615. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.11.001>

Zhi, H., Ahlen, M. T., Skogen, B., Newman, D. K., & Newman, P. J. (2021). Preclinical evaluation of immunotherapeutic regimens for fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood Advances*, 5(18), 3552–3562. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2021004371>

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 (PIA1). *Blood Advances*, 2(21), 3001–3011. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018023341>

Zhu, J., Luo, B.-H., Xiao, T., Zhang, C., Nishida, N., & Springer, T. A. (2008). Structure of a complete integrin ectodomain in a physiologic resting state and activation and deactivation by applied forces. *Molecular Cell*, 32(6), 849–861. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.11.018>

## 12 Ethikvotum

Die Experimente der vorliegenden Arbeit basieren auf dem von der Ethik-Kommission des Fachbereichs 11 Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen (JLU) genehmigtem Votum 82/09 vom 02.07.2009 und Amendment vom 08.04.2014 hinsichtlich der Verwendung von pseudonymisierten Patientenserum der fetalen/neonatalen Alloimmunthrombozytopenie zur Untersuchung des Bindungsverhaltens an Endothelzellen, biologische Effekte der Antikörperbindung an Endothel (Apoptose, Barrierefunktion *in vitro*, *in vitro* Gefäßsprossung) sowie Etablierung eines Screeningtests zum Nachweis  $\alpha\beta 3$ -reaktiver Antikörper.

Die HUVEC Isolation aus Nabelschnüren der Frauenklinik wurde von der Ethik-Kommission des Fachbereichs 11 Medizin der JLU mit dem Votum 132/9 genehmigt.

## 13 Publikationsverzeichnis

### Poster

Jalda Ahmadi / Yannick Waxmann / Heike Berghöfer / Olga Dakischew / Silke Schmidt / Sentot Santoso / Gregor Bein / Ulrich Sachs / Behnaz Bayat (2021): Binding of antibodies against  $\alpha\beta 3$  blocks endothelial angiogenesis, 4. Science Day JLU, 12. November 2021.

Jalda Ahmadi / Yannick Waxmann / Jonas Lowack / Heike Berghöfer / Gregor Bein / Ulrich J. Sachs / Behnaz Bayat (2022): The effect of mabs against  $\beta 3$  integrin on endothelial angiogenesis; 55. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI), Mannheim, 21.-23. September 2022.

## 14 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

## **15 Danksagung**

Mein Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Gregor Bein, für die Überlassung des Themas, den fachlichen Rat und die zuverlässige Betreuung. Frau Dr. rer. nat. Behnaz Bayat spreche ich meinen besonderen Dank für die Betreuung im Labor sowie der Weiterentwicklung der Arbeit und ständigen Unterstützung aus. Bei den Mitarbeitern des Institutes für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin in Gießen bedanke ich mich sehr für die Einarbeitungen und Hilfestellungen im Labor. Zuletzt danke ich meiner Familie, meinem Lebenspartner und meinen Freunden für ihre allzeitige Unterstützung.

## **16 Lebenslauf**

Der Lebenslauf wurde aus datenrechtlichen Gründen entfernt.