

Quantitative Bestimmung der in vitro Phagozytose opsonierter
Thrombozyten

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin

des Fachbereiches Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen



vorgelegt von Ole Lause

aus Itzehoe

Gießen (2023)

Aus dem Institut für Klinische Immunologie, Transfusionsmedizin
und Hämostaseologie

Des Fachbereiches Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. G. Bein
2. Gutachter: Prof. Dr. I. H. Akintürk

Tag der Disputation: 08.10.2024

1	Einleitung	1
1.1	Fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT).....	1
1.1.1	Pathogenese	2
1.1.2	Klinik	4
1.1.3	Diagnostik	5
1.1.4	Therapie.....	7
1.1.5	Screening.....	9
1.2	Thrombozyten	10
1.2.1	Integrine	11
1.2.2	Humane Plättchenantigene (HPA).....	15
1.2.3	Humanes Plättchenantigen 1 (HPA-1).....	17
1.3	Antikörper.....	19
1.3.1	Immunglobulin G	21
1.3.2	Anti-HPA-1a Antikörpersubtypen.....	22
1.3.3	Glykosylierung.....	23
1.4	Monozyten.....	25
1.5	Phagozytose	26
1.5.1	Fcy-Rezeptoren.....	28
1.6	Ziel der Arbeit.....	31
2	Material und Methoden.....	33
2.1	Material	33
2.1.1	Humane Blutzellen	33
2.1.2	Labormaterial	33

2.1.3	Chemikalien	35
2.1.4	Pufferlösungen	37
2.1.5	Antikörper	38
2.1.6	Fluoreszenzfarbstoffe der Durchflusszytometrie ..	39
2.1.7	Geräte	40
2.1.8	Software	41
2.2	Methodik	42
2.2.1	Blutentnahme	42
2.2.2	Isolierung von Thrombozyten.....	42
2.2.3	Markierung der Thrombozyten mit pHrodo und Opsonierung mit Antikörpern	43
2.2.4	Isolierung von Monozyten	44
2.2.5	Phagozytose.....	47
2.2.6	Zellernte und Präparation	47
2.2.7	Durchflusszytometrie	48
2.2.8	Automatische Zellzählung im KX-21N (Sysmex) ..	51
2.2.9	Fluoreszenzmikroskopie	51
2.2.10	Statistik.....	52
3	Ergebnisse.....	53
3.1	Erläuterung der Versuchsstrategie.....	53
3.2	Adhärente Monozyten phagozytieren opsonierte Thrombozyten	55
3.3	Mikroskopische Darstellung der monozytären Phagozytose von pHrodo markierten Thrombozyten	59

3.4	Die Methodik der Zellisolierung und Phagozytosemedien haben Einfluss auf die <i>in vitro</i> Phagozytoserate und die Monozytenausbeute.....	61
3.4.1	Die doppelte Dichtegradienten-Zentrifugation zeigt im Vergleich zur einfachen Dichtegradienten-Zentrifugation eine signifikant niedrigere Monozytenausbeute	62
3.4.2	Monozyten phagozytieren opsonierte Thrombozyten besser in Anwesenheit von divalenten Kationen.....	67
3.5	Monoklonale Antikörper gegen das HPA-1a Antigen induzieren antigenspezifisch Phagozytose.....	71
3.6	Monoklonale Antikörper gegen $\alpha v \beta_3$ induzieren keine Phagozytose opsonierter Thrombozyten.....	76
4	Diskussion.....	78
4.1	Methodische Weiterentwicklung des FMPA.....	78
4.1.1	Die einfache Dichtegradienten-Zentrifugation ist der doppelten Dichtegradienten-Zentrifugation in der Monozytenisolierung überlegen.....	81
4.1.2	Phagozytose wird durch Monozytenisolierung nicht beeinflusst.....	83
4.1.3	Einfluss verschiedener Medien auf die Phagozytoserate	84
4.2	Der FMPA ist in der Lage, HPA-1a antigenspezifisch Phagozytose nachzuweisen.....	88
4.2.1	Anti-HPA-1a Antikörper lösen im FMPA dosisabhängig Phagozytose aus	89
4.2.2	Antikörper gegen $\alpha v \beta_3$ lösen keine Phagozytose aus	99

4.3	Anti-HPA-1a Antikörpersubtypen beeinflussen die klinische Ausprägung der FNAIT	102
4.3.1	Fetale- und neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT)	103
4.3.2	Einflussfaktoren der klinischen Ausprägung von FNAIT	107
4.4	Ausblick	111
5	Zusammenfassung	115
6	Summary	117
7	Abkürzungsverzeichnis	119
8	Abbildungsverzeichnis	123
9	Tabellenverzeichnis	124
10	Literaturverzeichnis	125
11	Ehrenwörtliche Erklärung	150
12	Veröffentlichungen	152
13	Danksagung	153

1 Einleitung

1.1 Fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT)

Die fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie ist eine seltene Erkrankung, die zu schweren Blutungskomplikationen des Feten oder Neugeborenen führen kann. Erstmals beschrieben wurde sie 1950, auch wenn hier die Bedeutung von mütterlichen Antikörpern noch nicht klar war. (Epstein et al. 1950; Robson und Walker 1951). Die Erkrankung tritt bei Schwangeren kaukasischer Herkunft mit einer Inzidenz klinisch manifester Fälle von 1:2500 auf (Sachs et al. 2021a).

In der kaukasischen Bevölkerung wird das Krankheitsbild in den meisten Fällen durch Anti-HPA-1a Antikörper (humanes Plättchenantigen) (72,9 %) oder Anti-HPA-5b Antikörper (18,9 %) ausgelöst (Sachs et al. 2021a). Ferner wird die FNAIT in Einzelfällen durch Antikörper gegen selten vorkommende Antigene hervorgerufen (Bakchoul et al. 2011). Die Immunisierung gegen HPA-1a ist signifikant mit dem HLA (humanes Leukozytenantigen) Merkmal DRB3*01:01 assoziiert (Kjeldsen-Kragh et al. 2019;

Wienzek-Lischka et al. 2017). In der japanischen Bevölkerung ist das am häufigsten verursachende Antigen HPA-4b, gefolgt von HPA-4a. Die HPA-Allelfrequenzen sind – bezogen auf die Herkunft – sehr unterschiedlich (Kaplan 2006).

1.1.1 Pathogenese

Die Ursache der FNAIT ist eine Alloimmunisierung der Mutter gegen paternale thrombozytäre Antigene ihres Kindes. Die Mutter ist im häufigsten Fall HPA-1a negativ und der Vater des Kindes HPA-1a positiv. Das Kind erbt ein HPA-1a Allel – ist also heterozygot - und exprimiert dieses Antigen auf der Thrombozytenoberfläche. Beim Übertritt von fetalen Thrombozyten in den mütterlichen Kreislauf, bereits im ersten Trimester der Schwangerschaft (Tiller et al. 2013), bildet das Immunsystem der Mutter Alloantikörper gegen HPA-1a, da dieses als körperfremd erkannt wird. Eine weitere Möglichkeit der Immunisierung ist die Expression von $\beta 3$ auf Synzytiotrophoblastzellen der Gebärmutter (Kumpel et al. 2008).

Antigenpräsentieren Zellen prozessieren das Antigen und präsentieren es mittels eines MHC-Klasse II (*Major*

histocompatibility complex) Moleküls an ihrer Oberfläche. CD4+ (*Clusters of differentiation*) T-Helferzellen aktivieren wiederum B-Zellen. Diese differenzieren sich weiter zu Plasmazellen, welche antigenspezifische Antikörper produzieren. In diesem Fall Anti-HPA-1a Antikörper.

Die produzierten Antikörper gelangen mittels eines Transportmechanismus aus dem Blut der Mutter durch die Plazenta in den Kreislauf des Fetus. Antikörper der Klasse IgG (Immunglobulin G) – insbesondere die Subklassen IgG 1 & 3 - (Ishikawa et al. 2015; Elefant 2012) werden in die Endosomen der Synzytiotrophoblasten aufgenommen und binden dort an den FcRn-Rezeptor. Über diesen werden sie durch Transzytose weiter auf die fetale Seite der Plazenta transportiert, um dort in die fetale Strombahn zu gelangen (Roopenian und Akilesh 2007).

Die maternalen Alloantikörper opsonieren die HPA-1a positiven fetalen Thrombozyten. Dies führt zur Elimination durch das Monozyten-Makrophagen-System und konsekutiv zu einer fetalen Thrombozytopenie. Neben der Phagozytose durch Monozyten und Makrophagen können Thrombozyten auch durch das Komplementsystem eliminiert werden (Roos und Daha 2002). Eine verringerte Anzahl an Thrombozyten kann zu einer fetalen oder

neonatalen Blutungsneigung führen (Kiefel 2010; Kroll et al. 2005).

1.1.2 Klinik

Klinisch zeigen sich bei sonst gesunden Neugeborenen Blutungszeichen, allerdings können sie auch asymptomatisch bleiben und lediglich eine isolierte Thrombozytopenie aufweisen. Zu den Blutungszeichen gehören Hauteinblutungen, Petechien und Hämatome an besonders beanspruchten Körperregionen wie dem Gesäß (Kiefel 2010), aber auch gastrointestinale oder intrakranielle Blutungen (intracranial hemorrhage – ICH, ca. 10-20 % der Fälle) (Winkelhorst et al. 2016; Tiller et al. 2013). Eine fetale ICH kann auch bereits im Rahmen vorgeburtlicher Ultraschall-Untersuchungen diagnostiziert werden.

In einer retrospektiven, multizentrischen Studie von Tiller et al. wurden 43 Fälle von ICH bei FNAIT beschrieben, von denen die meisten (54 %) vor der 28. Schwangerschaftswoche (SSW) aufgetreten sind. Von den betroffenen Kindern verstarb etwa ein Drittel (35 %) in den ersten vier Tagen nach Geburt – die Hälfte der

Überlebenden (53 %) erlitt neurologische Folgeschäden wie z.B. spastische Lähmungen, Blindheit oder geistige Retardierung. Nur 5 der 43 (12 %) erlitten keine Folgeschäden. Interessanterweise waren 27 der 43 (63 %) betroffenen Kindern die Erstgeborenen der Mutter (Tiller et al. 2013) – dies wurde auch in anderen Studien gezeigt (Jenny C. Jin et al. 2014).

1.1.3 Diagnostik

Bei einer gesunden Mutter, die ein sonst unauffälliges Kind mit isoliert erniedrigter Thrombozytenzahl zur Welt bringt – unabhängig davon ob Blutungszeichen vorliegen oder nicht, ist die Diagnose FNAIT wahrscheinlich (Kiefel 2010). Klinische Blutungszeichen oder Auffälligkeiten in der Schädelsonografie (ICH) ohne erkennbare andere Ursache, sind ebenso hinweisend auf eine FNAIT.

Wenn keine andere Ursache für die Thrombozytopenie gefunden wird, sollte das mütterliche Blut auf thrombozytäre Antikörper z.B. mittels „*Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens*“ (MAIPA) untersucht werden. In diesem Testverfahren werden Glykoproteinkomplexe von HPA-typisierten

Spendern in Form von Thrombozyten dargeboten. Diese werden mit dem zu testenden Serum inkubiert. Anschließend werden monoklonale Antikörper eingesetzt, um nach Solubilisierung der Thrombozyten die durch monoklonale Antikörper markierten Glykoproteinkomplexe an einer Mikrotiterplatte zu immobilisieren. Enzym-markierte anti-human IgG Antikörper dienen dem Nachweis mütterlicher Antikörper, die spezifisch gegen den immobilisierten Glykoproteinkomplex gerichtet sind (Kiefel 1992). Der MAIPA gilt aufgrund von hoher Sensitivität und Spezifität als Referenzmethode für den Nachweis von thrombozytären Antikörpern (Kiefel et al. 1987).

Um die Diagnostik zu komplettieren, sollten die thrombozytären Merkmale von Mutter, Vater und Kind durch Genotypisierung bestimmt werden. Der Vater ist hierbei homo- oder heterozygot, das Kind heterozygot und die Mutter weist das betroffene Merkmal nicht auf (Sachs et al. 2021a). Zum Zeitpunkt der Geburt können sich Antikörper auch unterhalb der Nachweisgrenze befinden, eine Wiederholung der serologischen Tests zu einem späteren Zeitpunkt ist dann indiziert (Schallmoser et al. 2006).

Die Antigenspezifität scheint ein wichtiger Faktor für die Schwere der Blutungsneigung bzw. Thrombozytopenie zu

sein. Antikörper gegen HPA-1a rufen im Vergleich zu Antikörpern gegen HPA-5b schwerere Verläufe hervor (Alm et al. 2022; Kroll H (2000); Kaplan et al. 1991).

1.1.4 Therapie

Bei der Therapie der FNAIT gilt es zu unterscheiden, ob das Kind bei primärer Diagnose behandelt wird, oder ob eine Sekundärprophylaxe bei erneuter Schwangerschaft erfolgen soll (Kiefel 2010; Birchall et al. 2003).

Die postnatale Therapie besteht bei intrakranieller Blutung, Thrombozytenzahlen unter 30.000/ μ l oder schnell abfallenden Thrombozytenzahlen aus Transfusionen mit kompatiblen Thrombozytenkonzentraten. Bei unbekanntem Antikörperstatus der Mutter hat sich eine Transfusion mit HPA-1a und HPA-5b negativen Konzentraten etabliert, da diese die häufigsten Immunisierungen auslösen (Bundesärztekammer Querschnitts-Leitlinien 2021; Allen et al. 2004). Eine Transfusion sollte jedoch nicht durch das Fehlen solcher Präparate verzögert werden. Die Gabe von nicht typisierten Thrombozytenkonzentraten ist dann indiziert (Sachs et al. 2021b; Baker et al. 2019).

Zur Sekundärprophylaxe fetaler und neonataler Blutungskomplikationen wurde ursprünglich ein invasives Vorgehen empfohlen. Daffos et al. empfahlen z.B. eine Kordozentese in der 20-22 SSW, bei der je nach Thrombozytenzahl zugewartet ($> 50.000/\mu\text{l}$) oder Thrombozyten transfundiert werden ($< 30.000/\mu\text{l}$) (Daffos et al. 1984). Die Thrombozytenkonzentrate stammten entweder von der Mutter – hier muss das Plasma von Antikörpern bereinigt sein – oder von kompatiblen Spendern. Die Transfusionen sollten bei niedriger Thrombozytenzahl in regelmäßigen Abständen wiederholt werden (Daffos et al. 1984). Problematisch war das Komplikationsrisiko der Kordozentese bei niedrigen fetalen Thrombozytenzahlen; deswegen wird die beschriebene Methode heute nicht mehr angewandt (Winkelhorst et al. 2017).

Eine weniger invasive Maßnahme – derzeitiger Standard – ist die prophylaktische intravenöse Gabe von Immunglobulin G (IVIG) an die Mutter während der Schwangerschaft. Am häufigsten wird IVIG mit einer Dosis von 1g/kgKG eingesetzt (Winkelhorst et al. 2017). Die Funktionsweise scheint dabei eine kompetitive Hemmung der Fc-Rezeptoren im plazentaren Transport durch die IgGs zu sein (Lilienthal et al. 2018; Kiefel 2010).

Eine Gabe von IVIG scheint auch bei Schwangerschaften ohne hohes Risiko (Geschwister ohne ICH) prophylaktisch gerechtfertigt zu sein (Winkelhorst et al. 2017; Murphy und Bussel 2007; Radder et al. 2001).

1.1.5 Screening

Auch wenn die Anwendung von IVIG bei Schwangeren kein hohes Risiko birgt, ist der Einsatz dieser knappen Ressource sehr teuer und mit hohem Aufwand verbunden. Kjeldsen-Kragh et al. zeigen in ihrem Review auf, dass ein Großteil der verabreichten IVIG bei Schwangeren mit einem niedrigen Risiko für eine ICH nicht notwendig seien. Die Autoren empfehlen außerdem, dass bessere Prädiktoren für das Risiko einer FNAIT etabliert werden müssen, um ein effektives Screening von Schwangeren durchführen zu können. Einer Übertherapie mit IVIG könnte so entgegen gewirkt werden (Kjeldsen-Kragh et al. 2023).

Aktuell gibt es keine Möglichkeit den Schweregrad einer Thrombozytopenie bei Vorliegen einer FNAIT vorherzusagen. Der HPA-1a Antikörpertiter scheint nicht mit dem Schweregrad der Thrombozytopenie zu korrelieren – es wurde von Fällen berichtet, bei denen ein schwerer Krankheitsverlauf mit einem geringen Anti-HPA-

1a Titer einherging (Vos et al. 2020; Kamphuis et al. 2014; Jaegtvik et al. 2000; Williamson et al. 1998). Aktuell ist der einzige Prädiktor die Anamnese vorausgegangener Schwangerschaften. Jedoch besteht auch schon ein Risiko für eine klinisch relevante neonatale oder fetale Thrombozytopenie in einer ersten Schwangerschaft. Ein Screening auf neonatale Thrombozytopenie, sowie ein mögliches maternales Screeningverfahren, ist derzeit international nicht etabliert (Nogués 2020; Ouzegdouh Mammasse et al. 2020).

1.2 Thrombozyten

Thrombozyten sind kernlose, korpuskuläre Blutbestandteile, die aus Abschnürungen von Megakaryozyten im Knochenmark entstehen. Erstmals als Blutplättchen beschrieben wurden diese 1882 vom Pathologen Giulio Bizzozero (Bizzozero 1882). Thrombozyten spielen eine große Rolle in Hämostase sowie Immunreaktionen. Auf ihrer Oberfläche sind Rezeptoren verankert, die zur Aktivierung, Adhäsion, Aggregation und Differenzierung wichtig sind. $\alpha_{IIb}\beta_3$ – ein heterodimeres Glykoprotein – ist hauptsächlich über die

Bindung von Fibrinogen für die Interaktion zwischen den Blutplättchen zuständig. Außerdem ist es an der Bindung zu Endothelzellen und den vWF- (von Willebrand Faktor) beteiligt. P-Selektin vermittelt den Kontakt von aktivierten Thrombozyten zu Leukozyten, z.B. Monozyten (Gremmel et al. 2016).

1.2.1 Integrine

Integrine sind Rezeptoren, die Teile des Zytoskelettes mit der Extrazellulärmatrix verbinden können. Sie kommen auf fast allen Zellen vor. Ein wichtiges thrombozytäres Integrin, $\alpha_{IIb}\beta_3$, ist für die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten maßgeblich (Gremmel et al. 2016).

Integrine bestehen aus je einer β - und einer α -Untereinheit, die nicht kovalent miteinander verbunden sind. Die Klassifizierung wird anhand der β -Untereinheit und die Spezifität durch die α -Untereinheit fest bestimmt. Die bis jetzt bekannten 8 β - und 14 α -Untereinheiten können auf diese Weise unterschiedliche funktionelle Rezeptoren wie z.B. den Fibrinogenrezeptor ($\alpha_{IIb}\beta_3$) bilden (Hynes 2002, 1992).

Die Rezeptoren bestehen aus drei unterschiedlichen Einheiten, einer aminoterminalen extrazellulären, einer

transmembranösen und einer carboxyterminalen zytoplasmatischen. Die zytoplasmatische β -Untereinheit reguliert die Rezeptorfunktion, sie ist der Schlüsselpunkt für die weitere intrazelluläre Signalkaskade. Die α -Untereinheit besitzt mehrere Bindungsstellen für divalente Kationen, deren Bindung für die Interaktion mit Liganden erforderlich ist (Gremmel et al. 2016; Ginsberg et al. 1995). Durch extrazelluläre Einflüsse kann sich die Konformation der Rezeptoren von einem niedrigaffinen in einen hochaffinen Zustand ändern. Dieser Vorgang wird als Affinitätsmodulation bezeichnet. Die Bindung von Antikörpern kann eine Affinitätsmodulation hervorrufen und so intrazelluläre Signalwege aktivieren („*outside in signaling*“) (Takagi und Springer 2002).

1.2.1.1 Fibrinogenrezeptor $\alpha_{IIb}\beta_3$

Das β_3 -Integrin ist in eine aminoternale extrazelluläre und eine carboxyterminale zytoplasmatische Einheit aufgeteilt. Die extrazelluläre Einheit lässt sich aufteilen in α -Kopfstück und α -Beinstück. Das Kopfstück besteht hauptsächlich aus einem β -Propeller sowie einer eingefügten α -Einheit, die unterschiedliche Untereinheiten enthält. Das Kopfstück enthält die PSI-Domäne (*plexin-*

semaphorin-integrin) sowie I-EGF-1 (*epidermal growth factor*), das Beinstück enthält I-EGF-2 bis 4 (Humphries und Mould 2001). Auf dem Gen des β_3 -Integrins (*ITGB3*) liegt eine Punktmutation, die zu einem Aminosäureaustausch an Position 33 führt (Leu33Pro). Diese Punktmutation führt zur Bildung der Epitope HPA-1a und HPA-1b (siehe 1.2.3).

Der Fibrinogenrezeptor ($\alpha_{IIb}\beta_3$) ist der am häufigsten auf Thrombozyten exprimierte Glykoproteinkomplex (ca. 60.000 Kopien/Zelle) (Veldhuisen et al. 2014; Coller und Shattil 2008).

Im inaktivem Zustand sind die Bindungsstellen der Liganden blockiert, erst durch eine Aktivierung erfolgt eine Konformationsänderung und dadurch die Freigabe von hochaffinen Bindungsstellen für z.B. Fibrinogen (Chen et al. 2019).

Der $\alpha_{IIb}\beta_3$ Komplex, sowie der oben beschriebene Mechanismus spielen somit eine wichtige Rolle in der Adhäsion von Thrombozyten.

Relevant im klinischen Kontext ist $\alpha_{IIb}\beta_3$ unter anderem bei der Thrombasthenie Glanzmann, einer genetischen Erkrankung bei der dieser Glykoproteinkomplex qualitativ

oder quantitativ beeinträchtigt ist. Die gegebenenfalls verringerte Aggregation von Thrombozyten kann zu klinisch unterschiedlichen Blutungsereignissen führen (Nurden et al. 2013).

1.2.1.2 Vitronektinrezeptor $\alpha_v\beta_3$

Die β_3 Untereinheit bildet zusammen mit einer anderen α -Kette ein weiteres Heterodimer, den $\alpha_v\beta_3$ -Komplex. Die β_3 - und α_v - Untereinheit bilden mit ihrem aminoterminalen Ende den Kopf des Rezeptors (Xiong et al. 2001). Das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin kommt nur in geringer Anzahl auf Blutplättchen (ca. 400 Kopien/Zelle), allerdings vermehrt auf Endothel- (ca. 50.000 Kopien/Zelle) und glatten Muskelzellen vor (Veldhuisen et al. 2014). Der Rezeptor bindet neben Vitronektin auch andere RGD-haltige (Arginyl-glycyl-aspartic acid) Glykoproteine (Fibrinogen, Fibronektin, von-Willebrand-Faktor) und ist beteiligt an Angiogenese, Apoptose, sowie Migration von glatten Muskel- und Intimazellen (Charo et al. 1990).

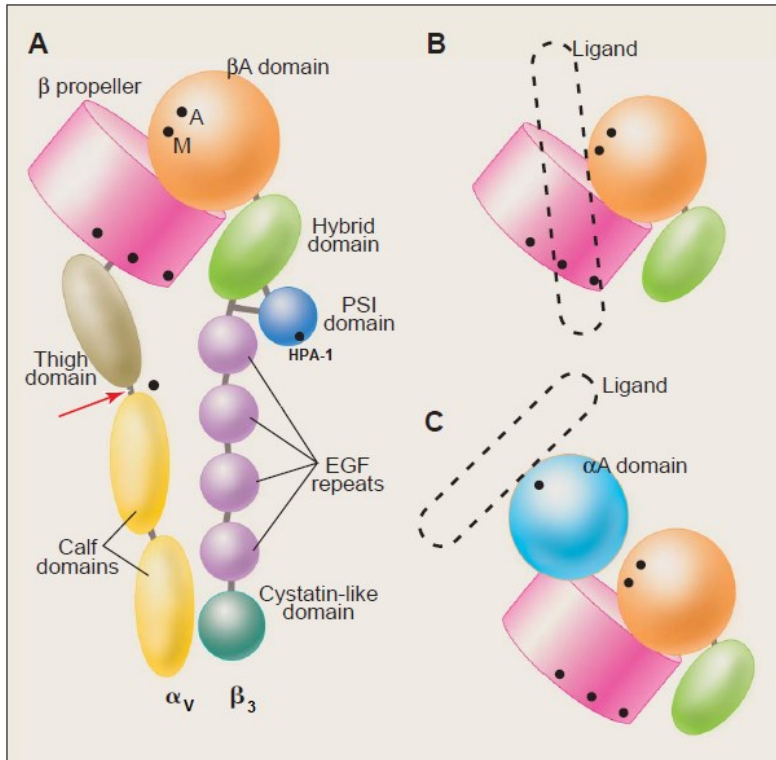


Abbildung A. Schematische Darstellung des $\alpha_v\beta_3$ -Komplexes. **A** Darstellung der verschiedenen Domänen. Kationenbindungsstellen sind mit schwarzen Punkten markiert. Rote Pfeile markiert das Gelenk des Glykoproteinkomplexes. **B** Liganden-Bindungstasche zwischen β -Propeller und β A-Domäne. **C** Kopfteil mit Ligandenbindung. Modifiziert nach Humphries et al. 2001 (Humphries und Mould 2001).

1.2.2 Humane Plättchenantigene (HPA)

Thrombozytäre Alloantigene können in zwei Typen eingeteilt werden. Typ I beschreibt Antigene, die auf fast allen Bluts- und Gewebezellen zu finden sind. Dazu gehören die Antigene des ABH-Systems – hauptsächlich auf Erythrozyten – sowie HLA-Klasse I Moleküle, die auf allen kernhaltigen Zellen und Thrombozyten exprimiert werden. Typ II Antigene befinden sich vor allem auf Thrombozyten und Megakaryozyten und bestehen aus Varianten der unterschiedlichen Glykoproteinkomplexe. Eine Immunisierung gegen thrombozytäre Alloantigene kann durch Schwangerschaft, Transfusion oder Transplantation erfolgen (Santoso und Kiefel 2001).

Das HPA-System ist eine Nomenklatur zur Erfassung thrombozytärer Alloantigene. Nach anfänglichen Verwechslungen und Doppelbenennungen wurde die Nomenklatur international systematisiert. Borne et al. schlugen vor, die biallelen Antigenysteme nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung zu nummerieren (Borne AEGK 1990). Anschließend wurden die beiden Allele der jeweiligen Systeme ihrer Häufigkeit nach mit dem Buchstaben a und b benannt. Es existieren nach heutigem Stand 36 humane Plättchen-Antigene (Platelet Antigen Database | HPA | Versiti 2022) von denen sechs biallelische Antigenysteme sind – darunter HPA-1, die

übrigen sind niedrig-frequente Antigene (Curtis und McFarland 2014).

1.2.3 Humanes Plättchenantigen 1 (HPA-1)

Antikörper gegen HPA-1a sind am häufigsten ursächlich für die fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT). Die ersten Alloantikörper dieses Systems wurde von van Loghem JJ 1959 und später von Shulman 1961 beschrieben (Shulman et al. 1961; van Loghem JJ et al. 1959). 1989 wurde die genetische Grundlage des HPA-1 Antigensystems aufgeklärt: Ein Austausch der Base Cytosin zu Thymin an der Position 176 der cDNA. Daraus resultiert ein Aminosäureaustausch von Leucin 33 zu Prolin 33 (Leu33Pro) des Glykoproteins β_3 (Newman et al. 1989). Eine Punktmutation ist in den meisten Fällen die genetische Grundlage der humanen Plättchen-Antigene. Dieser Polymorphismus definiert das Plättchenantigen HPA-1a (Leu33) und -1b (Pro33). In seltenen Fällen kann es auch zu einem Austausch von Leu33 zu Val 33 kommen (Santoso et al. 2006). Lokalisiert wurde das Epitop im Bereich der PSI-Domäne des β_3 -Komplexes (Zhi et al. 2018; Zhou et al. 2018).

Es wird kontrovers diskutiert, ob der Leu33Pro Austausch einen Effekt auf die räumliche Konformation oder die Struktur von β_3 hat (Zhou et al. 2018; Bennett et al. 2001). Die PSI-Domäne besteht aus einer Sequenz von 54 Aminosäuren, diese ist in fast alle Integrinen vorhanden und wenig verändert (Zhu et al. 2017). EGF-1 ist eine von vier EGF Domänen. EGF-1 hat im Vergleich zu den anderen drei statt 8 nur 6 Cysteinreste, die Disulfidbrücken bilden. So entsteht eine erhöhte Beweglichkeit in diesem Bereich (Shi et al. 2005). EGF-1 und PSI befinden sich räumlich gesehen in direkter Nachbarschaft, deswegen ist eine gemeinsame Funktion als Antikörperbindungsstelle möglich (Luo et al. 2007).

Abbildung B zeigt die Lokalisation der Antigene auf dem $\alpha_{IIb}\beta_3$ Glykoproteinkomplex. Eine Immunisierung gegen HPA-1a ist in der kaukasischen Bevölkerung mit ca. 80 % die häufigste Ursache für eine FNAIT (Sachs et al. 2021a).

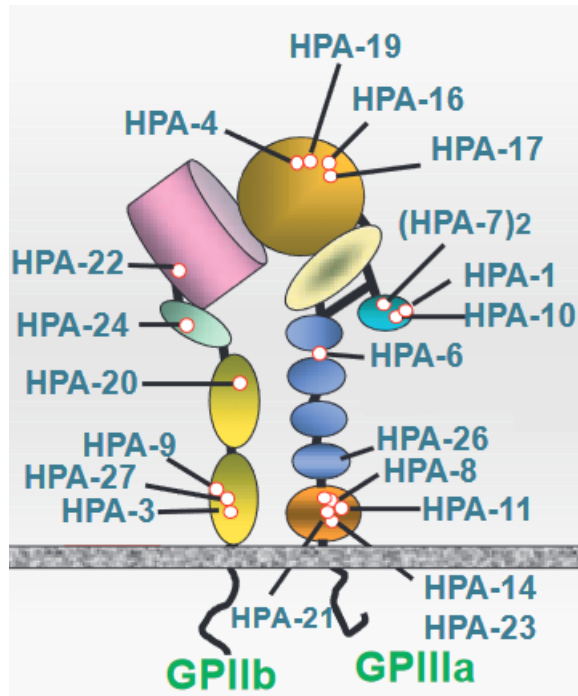


Abbildung B. Schematische Darstellung des $\alpha_{IIb}\beta_3$ Komplexes mit eingezeichneten Lokalisationen der HPA-Antigene. Mit freundlicher Genehmigung von Peterson et al. (Peterson et al. 2013)

1.3 Antikörper

Antikörper gehören zu der Immunglobulin Superfamilie (IGSF). Sie werden von Plasmazellen produziert und

sezerniert. Sie übernehmen wichtige Aufgaben in der adaptiven Immunabwehr.

Sie bestehen aus zwei gleichartigen schweren und zwei leichten Ketten in einer β -Faltblattstruktur, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und bilden so eine Y-förmige Struktur. Das N-Terminale Ende einer leichten und einer schweren Kette bildet die variable, Liganden-bindende Region. So liegen bei einem monomeren Antikörper zwei Bindungsstellen vor. Das C-Terminale Ende der leichten Ketten besteht aus einer konstanten Region. Das C-Terminale Ende der schweren Kette besteht aus mehreren konstanten Regionen und bildet hiermit den Fc-Teil des Antikörpers (siehe Abbildung C) (Stanfield und Wilson 2014). Diese konstanten Regionen werden genutzt, um die Immunglobuline in ihre verschiedenen Klassen einzuteilen: IgA, IgG, IgD mit jeweils drei konstanten Regionen, IgE und IgM mit jeweils vier konstanten Regionen (Schroeder und Cavacini 2010). Der Fc-Teil vermittelt die Effektorfunktion des Antikörpers. Über diesen wird unter anderem das Komplementsystem über C1q aktiviert oder eine spezifische Bindung mit einem Fc γ -Rezeptor eingegangen (Fiedler 2011)

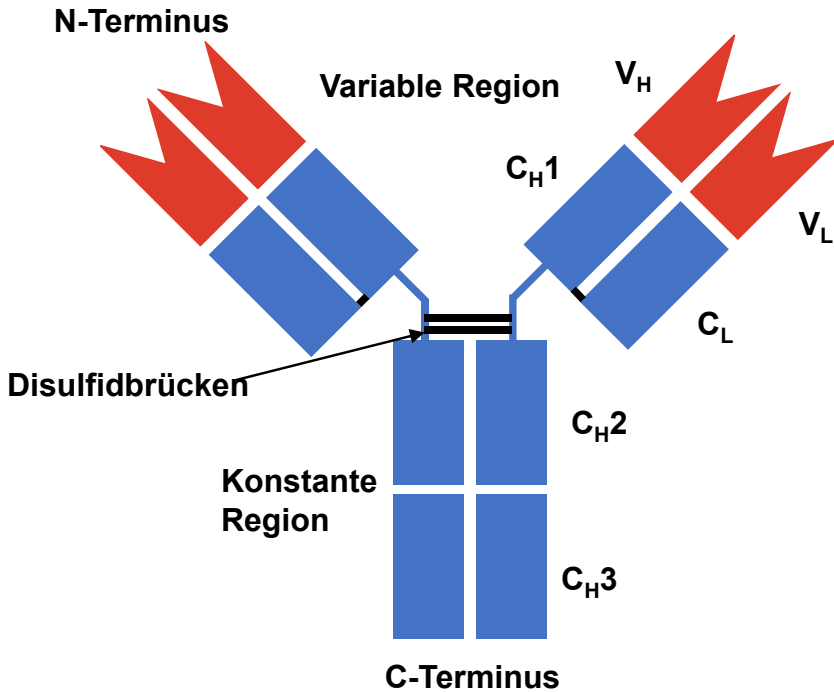


Abbildung C. Schematische Darstellung eines Antikörpers. Zu erkennen sind die beiden variablen Regionen am *N-Terminus* (rot), sowie die konstanten Regionen am *C-Terminus* (blau). Anteile mit *H* markiert zählen zu den schweren Ketten, *L* zu den leichten Ketten. Modifiziert nach Murphy et al. (Murphy 2009).

1.3.1 Immunglobulin G

Immunglobulin G ist das einzige der Immunglobuline, welches die Plazentaschranke durch aktiven Transport

passieren kann und so in den fetalen Kreislauf gelangt. IgG wird in verschiedene Subklassen IgG1 bis IgG 4 eingeteilt (Schroeder und Cavacini 2010). Sie unterscheiden sich grundsätzlich in der Länge ihrer Gelenkregion zwischen der konstanten Region C_H1 und C_H2. Die Anzahl der Aminosäuren sowie deren Sequenz (Primärstruktur) sind unterschiedlich (Papadea und Check 1989). So bilden sich auch mehr oder weniger Disulfidbrücken aus, wodurch die Flexibilität des Immunglobulins und damit die Effektorfunktion des Fc-Teils von Subklasse zu Subklasse variiert. So erklärt sich die unterschiedliche Affinität von Fcγ-Rezeptoren zu verschiedenen IgG-Subklassen (siehe 1.5.1, Tabelle 1) (Bruhns et al. 2009).

1.3.2 Anti-HPA-1a Antikörpersubtypen

Die Unterteilung von anti-HPA-1a Antikörpern in verschiedene Subtypen wurde von mehreren Autoren beschrieben (Fiore et al. 2021; Holzwarth et al. 2020; Bayat et al. 2019; Zhi et al. 2018; Thinn et al. 2018; Santoso et al. 2016). Hierbei wurden Antikörper, die das Epitop HPA-1a erkennen in ihrer Bindungsspezifität unterschieden. Typ I Antikörper gelten als komplexunabhängig (*complex*

independent) – sie binden an die PSI-Domäne der β_3 -Untereinheit. Typ II Antikörper benötigen zur Bindung einen Komplex aus PSI-Domäne und EGF-1, sie werden deshalb als komplexabhängig (*complex dependent*) bezeichnet (Holzwarth et al. 2020; Zhi et al. 2018). Typ III Antikörper beschreiben Immunglobuline, deren Epitop durch Verbindung einer β_3 -Untereinheit mit einer α -Untereinheit gebildet wird – sie werden als bindungsabhängig (*compound dependent*) bezeichnet (Fiore et al. 2021; Thinn et al. 2018; Santoso et al. 2016).

1.3.3 Glykosylierung

Das Anhängen von Zuckerresten an Proteinstrukturen wird als Glykosylierung bezeichnet. Die häufigste Form - die N-Glykosylierung – verbindet dabei enzymatisch einen Kohlenhydratrest mit einem Asparagin des zu glykosylierenden Proteins. Im Fall eines IgGs findet diese Glykosylierung unter anderem an den schweren Ketten des Fc-Teils statt (Asparagin 297). Verschiedene Zuckerreste können angehängt werden: N-Acetylglucosamin, N-Acetylneuraminsäure (Sialinsäure), Galactose, Fucose, Mannose, Glucose. Die Glykosylierung mit unterschiedlicher Zusammensetzung der

Kohlenhydratreste hat damit Einfluss auf die Struktur, die Bindungsaffinität und so auf die Funktion des Antikörpers (Murphy 2009; Wuhrer et al. 2009). Die Kohlenhydratreste an dieser Position sind direkt für die Affinität zu Fc-Rezeptoren verantwortlich (Vidarsson et al. 2014).

1.4 Monozyten

Monozyten sind Zellen der hämatopoetischen Stammzellreihe. Sie gehen aus der Vorläuferzelle *common myeloid progenitor* im Knochenmark hervor (Guilliams et al. 2018). Sie machen 10 % der Zellen im menschlichen Blut aus und gliedern sich in drei Subkategorien bezogen auf ihre CD-Antigene (Zhao et al. 2018). Den Großteil macht der klassische Subtyp mit etwa 90 % der zirkulierenden Monozyten aus (CD14⁺⁺ CD16⁻). Einen kleinen Anteil bildet der intermediäre Subtyp (CD14⁺⁺ CD16⁺), den Rest bezeichnet man als nicht klassischen Subtyp (CD14⁺ CD16⁺⁺) (Ziegler-Heitbrock et al. 2010).

Monozyten sind, neben anderen Zellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen, Teil des monozytären Phagozytose-System (MPS) (Guilliams et al. 2018).

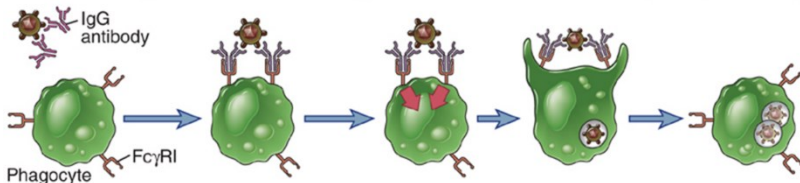
Sie sind an vielen Abläufen der adaptiven und angeborenen Immunabwehr beteiligt. Sie können immunmodulatorisch wirken, indem sie Cytokine und Chemokine wie IL-1, IL-6, TNF- α oder MIP- α 1 ausschütten. Weiterhin phagozytieren sie nicht nur Zellreste und körperfremde Krankheitserreger, sondern präsentieren auch Antigene, um das adaptive Immunsystem zu aktivieren (Dale et al. 2008).

1.5 Phagozytose

Als Phagozytose wird die Aufnahme von Zellen, Erregern und größeren Partikeln ($> 0,5\mu\text{m}$) in spezialisierte Phagozyten, wie Monozyten, Makrophagen oder neutrophile Granulozyten beschrieben. Zuerst entdeckt wurde die Phagozytose durch den – zum Teil in Gießen ausgebildeten - Zoologen Metchnikoff. Dieser beschrieb den Vorgang von Immunzellen, die Fremdkörper erkannten und diese einschlossen (Metchnikoff E. 1884).

Phagozytose ist ein u.a. rezeptorvermittelter Prozess, der die Erkennung von Zellen und Partikeln die phagozytiert werden sollen voraussetzt. Diese Erkennung funktioniert über *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) mit bestimmten Rezeptoren, wie den Toll-like Rezeptoren (TLR). Diese zur Erkennung genutzten Oberflächenmerkmale können z.B. Lipopolysaccharide (LPS) sein, die auf der Zellwand von Bakterien vorkommen (Uribe-Querol und Rosales 2020; Flannagan et al. 2012). Spezifische Fc γ -Rezeptoren der Phagozyten binden wiederum den Fc-Teil der IgGs, welche ein Antigen gebunden haben und können so die opsonierten Zellen oder Partikel besser aufnehmen (Nimmerjahn und Ravetch 2008b; Jefferis und Lund 2002).

In Abbildung D sind die ersten Schritte der Fc-rezeptorvermittelten Phagozytose dargestellt: Zunächst findet die Opsonierung des Partikels oder Erregers durch Antikörper statt. Anschließend binden die Fc-Teile der Antikörper an Fc-Rezeptoren der Phagozyten. Die Fc γ -Rezeptoren vernetzen sich daraufhin und bilden Cluster. Sie starten eine intrazelluläre Signalkaskade, die über verschiedene biochemische Prozesse zu einer Veränderung des Zytoskelettes führt – zu einer Polymerisation von Actin (Flannagan et al. 2012). Durch diese strukturelle Veränderung bilden sich Pseudopodi aus und die Membranoberfläche, die mit ihren Rezeptoren den Liganden bindet, wird vergrößert. Es kommt zu einer Selbstverstärkung der Signalkaskade (Triantafilou et al. 2002), woraufhin sich eine Einstülpung in der Plasmamembran bildet, in die der opsonierte Partikel oder Erreger aufgenommen wird. Die Einstülpungen der Plasmamembran schnüren sich nach intrazellulär ab und bilden ein saures, zytoplasmatisches Phagosom (pH 3,5 – 4)(Murphy 2009).



Abbas et al: Cellular and Molecular Immunology, 7e.
Copyright © 2012, 2007, 2005, 2003, 2000, 1997, 1994, 1991 by Saunders, an imprint of Elsevier Inc.

Abbildung D. Fc γ -rezeptorvermittelte Phagozytose.
Schematische Darstellung der Fc γ -Rezeptorvermittelten Phagozytose. Mit freundlicher Genehmigung von Abbas et al 2015 (Abbas et al. 2015).

1.5.1 Fc γ -Rezeptoren

Anderson et al. haben 1990 drei verschiedene Klassen von Fc γ -Rezeptoren beschrieben. Sie alle binden den Fc-Teil von Immunglobulinen, allerdings mit jeweils anderer Spezifität. Die Arbeitsgruppe charakterisierte Fc γ R I (CD64) und II (CD32), welche auf allen Phagozyten zu finden waren und Fc γ R III (CD16), welche vor allem auf Makrophagen und neutrophilen Granulozyten zu finden waren (Anderson et al. 1990).

Die Fc γ -Rezeptoren gehören durch ihren Ig-ähnlichen Aufbau zur Ig-Superfamilie. Ihre extrazelluläre Bindungsdomäne besteht aus drei (Fc γ R I) bzw. zwei (Fc γ R II & III) Polypeptidketten, die sich zu einem Ig-ähnlichen β -Faltblatt falten (Sondermann et al. 1999). Die

Domänen stehen in einem 70°-Winkel zueinander, sodass sich eine herzförmige Struktur bildet. Die konservierte extrazelluläre Struktur ist bei allen drei Typen ähnlich, sie unterscheiden sich allerdings in der membranösen Verankerung (GPI-Anker) und den intrazellulären Domänen. Die intrazellulären Domänen bei FcγR IIIB fehlt ganz, dieser ist mit einem GPI-Anker in der Membran befestigt. Die intrazellulären Bestandteile der anderen Fcγ Rezeptoren unterscheiden sich hauptsächlich durch unterschiedliche Immunrezeptordomänen (ITAM oder ITIM). ITAM (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) ist dabei eine Domäne die durch Phosphorylierung zu einer Aktivierung der Zelle führt, ITIM (*Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) bewirkt eine Inhibierung (Kerntke et al. 2020). FcγR I und FcγR IIIA besitzen zwei bzw. drei ITAM-Domänen. FcγR IIA und -C weisen je eine ITAM-Domäne auf. FcγR IIB ist der einzige dieser drei Fcγ Rezeptoren mit einer ITIM-Domäne (Dekkers et al. 2017; Bruhns et al. 2009).

Hinzukommen unterschiedliche Isoformen, wie FcγRIIIA und B, sowie unterschiedliche Allel-Varianten, z.B. NA1 und NA2 des FcγRIIIB (Nimmerjahn und Ravetch 2008a; Radaev et al. 2001).

Ein wichtiger Aspekt ist die unterschiedliche Expression der Fcγ-Rezeptoren auf Leukozyten. Auf klassischen Monozyten sind die beiden FcγR I und IIa in ähnlicher Menge exprimiert. Nicht klassische Monozyten bilden überwiegend FcγR III aus, allerdings auch FcγR IIa. Neutrophile Granulozyten exprimieren primär FcγR IIIB und genau wie Eosinophile auch eine geringe Menge an FcγR IIa. B-Zellen sind die einzigen Leukozyten, die FcγR IIb exprimieren (Kerntke et al. 2020). Die Affinität zu verschiedenen Liganden der einzelnen Fcγ-Rezeptorklassen unterscheidet sich trotz der homologen Extrazellulärstruktur. FcγR I hat eine wesentlich höhere Affinität zu IgG, als Fcγ II oder III, dies wird der dritten Ig-ähnlichen Bindungsdomäne zugesprochen (Sondermann et al. 1999). Zudem unterscheiden sich ihre Affinitäten zu den unterschiedlichen IgG-Subklassen, wie in Tabelle 1 gezeigt (Ackerman et al. 2011; Hulme und Trevethick 2010; Bruhns et al. 2009).

Rezeptor	IgG - Affinität
FcγR I	IgG1 = IgG3 = IgG4
FcγR IIa	IgG3 = IgG1 > IgG4 ≥ IgG2
FcγR IIb	IgG3 > IgG1 = IgG4
FcγR IIIa	IgG3 ≥ IgG1 > IgG4 > IgG2
FcγR IIIb	IgG3 = IgG1

Tabelle 1 Affinität der verschiedenen Fcγ-Rezeptoren. Gezeigt sind die Affinitäten von humanen IgG-Subklassen (komplexgebunden) gegenüber humaner Fcγ-Rezeptoren. Modifiziert nach Bruhns (Bruhns et al. 2009).

1.6 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es die methodische Grundlage für einen funktionellen Test zu entwickeln, der es möglich macht, die Ausprägung der fetalen Thrombozytopenie bei vorliegender maternaler Immunisierung gegen HPA-Antigene vorherzusagen. Bisher konnte ausgehend von serologischen Tests keine sichere Aussage über den Schweregrad der Thrombozytopenie getroffen werden (Kjaer et al. 2019; Mawas et al. 1997).

Als Grundlage wurde der von Takahashi et al. beschriebene *in vitro* Thrombozyten-Phagozytostest zum

Nachweis von anti-HLA Klasse I Antikörpern eingesetzt (*flow cytometric monocyte-based phagocytosis assay* - FMPA) (Takahashi et al. 2018, 2017). Mit diesem Monozyten-basierten Phagozytoseassay soll die Antigen-spezifische Phagozytose von verschiedenen anti-HPA-1a Antikörpersubtypen untersucht werden, um eine Aussage über deren Rolle bei der Induktion einer fetalen Thrombozytopenie treffen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Humane Blutzellen

Die Gewinnung der untersuchten Monozyten und Thrombozyten erfolgte aus Restblut von Vollblutspendern und Thrombozytenspendern des UKGM Gießen, Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin. Die Entnahme von Blutresten wurde durch das Ethikkomitee der Justus-Liebig-Universität Gießen, Medizinische Fakultät genehmigt (Ethikvotum: #05/00).

2.1.2 Labormaterial

Tabelle 2 Labormaterial

Name	Hersteller
96 – Mikrotiterplatte, <i>flat Bottom</i>	Sarstedt, Nürnberg, D
Pipettenspitzen 1000 µl; 200 µl	Sarstedt, Nürnberg, D
Pipettenspitzen 100 µl; 10 µl	Sarstedt, Nürnberg, D

Pipettenspitzen 10 μl; 1 μl	Sarstedt, Nümbrecht, D
FACS Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Eppendorf Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Transferringpipetten 3,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Falcon Röhrchen (15 ml und 50 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, A
Röhrchen 13 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Polypropylen Röhrchen 4,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipetten 1000 μl; 200 μl; 20 μl; 10 μl	Eppendorf, Hamburg, D
HandyStep Multipipette	BRAND, Wertheim, D

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3 Chemikalien

Name	Hersteller
Prostaglandin E₁	Sigma-Aldrich, Missouri, US
PBS 1x	Anprotec, Bruckberg, D
HBSS 1x	Anprotec, Bruckberg, D
Titriplex	Merck, Darmstadt, D
HEPES Buffer Solution	Gibco Life Technologies, Carlsbad, US
RPMI 1640	Anprotec, Bruckberg, D
RPMI 1640 ohne Phenol-Rot	Thermo Fischer, Waltham, US
Fetales Kälberserum (FCS)	Anprotec, Bruckberg, D
Trypsin (Tryp LE)	Life Technologies, Carlsbad, US
HBSS + CaCl₂ + MgSO₄	PAN Biotech, Aidenbach, D
pHrodo Red, SE	Thermo Fischer, Waltham, US
Lymphocyte Seperation Media	Anprotec, Bruckberg, D
FC Block: Gamunex 10 % (100 mg/ml)	Grifols, Barcelona, ES
Anticoagulant Citrate Dextrose Solution A (ACD-A)	Terumo BCT, Inc., Lakewood, US

Sytox Blue Nucleic Acid Stain	Thermo Fischer, Waltham, US
pHrodo <i>E.Coli</i> BioPaticles	Thermo Fischer, Waltham, US
Hoechst 33342 Staining Dye Solution	Abcam, Cambridge, UK
Percoll	Sigma-Aldrich, Saint Louis, US

2.1.4 Pufferlösungen

Tabelle 4 Pufferlösungen

Name	Zusammensetzung
Prostaglandin E₁/PBS/EDTA (P/E/P)	500 ml PBS 1x 1,86 g Titriplex 50 µl PGE1 (1 mg/ml)
PBS/EDTA/Trypsin	1M PBS/EDTA 0,5 % Trypsin
RPMI1640/HEPES/FCS	36 ml RPMI1640 1 % HEPES Buffer Solution 10 % FCS

2.1.5 Antikörper

Tabelle 5 Antikörper

Hersteller	Fluorochrom	Subklasse	Spezies	Klon	Name
BioLegend , San Diego, US	APC	IgG1	Maus	HLA- Klasse I	63D3 (Anti CD-14)
Thermo Fischer, Waltham, US	'	IgG2a	Maus	β 2 - Mikroglobu lin	eBM2a
Thermo Fischer, Waltham, US	'	IgG2a	Maus	HLA-ABC	W6/32
BioLegend , San Diego, US	'	IgG1	Maus	α v β 3 Integrin	23C6
Beckman Coulter, Krefeld, D	'	IgG1	Maus	HPA-1a	SZ21

26.4	HPA-1a	Human	IgG3	,	Prophylax Pharma, Tromsø, Norwegen
B2G1	HPA-1a	Human	IgG1	,	Freundlich erweise bereitgeste Ilt vom Blood Center of Wisconsin, US

2.1.6 Fluoreszenzfarbstoffe Durchflusszytometrie

der

Tabelle 6 Genutzte Fluoreszenzen mit dem zugehörigen FACS-Kanal

Fluoreszenzfarbstoffe	Kanal im FACS
Sytox-Blue	Pacific-Blue
APC	APC
pHrodo	PE

2.1.7 Geräte

Tabelle 7 Geräte

Name	Hersteller
FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg, D
Automatischer Hämatologie- Analysator KX-21N	Sysmex Deutschland, Norderstedt, D
Zentrifuge Rotina 380	Hettich, Kirchlengern, D
Zentrifuge Rotina 380R	Hettich, Kirchlengern, D
Zentrifuge Biofuge primo	Thermo Fischer, Waltham, US
Fluoreszenzmikroskop XI 81	Olympus, Hamburg, D

2.1.8 Software

Tabelle 8 Software

Name	Hersteller
FlowJo	BD Biosciences, Heidelberg, D
BD FACS Diva	BD Biosciences, Heidelberg, D
Office 2016	Microsoft, Redmond, US
Prism 7 bzw. 8	GraphPad Software, La Jolla, US
cellSens Dimension 1.6	Olympus, Hamburg, D

2.2 Methodik

2.2.1 Blutentnahme

Die Blutproben konnten dankenswerter Weise von gesunden Spendern des Instituts für Klinische Immunologie, Transfusionsmedizin und Hämostaseologie, UKGM Gießen gewonnen werden. Es wurde ACD-A (*Acid-Citrate-Dextrose Solution A*) Blut entnommen.

2.2.2 Isolierung von Thrombozyten

Ein Röhrchen mit ACD-A antikoaguliertem Blut (ca. 8,4 ml Vollblut) wurde bei 450 g für 5 Minuten zentrifugiert. 1 ml Überstand Plättchenreiches Plasma (PRP) wurde vorsichtig abgehoben (um Erythrozyten-Kontamination zu vermeiden) und in ein neues Röhrchen überführt. Eine Probe (ca. 70 μ l) wurde für die Zellzahlbestimmung (automatischer Hämatologie-Analysator) entnommen. Anschließend wurden ca. 930 μ l PRP mit 5-7 ml Prostaglandin E₁/EDTA/PBS (Ethylene diamine tetraacetic acid) (P/E/P) Puffer gewaschen und für 10 Minuten bei 800 g zentrifugiert. Nach diesem Waschschrift wurde die Konzentration der Thrombozyten mit P/E/P Puffer auf

$7,5 \times 10^8$ /ml eingestellt um sie mit dem Farbstoff „pHrodo Red SE“ zu markieren.

2.2.3 Markierung der Thrombozyten mit pHrodo und Opsonierung mit Antikörpern

pHrodo ist ein Zellmembran-durchdringender Farbstoff, der im pH neutralen Bereich nicht fluoresziert. Im sauren pH-Bereich jedoch emittiert pHrodo Licht im Wellenlängenbereich 585nm, nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 560nm. pHrodo markierte Thrombozyten fluoreszieren erst nach Aufnahme (Phagozytose) in das saure Milieu (pH 3,5-4) der Lysosomen (siehe Abbildung I) Ein Aliquot von 540 μ l gewaschenen Thrombozyten ($7,5 \times 10^8$ /ml) wurde mit 60 μ l pHrodo (insgesamt 1:3.000 verdünnt) gemischt und für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die markierten Thrombozyten wurden mit 5-7 ml P/E/P Puffer gewaschen (10 Min bei 800g), danach wurde die Konzentration mit P/E/P Puffer auf 1×10^8 /ml eingestellt.

Die Testantikörper (0,2 mg/ml) wurden in 10 μ l, 1 μ l, 0,1 μ l und 0,1 μ l (1:10 verdünnt) Portionen aufgeteilt und jeweils mit pHrodo gefärbter Thrombozytensuspension auf 200 μ l

aufgefüllt. Die Endkonzentrationen der eingesetzten Test-Antikörper entspricht somit 10 µl/ml; 1 µl/ml; 0,1 µl/ml; und 0,01 µl/ml. Die Kontroll-Antikörper W6/32 (Positivkontrolle Subklasse: IgG2a) (0,1 mg/ml) und Isotyp IgG2a (Negativkontrolle) (0,01 mg/ml) wurden jeweils in 20 µl Portionen zu je 180 µl pHrodo gefärbter Thrombozytensuspension pipettiert (Endkonzentration W6/32: 10 µg/ml; Isotyp: 1 µg/ml). Die Ansätze inkubierten dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Danach wurden die beladenen Thrombozyten zweimal mit 3 ml P/E/P Puffer gewaschen (10 Minuten bei 800 g). Nach dem zweiten Waschschrift wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit je 100 µl HBSS-Puffer (*Hanks balanced salt solution*) (CaCl₂: 4,6 mmol/L und mit MgSO₄: 4 mmol/L) resuspendiert, um eine Endkonzentration von 2x10⁸/ml zu erreichen.

2.2.4 Isolierung von Monozyten

Einfache Dichtegradienten-Zentrifugation

Die übrigen Blutproben wurden nun vorsichtig auf zwei 50 ml-Röhrchen mit je 15 ml Trennmedium (Ficoll) geschichtet. Nach Zentrifugation für 20 Minuten bei 400 g

entstanden drei Schichten. Zwischen der zweiten und dritten Schicht befand sich die weiße PBMC-Fraktion (*Peripheral blood mononuclear cells*). Diese Fraktion wurde vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette abgenommen, in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt, und mit 50 ml PBS (*Phosphate buffered saline*) bei 400 g für 5 Minuten gewaschen. Dieser Waschvorgang wurde mit 30 ml PBS wiederholt. Die PBMC wurden in 1 ml RPMI1640 Medium mit 10 %FCS (*Fetal calf serum*) und 1 %HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) resuspendiert und nach Bestimmung der Monozytenausbeute auf eine Zellzahl von 2×10^7 Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden die PBMC in einer 96-Mikrotiterplatte (Flachboden) ausgesät (200 μ l pro Vertiefung). Bei 10 % Anteil Monozyten der PBMC enthält jede Vertiefung ca. 400.000 Monozyten. Nach einer Stunde Inkubation im Brutschrank (37°C; 5 % CO₂) adhären die Monozyten am Boden der Mikrotiterplatte und wurden mit 200 μ l warmem HBSS-Puffer vorsichtig gespült. Im darauffolgenden Schritt wurde 50 μ l HBSS (mit CaCl₂: 4,6 mmol/L und MgSO₄: 4 mmol/L) auf die adhärenen Monozyten pipettiert.

Doppelte Dichtegradienten-Zentrifugation

Die Monozyten wurden durch einen zweifachen Dichtegradienten (Ficoll und Percoll) isoliert. Hierzu wurden die PBMC in einem ersten Schritt mit einem Ficoll-Gradienten isoliert (siehe oben). Die Zellen wurden dann mit 20 ml RPMI1640 (ohne Phenol-Rot) resuspendiert.

Für den zweiten Dichtegradienten wurden 23,13 ml Percoll (Dichte 1,131 g/ml) mit 1,87 ml 10-fach PBS vorbereitet. Von dieser Lösung wurden 23 ml entnommen und mit 27 ml RPMI 1640 (mit Phenol-Rot und 10 % FCS) versetzt. Daraufhin wurden 25 ml der Percoll-Lösung in ein 50 ml Röhrchen überführt und die PBMC vorsichtig darauf geschichtet. Der Farbunterschied der beiden Lösungen zeigte eine deutliche Zweischichtung. Danach folgte eine Zentrifugation bei 550 g für 30 Minuten. Die PBMC wurden entnommen, gewaschen, und danach ebenfalls in 1 ml RPMI1640 Medium mit 10 % FCS und 1 % HEPES resuspendiert. Im Anschluss wurde die Monozytenausbeute bestimmt.

2.2.5 Phagozytose

Zu den adhärenzten Monozyten wurden 50 µl mit Antikörpern beladenen und mit pHrodo markierte Thrombozyten (2×10^8 /ml) gegeben. Da 50 µl HBSS-Puffer bereits vorgelegt wurden, lag die Endkonzentration der Thrombozyten pro Vertiefung bei 10^8 /ml (Absolut: 10^7 Thrombozyten pro Vertiefung). Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen von der Mikrotiterplatte abgelöst.

2.2.6 Zellernte und Präparation

Vor dem Ablösen der Zellen wurde die Mikrotiterplatte ausgeschlagen, um den Restpuffer vollständig zu entfernen. In jede Vertiefung wurden 100 µl 1mM PBS/EDTA/Trypsin für 5 Minuten bei 37°C und 5 % CO₂ zugegeben. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl Serum (RPMI1640/FCS/HEPES) gestoppt. Durch mehrfaches, kräftiges auf und ab pipettieren wurden die adhärenzten Zellen abgelöst und danach in ein FACS-Röhrchen (*Fluorescence Activated*

Cell Sorting) überführt. 10 µl Gamunex wurden hinzugefügt und für 10 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Gamunex enthält eine breite Mischung an Immunglobulinen, die die Fcγ-Rezeptoren der Monozyten blockieren und so unspezifische Signale im Durchflusszytometer verhindern. Anschließend wurden die Monozyten für 30 Minuten auf Eis im Dunkeln mit einem fluoreszenzmarkierten anti-CD14 Antikörper inkubiert. Nach Waschen mit 3-4 ml PBS bei 4°C (450 g; 5 Minuten) wurde der Überstand abgekippt und das Zellpellet in ca. 100 µl PBS resuspendiert (Vortex). Danach wurden nicht vitale Bestandteile (Zellbestandteile, tote Zellen) durch Färbung mit 1 µl Sytox-Blue markiert und die vitale Zellpopulation mittels Durchflusszytometrie analysiert.

2.2.7 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie besteht darin, die zu analysierenden Zellen in einem gerichteten Flüssigkeitsstrom einzeln an einem orthogonal dazu ausgerichteten Laserstrahl einer bestimmten Wellenlänge vorbei fließen zu lassen. Dieser Laserstrahl trifft auf jede Zelle und wird reflektiert bzw. gestreut. An zwei

verschiedenen Stellen wird nun das Streulicht des Lasers detektiert; das sogenannte Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC), gibt Auskunft über die Größe und Form einer Zelle und das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) über die Granularität der Zelle. Je nach Ausstattung des Gerätes gibt es zusätzlich mehrere Kanäle zur Detektion von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, die genutzt werden, um Oberflächenmerkmale auf Zellen zu erkennen. Diese müssen zunächst mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert werden. Abbildung E zeigt die Funktionsweise eines Durchflusszytometers. Hier emittieren mit 6D3 (anti-CD14 Antikörper) markierte, CD14-positive Monozyten bei einer Wellenlänge von 660 nm und die mit pHrodo markierten Thrombozyten bei 585 nm Licht. So können einzelne Zellpopulationen voneinander abgegrenzt und gesondert untersucht werden.

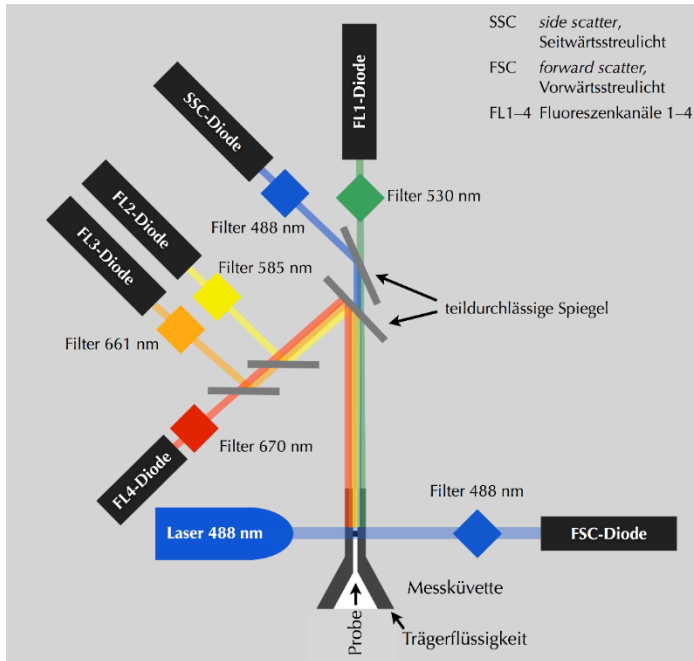


Abbildung E. Schematische Darstellung des optischen Apparates eines Durchflusszytometers. Zu erkennen sind der Laser, der Licht einer bestimmten Wellenlänge auf die Messküvette wirft. Dahinter der FSC-Detektor, sowie über einen Spiegel der SSC-Detektor. Zusätzlich dargestellt sind vier Kanäle zu Erkennung von Fluoreszenzfarbstoffen (FL1 – FL4) (Durchflusszytometrie – Fabian K. (Diskussion) - Eigenes Werk 2022). Grafik mit Creative Commons Lizenz 3.0 UK.

2.2.8 Automatische Zellzählung im KX-21N (Sysmex)

Zur Zählung der Thrombozyten und PBMC wurde der automatische Hämatologie-Analysator *KX-21N* genutzt. Die Messung der Zellzahl und Diskriminierung in einzelne Populationen basiert auf einer Impedanzmessung. Die Zellen werden einzeln durch einen Kanal geleitet, in dem eine Wechselfspannung angelegt ist. Die Zellen, die diesen Kanal passieren weisen eine höhere Impedanz auf als die Suspensionsflüssigkeit, dadurch kommt es zu einer Spannungsänderung. Die Höhe der Spannungsänderung korreliert mit dem Volumen der Zelle, so können neben der Zellzahl auch qualitative Aussagen über die Zellen gemacht werden. In Arbeitsschritten, in denen die Bestimmung einer Zellzahl – Monozyten oder Thrombozyten – nötig war, wurden 60 µl der Zellsuspension analysiert. Eine Berechnung der Zellkonzentration erfolgte automatisch.

2.2.9 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Visualisierung des Prozesses wurde die Phagozytose wie oben beschrieben durchgeführt und mit

Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie dargestellt (100fache Vergrößerung). Die Zellen wurden in einer 24-Mikrotiterplatte ausgesät. Die mit pHrodo markierten, phagozytierten Thrombozyten stellten sich dann durch Emittieren von Licht der Wellenlänge 585 nm als rot-orange dar. Die Monozyten wurden mit Hoechst 33342 markiert (ein Farbstoff, der die DNS der Zellkerne färbt) und emittierte blaues Licht der Wellenlänge 461 nm (siehe Abbildung H).

2.2.10 Statistik

Die statistische Auswertung der Versuche erfolgt mit dem Programm *GraphPad Prism* Version 7 bzw. 8. Zur Berechnung der Signifikanz wurde ein ungepaarter T-Test oder ein einfaktorieller ANOVA angewendet.

3 Ergebnisse

3.1 Erläuterung der Versuchsstrategie

In einer Mikrotiterplatte wurden nach den oben beschriebenen Verfahren (2.2.2 – 2.2.5) Zellen für eine Doppelbestimmung in 12 Vertiefungen ausgesät (siehe Abbildung F). In den ersten vier Reihen wurden Thrombozyten mit dem zu testenden Antikörper in vier verschiedenen Konzentrationen (10 µg/ml; 1 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,01 µg/ml) vorgelegt. In der fünften (positive Kontrolle) und sechsten (negative Kontrolle) Reihe wurden die Thrombozyten mit dem monoklonalen Antikörper

W6/32 (IgG2a; 10 µg/ml) beziehungsweise mit der Isotyp-Kontrolle (IgG2a; 1 µg/ml) gegeben.

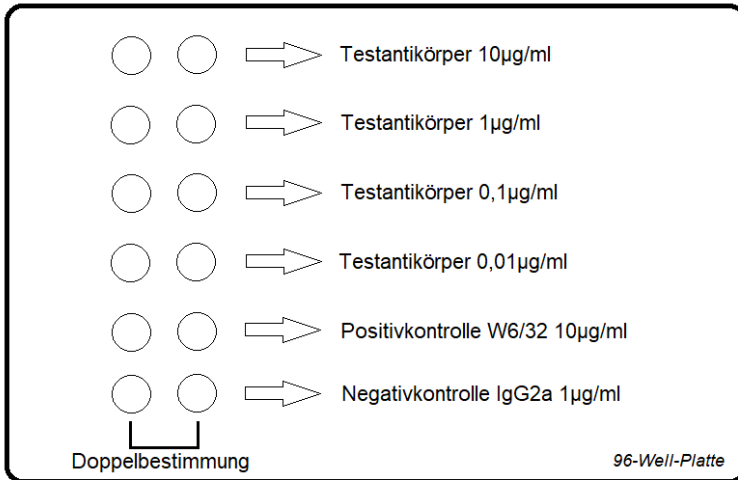


Abbildung F. Versuchsaufbau. Schematische Darstellung der Aussaat auf einer 96-Mikrotiterplatte.

W6/32 ist ein muriner monoklonaler Anti-HLA Antikörper (Subklasse IgG2a) gegen das HLA Klasse I Molekül, welches auf fast allen körpereigenen Zellen exprimiert wird. Thrombozyten besitzen eine hohe Dichte des HLA Antigens auf ihrer Oberfläche. Der Antikörper W6/32 wurde deshalb als Positivkontrolle für diesen Versuch eingesetzt, um zu zeigen, dass die antikörpervermittelte Phagozytose in diesem Assay dargestellt werden kann. Die

Negativkontrolle IgG2a ist eine Isotypkontrolle für die Subklasse IgG2a. In dieser Isotypkontrolle sind Immunglobuline der Subklasse IgG2a enthalten, die keine spezifische Bindungsaffinität besitzen. Auf diese Weise kann das Ausmaß nicht Antigen-spezifischer Phagozytose in den durchgeführten Versuchen dargestellt werden.

3.2 Adhärente Monozyten phagozytieren opsonierte Thrombozyten

Für die Analyse der phagozytierenden Monozyten wurde eine *Gating*-Strategie (Auswahl von zu analysierenden Zellen) mit der Software BD FACS Diva entwickelt (siehe Abbildung G). Zuerst wurden alle gemessenen Ereignisse in einem *Scatterplot* dargestellt (Threshold FSC: 25.000) (Abb. G A). Danach wurden in dieser Zellpopulation, die vitalen Zellen und die nicht vitalen Zellen bzw. Zellbestandteile durch den Farbstoff Sytox-Blue differenziert. Die Sytox-Blue gefärbten, nicht vitalen Zellen bzw. Zellbestandteile sind in dem entsprechenden Kanal (Pacific-Blue) zu finden, und wurden im weiteren Prozedere nicht berücksichtigt (Abb. G B). Im nächsten Schritt wurden die vitalen Zellen nach dem Merkmal CD14 differenziert. Die Monozyten, die mit einem APC markierten

anti-CD14 Antikörper gefärbt wurden, zeigten sich im APC-Kanal (Abb. G C). Die Monozyten, die pHrodo markierten Thrombozyten phagozytiert hatten, ließen sich im PE-Kanal detektieren.

Hier wurde exemplarisch ein Phagozytoseexperiment mit dem monoklonalen Antikörper W6/32 [10 µg/ml] gegen HLA Klasse I (Abb. G D) und der Isotypkontrolle [1 µg/ml] dargestellt (Abb. G E). Die Zellpopulation, die sowohl im APC- als auch im PE-Kanal (Doppelmarkierung) positiv war, entspricht den Monozyten, die Thrombozyten phagozytiert haben. Das *Gate* in der Isotypkontrolle (siehe Abbildung G E) wurde in jedem Versuch so ausgerichtet, dass die Phagozytoserate nicht unter 0,8 % und nicht über 1,2 % lag. Mit demselben *Gate* wurden dann die übrigen Testantikörper und die Positivkontrolle dieser Versuchsreihe ausgewertet.

Ergebnisse

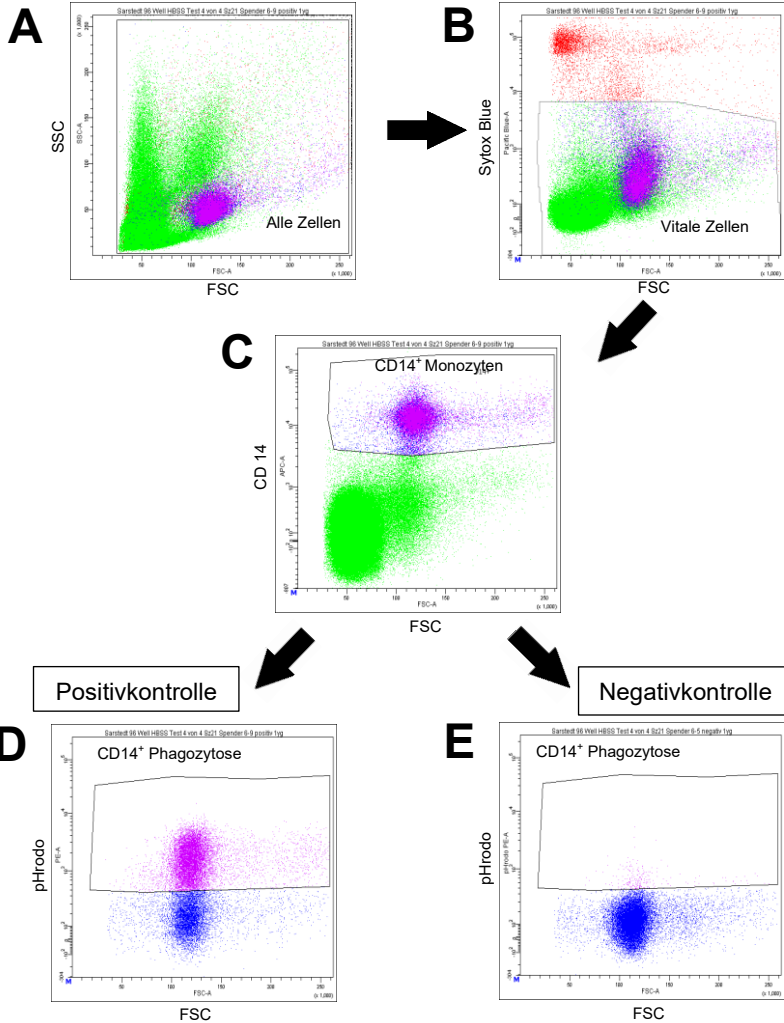


Abbildung G. Adhärenente Monozyten phagozytieren opsonierte Thrombozyten. Adhärenente Monozyten wurden mit opsonierten, pHrodo gefärbten Thrombozyten inkubiert und nach Ablösung durchflusszytometrisch analysiert. **A** Im Forward Scatter (FSC) und Side Scatter (SSC) aufgetragene Punktwolke mit allen analysierten Ereignissen (violett: CD14+ Monozyten mit phagozytierten Thrombozyten, grün: alle CD14- Zellen). **B** Alle Ereignisse aufgetragen im FSC und Sytox Blue (rot: nicht vitale Zellen, Zelltrümmer). **C** Alle vitalen Zellen aufgetragen im FSC und CD-14-Merkmal (blau/violett: CD14+ Monozyten). **D/E** Alle CD14+ Zellen aufgetragen im FSC und pHrodo-Kanal. Positivkontrolle: anti-HLA Klasse I opsonierte Thrombozyten; Negativkontrolle: Isotypkontrolle IgG2a. (violett: CD14+ Zellen, die pHrodo markierte Thrombozyten phagozytiert haben; blau: CD14+ Zellen, die keine pHrodo markierten Thrombozyten phagozytiert haben).

3.3 Mikroskopische Darstellung der monozytären Phagozytose von pHrodo markierten Thrombozyten

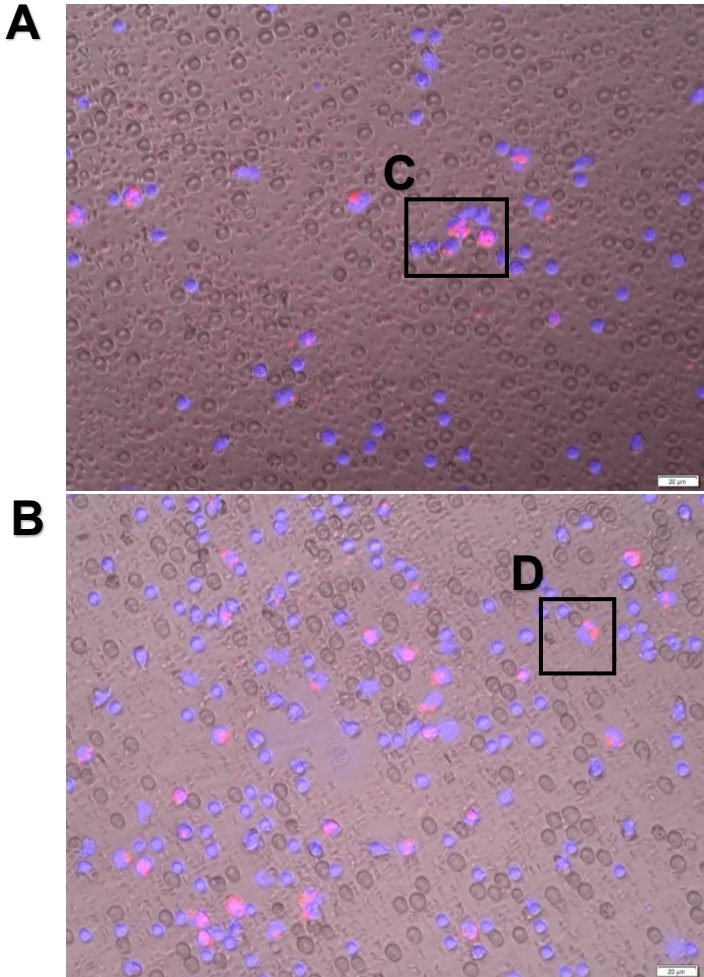


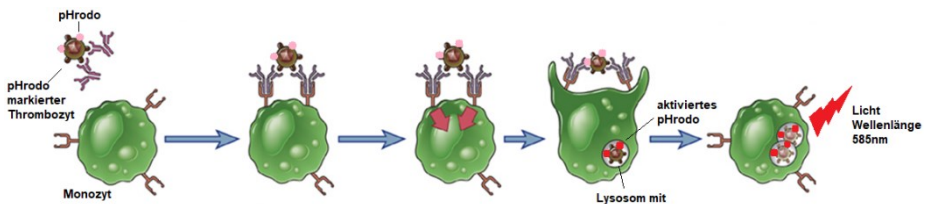
Abbildung H. Mikroskopische Darstellung monozytärer Phagozytose von opsonierten Thrombozyten in 100-facher Vergrößerung. A Ausschnitt 1. **B** Ausschnitt 2. **C** und **D** Markierungen in beiden Ausschnitten von Phagozyten, die mehrere Thrombozyten internalisiert haben. Die Monozyten wurden mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33342 angefärbt, ihre Zellkerne stellen sich blau dar. Thrombozyten wurden mit pHrodo gefärbt und stellen sich rot dar, wenn sie phagozytiert wurden. Die mikroskopischen Aufnahmen sind aus einem Experiment mit zwei technischen Replikaten entstanden.

Der dieser Arbeit zugrunde liegende Phagozytoseassay wurde einmalig unter mikroskopischer Kontrolle (2.2.9) durchgeführt (siehe Abbildung H) um den Vorgang zu visualisieren.

Zu erkennen sind blau markierte Zellkerne (Monozyten, Lymphozyten, Granulozyten etc.) und in einigen Fällen eine Überlagerung dieses blauen Farbsignals mit einem roten. Das rote Farbsignal entspricht den phagozytierten Thrombozyten. Das Emissionsspektrum des Fluoreszenz-Farbstoffs pHrodo wurde durch das saure Milieu (pH 3,5-4) (Murphy 2009) der Phagolysosomen verändert und konnte daher detektiert werden. Außerdem zu erkennen sind kernlose Zellen ohne Farbsignal – wahrscheinlich Erythrozyten -, sowie Thrombozyten, die nicht phagozytiert

wurden. Die Funktionsweise von pHrodo ist in Abbildung I dargestellt.

Abbildung I. Schematische Darstellung der Funktionsweise von pHrodo. Zu erkennen ist ein mit pHrodo markierter Thrombozyt, der von einem Monozyten phagozytiert wird. Nach Aufnahme des markierten Thrombozyten in das saure Milieu des Phagolysosoms, emittiert pHrodo



nach Anregung Fluoreszenz-Licht (585 nm). Modifiziert nach Abbas et al 2015. Mit freundlicher Genehmigung von Abbas et al 2015 (Abbas et al. 2015).

3.4 Die Methodik der Zellisolierung und Phagozytosemedien haben Einfluss auf die *in vitro* Phagozytoserate und die Monozytenausbeute

Um die Methode der *in vitro* Phagozytose zu optimieren, wurden zwei Verfahren zur Isolierung von Monozyten verglichen: Die einfache und die doppelte Dichtegradienten-Zentrifugation. Weiterhin wurden vier

Medien (HBSS mit und ohne Zusätze, sowie RPMI 1640 mit und ohne Zusätze), in denen die Phagozytose ablief, verglichen.

In den Versuchen zum Vergleich der Isolierung von Monozyten wurden pHrodo markierte *E.coli*-Bakterien statt der opsonierten Thrombozyten zu den adhärennten Monozyten gegeben (50 µl/Vertiefung bei 1 mg/ml Konzentration). Der Einsatz von pHrodo markierten *E.coli*-Bakterien diente einer standardisierten Messung der Phagozytoserate – unabhängig von der Variabilität der Thrombozyten-Opsonierung.

Beim Vergleich der Phagozytosemedien wurden pHrodo markierte Thrombozyten eingesetzt (siehe 2.2.3).

3.4.1 Die doppelte Dichtegradienten-Zentrifugation zeigt im Vergleich zur einfachen Dichtegradienten-Zentrifugation eine signifikant niedrigere Monozytenausbeute

Die Monozyten wurden entweder durch die einfach oder die doppelte Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert. Hierzu wurden die in 2.2.4 beschriebene Methodik verwendet. Es wurde jeweils eine Positivkontrolle 1 mg/ml (*E. coli*) und eine Negativkontrolle (96-Mikrotiterplatte mit

demselben Aufbau bei 4°C inkubiert) angelegt. Daraufhin wurden die Monozyten wie in 2.2.6 beschrieben geerntet und durchflusszytometrisch analysiert.

Um den Einfluss der Isolationsverfahren auf die Monozytenausbeute zu zeigen, wurde nach der Isolierung die Anzahl der Monozyten im automatischen Hämatologie-Analysator KX-21N bestimmt (siehe Abbildung J).

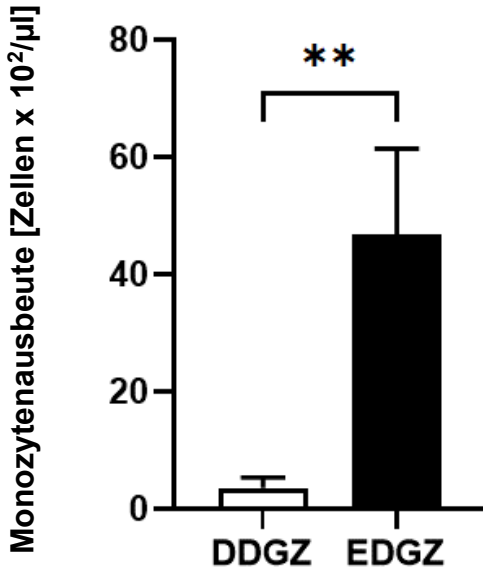


Abbildung J. Die Monozytenausbeute der doppelten Dichtegradienten-Zentrifugation (DDGZ) ist signifikant niedriger als die der einfachen Dichtegradienten-Zentrifugation (EDGZ). Monozyten wurden nach zwei unterschiedlichen Verfahren isoliert (siehe 3.4) und in gleicher Weise weiter bearbeitet: Die Messung der weißen Blutzellen (WBZ) erfolgte im automatischen Hämatologie-Analysator KX-21N nach der Isolation. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SD von 10% (Monozytenanteil) der gemessenen WBZ in einem Gesamtvolumen von 1 ml. Die Werte wurden aus vier unabhängigen Experimenten erhoben (n=4).

Die doppelte Dichtegradienten-Zentrifugation zeigte eine signifikant geringere Monozytenausbeute (ungepaarter T-Test, $p=0,0011$) als die einfache Dichtegradienten-Zentrifugation.

Um den Einfluss des Isolationsverfahrens auf die Phagozytoserate zu zeigen, wurden diese zwei Isolationsverfahren (doppelte und einfache Dichtegradienten-Zentrifugation) bezogen auf die Phagozytoserate miteinander verglichen (siehe Abbildung K). Die Isolationsverfahren wirken sich nicht auf die Phagozytoserate aus - es wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt (ungepaarter t-Test, $p=0,285$). Beide Verfahren zeigen in der Positivkontrolle eine Phagozytoserate von ca. 80 %.

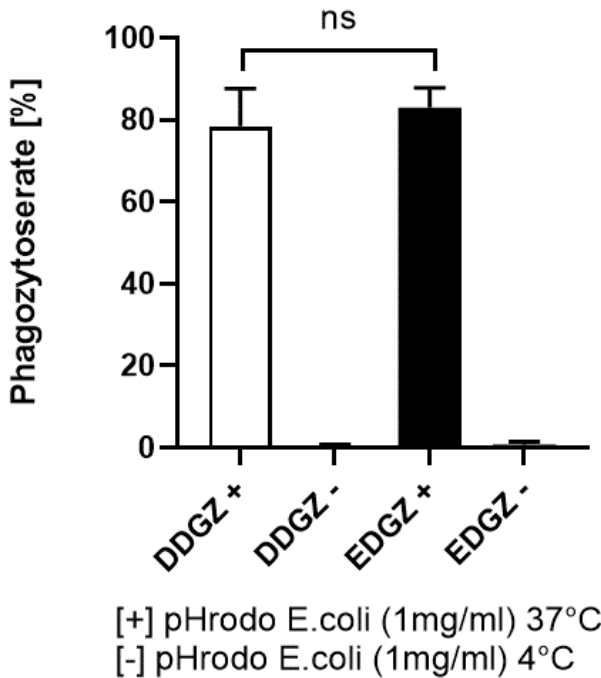


Abbildung K. Die Phagozytoserate der Monozyten nach einfacher Dichtegradienten-Zentrifugation (EDGZ) zeigt keinen signifikanten Unterschied zu der Phagozytoserate der Monozyten, nach doppelter Dichtegradienten-Zentrifugation (DDGZ). Monozyten wurden nach zwei unterschiedlichen Verfahren isoliert (siehe 3.4) und in gleicher Weise weiter bearbeitet: Aussaat in einer 96-Mikrotiterplatte, Zugabe von pHrodo gefärbten E.coli Bakterien (1 mg/ml), Inkubation bei 37°C [+] bzw. 4°C [-]. Die abgelösten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt ist jeweils der

Mittelwert \pm SD der Phagozytoserate pHrodo markierter E.coli Bakterien. Die Werte wurden aus drei unabhängigen Experimenten erhoben (n=3).

3.4.2 Monozyten phagozytieren opsonierte Thrombozyten besser in Anwesenheit von divalenten Kationen

Vier verschiedenen Medien (RPMI1640/HEPES mit und ohne FCS, sowie HBSS mit und ohne CaCl_2 und MgSO_4) wurden in zwei Versuchsreihen verglichen. Die Methodik entspricht der oben beschriebenen (siehe 2.2.1 – 2.2.7). Im letzten Schritt wurden die genannten Testmedien eingesetzt (siehe 2.2.5). In allen Versuchen wurden zwei technische Replikate angelegt. Als Positivkontrolle diente der monoklonale Antikörper W6/32 (1 $\mu\text{g/ml}$) und als Negativkontrolle Isotyp IgG2a (1 $\mu\text{g/ml}$).

Im ersten Versuch wurde das Medium HBSS mit dem Zusatz Calcium (CaCl_2 : 4,6 mmol/L) sowie Magnesium (MgSO_4 : 4 mmol/L) untersucht. Ein Versuchsansatz mit HBSS ohne CaCl_2 und MgSO_4 und ein Ansatz mit CaCl_2 und MgSO_4 wurden verglichen (siehe Abbildung L). Die Anwesenheit divalenter Kationen steigerte die

Phagozytoserate signifikant (ungepaarter t-Test, $p=0,0079$).

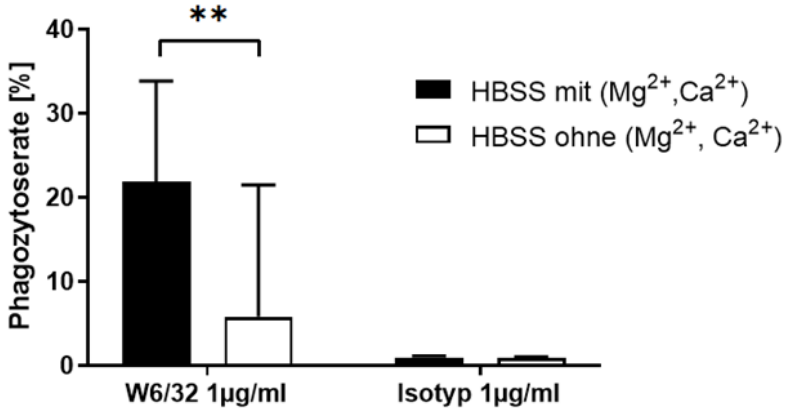


Abbildung L. Monozyten phagozytieren opsonierte Thrombozyten besser in Anwesenheit von divalenten Kationen. Vergleich von HBSS mit und ohne $MgSO_4$, $CaCl_2$ als Phagozytosemedium. Die Monozyten wurden wie in 2.2.4 beschrieben vorbereitet und dann in den jeweiligen Medien mit pHrodo gefärbten und mit Antikörpern opsonierten (W6/32 bzw. Isotypkontrolle) Thrombozyten ($1 \times 10^8/ml$) für 1h bei $37^\circ C$ inkubiert. Die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SD aus 3 unabhängigen Versuchen ($n=3$).

Im zweiten Versuch wurde der Zusatz des Kälberserums (FCS) untersucht. Je ein Versuchsansatz mit

RPMI1640/HEPES Medium ohne FCS und mit FCS wurde verglichen (siehe Abbildung M). Die Anwesenheit von FCS im Phagozytosemedium beeinflusst die Phagozytoserate nicht (ungepaarter t-Test, $p=0,98$).

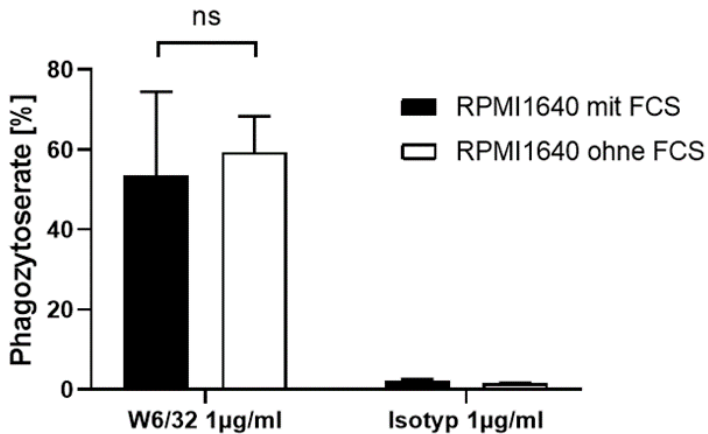


Abbildung M. Monozyten phagozytieren opsonierte Thrombozyten in RPMI1640 unabhängig von FCS. Vergleich von RPMI 1640 mit und ohne FCS als Phagozytosemedium. Die Monozyten wurden wie in 2.2.4 beschrieben vorbereitet und dann in den jeweiligen Medien mit pHrodo gefärbten und dem jeweiligen Antikörper opsonierten (W6/32 bzw. Isotyp) Thrombozyten ($1 \times 10^8/\text{ml}$) für 1h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SD aus 3 unabhängigen Versuchen (n=3).

3.5 Monoklonale Antikörper gegen das HPA-1a Antigen induzieren antigenspezifisch Phagozytose

Die Monozyten im Phagozytoseassay eliminieren antigenspezifisch opsonierte Thrombozyten. In Abbildung N ist gezeigt, dass mit den monoklonalen anti-HPA-1a Antikörpern *B2G1* und *26.4* opsonierte Thrombozyten mit der Merkmalsausprägung *HPA-1a* dosisabhängig und antigenspezifisch phagozytiert wurden (***B2G1*** ungepaarter t-Test: [10 µg/ml] $p=0,0076$; [1 µg/ml] $p=0,0187$; [0.1 µg/ml] $p=0,278$; [0,01 µg/ml] $p=0,379$; ***26.4*** ungepaarter t-Test: [10 µg/ml] $p=0,0018$; [1 µg/ml] $p=0,0016$; [0.1 µg/ml] $p=0,0324$; [0,01 µg/ml] $p=0,295$). Bei Opsonierung mit einem weiteren anti-HPA-1a Antikörper *SZ21* zeigte sich ein vergleichbares Ergebnis (***SZ21*** ungepaarter t-Test: [10 µg/ml] $p=0,009$; [1 µg/ml] $p=0,007$; [0.1 µg/ml] $p=0,92$; [0,01 µg/ml] $p=0,27$). Es ist eine Steigerung der Phagozytoserate mit steigender Antikörperdosis zu erkennen. Bei Thrombozyten der Merkmalsausprägung *HPA-1b* wurde durch keinen der Testantikörper Phagozytose ausgelöst.

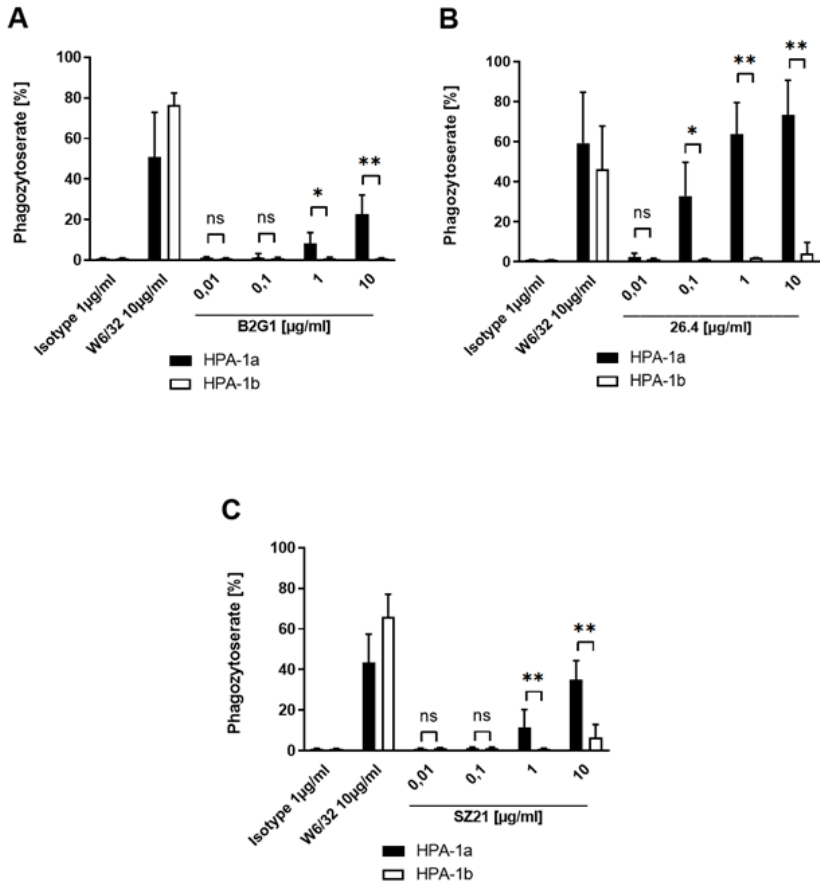


Abbildung N. Monoklonale Antikörper gegen das HPA-1a Antigen induzieren antigenspezifisch Phagozytose. A Phagozytoserate nach Opsonierung von Thrombozyten mit dem humanen monoklonalen anti-HPA-1a Antikörper B2G1, in Abhängigkeit der thrombozytären Merkmalsausprägung (HPA-1a; HPA-1b). **B** Phagozytoserate nach Opsonierung von Thrombozyten mit

dem humanen monoklonalen anti-HPA-1a Antikörper 26.4, in Abhängigkeit der thrombozytären Merkmalsausprägung (HPA-1a; HPA-1b). **C** Phagozytoserate nach Opsonierung von Thrombozyten mit dem murinen monoklonalen Antikörper SZ21 mit anti-HPA-1a Spezifität, in Abhängigkeit der thrombozytären Merkmalsausprägung (HPA-1a; HPA-1b). Die Thrombozyten (HPA-1a sowie HPA-1b) wurden mit den jeweiligen Antikörpern opsoniert (10 µg/ml; 1 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,01 µg/ml), mit pHrodo gefärbt und anschließend mit den isolierten, adhärenen Monozyten inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Der Mittelwert der Anzahl der CD14+ Zellen die Thrombozyten phagozytiert haben, ist in Prozent angegeben ± SD. Die Werte wurden aus je vier unabhängigen Experimenten pro Merkmal erhoben (n=4).

Mit denselben Daten wurde ein Vergleich zwischen 26.4, B2G1 und SZ21 in den einzelnen Konzentrationen dargestellt. 26.4 hat in den Konzentrationen 0,1 – 10 µg/ml signifikant mehr Phagozytose ausgelöst als die anderen beiden Antikörper. **26.4 im Vergleich zu B2G1:** ungepaarter t-Test, [0,1 µg/ml] p-Wert = 0,0001, [1 µg/ml] p-Wert < 0,0001, [10 µg/ml] p-Wert < 0,0001. **26.4 im Vergleich zu SZ21:** ungepaarter t-Test, [0,1 µg/ml] p-Wert = 0,0007, [1 µg/ml] p-Wert < 0,0001, [10 µg/ml] p-Wert = 0,0004.

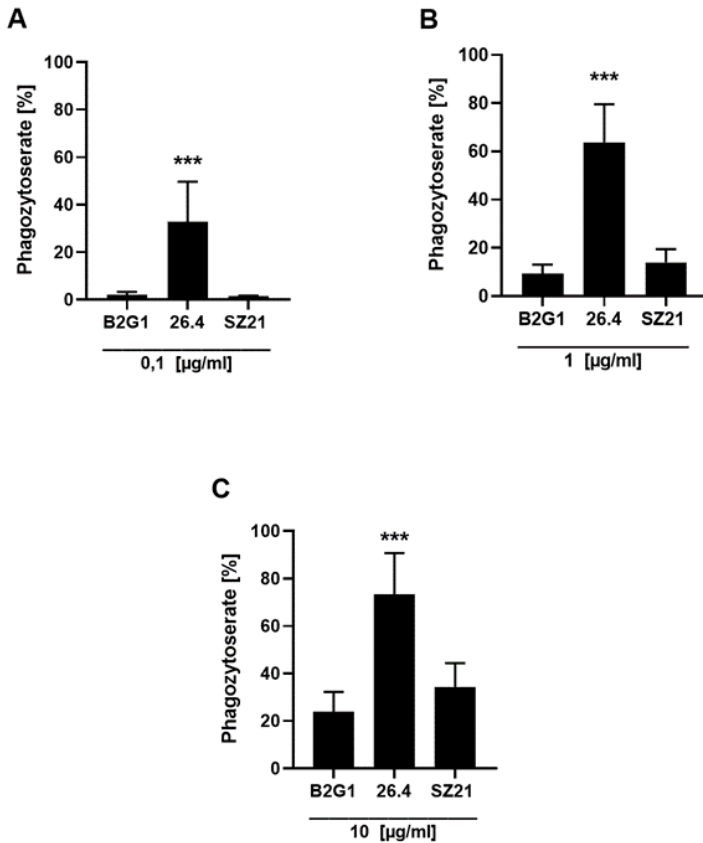


Abbildung O. Der monoklonale Antikörper 26.4 induziert signifikant mehr Phagozytose als SZ21 oder B2G1. A Phagozytoserate nach Opsonierung von HPA-1a Thrombozyten mit den monoklonalen anti-HPA-1a Antikörper 26.4, B2G1 und SZ21 (0,1 µg/ml). **B** (1 µg/ml). **C** (10 µg/ml). Die Thrombozyten (HPA-1a) wurden mit den jeweiligen Antikörpern opsoniert (10 µg/ml; 1 µg/ml; 0,1 µg/ml) und anschließend mit den isolierten, adhärenenten Monozyten inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Der Mittelwert

der Anzahl der CD14+ Zellen, die Thrombozyten phagozytiert haben, ist in Prozent angegeben \pm SD. Die Werte wurden aus je vier unabhängigen Experimenten pro Merkmal erhoben (n=4).

3.6 Monoklonale Antikörper gegen $\alpha_V\beta_3$ induzieren keine Phagozytose opsonierter Thrombozyten

Der monoklonale Antikörper 23C6 bindet an den $\alpha_V\beta_3$ Komplex. Das Integrin $\alpha_V\beta_3$ kommt nur in geringer Dichte auf der Oberfläche der Thrombozyten vor, auf Endothel wird es in einer höheren Dichte exprimiert. Der Antikörper 23C6 bindet anders als die in 3.5 verwendeten Antikörper nicht an den $\alpha_{IIb}\beta_3$ Integrin-Komplex oder die β_3 -Untereinheit. In der Abbildung P zeigt sich, dass durch 23C6 opsonierte Thrombozyten von Monozyten nicht phagozytiert wurden (Einfaktorieller ANOVA, $p < 0,0001$).

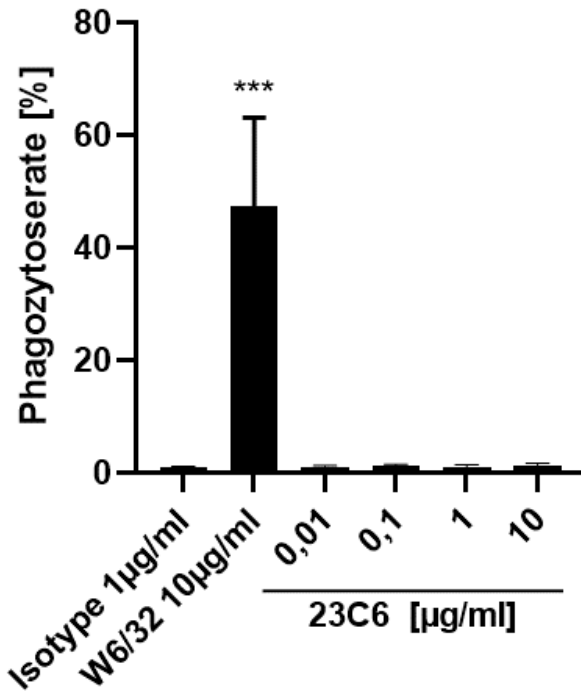


Abbildung P. Monoklonale Antikörper gegen $\alpha v \beta_3$ induzieren keine Phagozytose. Die Vorbereitung der Zellen wurde wie in 2.2 beschrieben durchgeführt. Die Thrombozyten wurden mit dem monoklonalen Antikörper 23C6 opsoniert (10 µg/ml; 1 µg/ml; 0,1 µg/ml; 0,01 µg/ml), mit pHrodo gefärbt und anschließend mit den isolierten, adhärenenten Monozyten inkubiert. Die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Der Mittelwert der Anzahl der CD14+ Zellen die phagozytiert haben, ist in Prozent angegeben \pm SD. Die Werte wurden aus je vier unabhängigen Experimenten ermittelt (n=4).

4 Diskussion

4.1 Methodische Weiterentwicklung des FMPA

Zu Beginn dieser Arbeit wurde der Prozess der Plättchenphagozytose in einer mikroskopischen Darstellung visualisiert (siehe 3.3, Abbildung H). Zu erkennen ist, dass pHrodo markierte und mit anti-HLA-Klasse I Antikörpern (Klon W6/32) opsonierte Thrombozyten durch kernhaltige Zellen phagozytiert wurden.

Der Farbstoff pHrodo sorgt dafür, dass nur internalisierte Thrombozyten ein Farbsignal emittieren und so als phagozytiert erkannt werden. In früheren Phagozytosessays wurden Thrombozyten mit Carboxyfluorescein-Diacetat gefärbt (Hagberg und Lyberg 2000; MacPherson und Cornish 1986). Dies hatte den Nachteil, dass auch Thrombozyten, die nicht phagozytiert, sondern lediglich an die Phagozytenoberfläche adhärten, als phagozytiert gewertet wurden. Takahashi et al. haben in ihrer Arbeit CFDA-SE (5(6)-Carboxyfluorescein-Diacetate-Succinimidyl-Ester) mit pHrodo verglichen, und festgestellt, dass nicht nur weniger unspezifische Bindung von Thrombozyten detektiert

wurde, sondern pHrodo auch eine höhere Sensitivität in der Erkennung der Plättchenphagozytose zeigte (Takahashi et al. 2018). Eine ebenfalls häufig eingesetzte Methode, war die Markierung von Thrombozyten mit dem Radioisotop Chrom-51, dessen Aufnahme in die Phagozyten gemessen werden konnte (Tsubakio et al. 1983). Auch bei diesem Verfahren kann nicht zwischen adhärennten und internalisierten Thrombozyten unterschieden werden.

In der mikroskopischen Visualisierung des Assays ist eine unterschiedliche Verteilung der phagozytierten Thrombozyten in den Phagozyten zu erkennen. Manche der Phagozyten haben mehrere Thrombozyten (siehe C & D, Abbildung H), manche nur einen internalisiert. Die Anzahl der phagozytierten Thrombozyten je Monozyt kann im Durchflusszytometer nicht differenziert werden. Die Anzahl der phagozytierten Thrombozyten je Monozyt ist für die Messung also unerheblich – wenngleich sie klinisch eine Auswirkung haben könnte. Eine unterschiedliche Dichte oder Affinität der Fc γ -Rezeptoren auf den Monozyten könnte eine Erklärung dieses Phänomens sein (Kerntke et al. 2020).

In den weiteren Versuchen wurde der anti-HLA-Klasse I Antikörper W6/32 als Positivkontrolle in der Konzentration 10 μ g/ml eingesetzt. Aus technischen Gründen konnte die

Negativkontrolle nur in der Konzentration 1 µg/ml eingesetzt werden. Takahashi et al. konnten zeigen, dass die Opsonierung von Thrombozyten mit dem anti-HLA-Klasse I Antikörper W6/32 bereits bei einer Konzentration von 0,3 µg/ml gesättigt war, eine Vergleichbarkeit ist also dennoch gegeben (Takahashi et al. 2018).

In verschiedenen Studien wurde ein Durchflusszytometer-basierter Phagozytoseassay bereits für unterschiedliche Zwecke angewendet (Takahashi et al. 2018, 2017; Meinke et al. 2016; Kapur et al. 2015; Hoffmeister et al. 2003). Die Durchführung eines FMPA unterscheidet sich in den jeweiligen Arbeiten in verschiedenen Punkten, je nach Anwendungsbereich. In meinen Untersuchungen habe ich verschiedene Methoden und Teilschritte des Phagozytoseassays miteinander verglichen. Zum einen wurde durch verschiedene Isolationsverfahren versucht die Monozytenausbeute zu maximieren, um den Assay mit möglichst wenig Material und möglichst vielen funktionellen Zellen durchführen zu können. Außerdem habe ich verschiedene Medien verglichen, in denen die Phagozytoserate propagiert werden könnte. Eine höchstmögliche Phagozytoserate als Zeichen einer optimalen Funktionalität des Assays, war hier das Ziel.

Außerdem wurde der Einfluss der beiden Isolationsverfahren auf die Phagozytoserate untersucht, um sicherzustellen, dass die Phagozytose an sich nicht beeinträchtigt wird.

4.1.1 Die einfache Dichtegradienten-Zentrifugation ist der doppelten Dichtegradienten-Zentrifugation in der Monozytenisolierung überlegen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Methodik der doppelten Dichtegradienten-Zentrifugation eine wesentlich geringere Monozytenausbeute als die der einfachen Dichtegradienten-Zentrifugation erbrachte (siehe 3.4.1, Abbildung J, ungepaarter T-Test, $p=0,0009$). Eine hohen Monozytenausbeute ist in einem Phagozytoseassay von großem Nutzen, da weniger Vollblut verwendet werden muss, wenn die Isolationsmethode effizient ist. Außerdem stehen mehr Zellen zur Verfügung, die den gewünschten Prozess durchführen und so untersucht werden können.

Die seit langem etablierte, beschriebene einfache Dichtegradientenzentrifugation ist eine physikalische Trennmethode. Es werden mononukleäre Zellen – also

hauptsächlich Lymphozyten und Monozyten – von Plasma und anderen Blutbestandteilen getrennt. Dies geschieht durch die spezifische Dichte des Mediums Ficoll (1,077g/ml) (Böyum 1968). Unter Zentrifugation passieren Zellen mit höherer Dichte (z.B. Erythrozyten) die Ficoll-Phase, Zellen mit ähnlicher Dichte sammeln sich in der Interphase zwischen Überstand und der Ficoll-Phase und können von dort geerntet werden. Es gibt verschiedene Ansätze die Methode zu optimieren. Eine davon ist es eine zweite Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll (Dichte 1,131 g/ml) durchzuführen, sodass die Zellen ein weiteres Mal physikalisch getrennt werden (siehe 2.2.4). So sollen Verunreinigung reduziert und die Konzentration der Monozyten erhöht werden (Menck et al. 2014).

Takahashi et al. isolierten Monozyten aus Vollblut mittels einfacher Dichtegradientenzentrifugation, Meinke et al. aus *Buffy-coat*. Beide Arbeiten machen zu einer Monozytenausbeute nach Isolation keine Angabe (Takahashi et al. 2018; Meinke et al. 2016). Ulmer und Flad et al. geben nach einer einfachen Dichtegradientenzentrifugation eine Konzentration von $1-2 \times 10^6$ /ml PBMCs an. Dies ist mit meinen Ergebnis vergleichbar (Ulmer und Flad 1979).

Meinen Ergebnissen zufolge, führt die doppelte Dichtegradientenzentrifugation zu einer deutlich geringeren Monozytenausbeute. Durch den zweiten Zentrifugationsschritt scheinen mononukleäre Zellen verloren zu gehen. Dies könnte an den unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften von Vollblut im Vergleich zu *Buffycoat* liegen, welches von Menck et al verwendet wurde. *Buffycoat* hat von vornherein weniger Verunreinigungen, beispielsweise wenig Erythrozyten.

4.1.2 Phagozytose wird durch Monozytenisolierung nicht beeinflusst

In einem zweiten Schritt sollte der Frage nachgegangen werden, ob die ausgewählten Monozytenisolationsverfahren die Phagozytoseleistung der Monozyten beeinträchtigen. In der Literatur gibt es hierzu keine Angaben. Aus diesem Grund wurde im Anschluss an beide Isolationsverfahren die Phagozytoserate bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die ausgewählten Isolationsverfahren die Phagozytoserate adhärenter Monozyten nicht beeinflussen (siehe 3.4.1 Abbildung K, ungepaarter t-Test, $p=0,285$).

4.1.3 Einfluss verschiedener Medien auf die Phagozytoserate

Ein Medium in dem vitale Zellen phagozytieren sollen, muss optimale Bedingungen für diesen Prozess liefern. Es darf nicht Zell-toxisch sein, sollte alle nötigen Supplemente enthalten und zudem einfach in Handhabung und Lagerung sein. Takahashi et al. nutzten als Phagozytosemedium HBSS (nicht weiter spezifiziert), Hoffmeister et al. beschreiben explizit den Zusatz von Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Ionen zu HBSS, Lim et al. benutzten RPMI mit 5 % Kälberserum als Zusatz (Takahashi et al. 2018, 2017; Hoffmeister et al. 2003; Lim et al. 2002). Ackerman et al. haben einen Phagozytoseassay entwickelt, der nicht mit Thrombozyten, sondern mit Antikörpern beladenen Beads arbeitet. Eine Methode die konstante Ergebnisse reproduziert, jedoch nicht den Komplexen Aufbau der epitopreichen Thrombozytenoberfläche widerspiegelt (Ackerman et al. 2011).

4.1.3.1 Divalente Kationen steigern monozytäre Phagozytose

HBSS ist isoosmolar zu Blut, hat einen neutralen pH-Wert und enthält einzelne, monovalente Elektrolyte. In meinen Versuchen wurde Calciumchlorid und Magnesiumsulfat hinzugefügt. Die beiden Salze dissoziieren in wässriger Lösung zu Kationen (Ca^{2+} und Mg^{2+}) und Anionen (Cl^- und SO_4^{2-}). In den Ergebnissen zeigt sich, dass der Zusatz dieser divalenter Kationen die Phagozytoserate verbessert hat (siehe 3.4.2, Abbildung L, ungepaarter t-Test, $p=0,0079$).

Auf mehreren Glykoproteinen der Thrombozytenoberfläche sind Calcium Bindungsstellen in räumlicher Nähe zur Ligandenbindungsstelle beschrieben (Zhou et al. 2018; Dong et al. 2012). Es wird diskutiert, ob die Anwesenheit von divalenten Kationen wie Ca^{2+} oder Mg^{2+} für eine Ligandenbindung notwendig ist (Kapur et al. 2015; Gawaz 1999), oder ob diese lediglich einen synergistischen Effekt erzeugen (Xiong et al. 2002; Dong et al. 2012). Am wahrscheinlichsten verstärken sie die Bindung von Liganden – also die Opsonierung durch Antikörper – durch Konformationsänderung der Ligandenbindungsstelle. Möglich wäre auch ein direkter

Einfluss auf die Phagozytose. Dies kann mit den hier angestellten Untersuchungen nicht differenziert werden.

Meine Ergebnisse zeigen nur eine partielle Notwendigkeit von Ca^{2+} und Mg^{2+} im Zellkulturmedium für den Prozess der Fc-vermittelte Phagozytose. Dies spricht eher für einen synergistischen Effekt der Kationen.

4.1.3.2 *Fetale calf serum* (FCS) beeinflusst monozytäre Phagozytose nicht

RPMI + HEPES wird normalerweise für Zellkulturen eingesetzt und bietet ein optimales Milieu für vitale Zellen. Es besitzt -durch den HEPES Puffer - ebenfalls einen stabilen pH-Wert, außerdem sind Elektrolyte und Zucker enthalten. Der Zusatz von 10% FCS zu RPMI1640/HEPES hat die Phagozytoserate nicht beeinflusst (siehe 3.4.2, Abbildung M, ungepaarter t-Test, $p=0,98$).

Fetal calf serum (FCS) enthält eine Vielzahl an Inhaltsstoffen, unter anderem Hormone, Aminosäuren, Zucker, Zytokine und Wachstumsfaktoren (Price und Gregory 1982). Die Wirkung und das Zusammenspiel all dieser Substanzen sind bis heute nicht vollständig

verstanden. Häufig eingesetzt wird es in Zellkulturen, da es Wachstum und Adhärenz von Zellen fördert (Jung et al. 2010). Ein großer Nachteil ist jedoch, dass die Inhaltsstoffe - selbst innerhalb einer Charge - stark schwanken können. Dies macht eine Vergleichbarkeit und Reproduktion schwierig (Price und Gregory 1982). Enthaltene Calciumoxalatkristalle können die Phagozytose von Makrophagen beeinträchtigen (Pedraza et al. 2008), allerdings ist auch beschrieben, dass FCS die Fc-vermittelte Phagozytoseleistung von Makrophagen deutlich steigern kann (Leu et al. 1989).

Meinen Ergebnissen zufolge ist Phagozytose in RPMI möglich. Durch den Zusatz von FCS wird diese nicht beeinflusst. Auf Grund der schwankenden Zusammensetzung von FCS, sowie dem fehlenden Nutzen für die Phagozytose, stellt es ein Mittel der zweiten Wahl als Zusatz für Phagozytosemedien dar. Die divalenten Kationen Ca^{2+} und Mg^{2+} hingegen scheinen maßgeblich zur Verbesserung der Phagozytose beizutragen. Außerdem sind in der Literatur keinerlei Nachteile beschrieben, die durch ihren Zusatz entstehen könnten. Sie sollten deshalb in Medien zur Untersuchung der

Phagozytose opsonierter Thrombozyten eingesetzt werden.

4.2 Der FMPA ist in der Lage, HPA-1a antigenspezifisch Phagozytose nachzuweisen

Ziel der Arbeit war es HPA-1a-antigenspezifische monozytäre Plättchenphagozytose durch monoklonale Antikörper nachzuweisen. Dies ist nach Etablierung der methodischen Grundlagen mit allen anti-HPA-1a Antikörpern gelungen. Es wurden Thrombozyten mit dem Merkmal HPA-1a und HPA-1b verglichen. Im hier beschriebenen Fall besteht der Unterschied der beiden Antigene in einem singulären Aminosäureaustausch. Eine Punktmutation sorgt dafür, dass an Position 33 statt Leucin, Prolin im Glykoprotein β_3 eingebaut wird (Thinn et al. 2018). Das Merkmal HPA-1a ist durch Leucin und das Merkmal HPA-1b durch Prolin an Position 33 charakterisiert.

4.2.1 Anti-HPA-1a Antikörper lösen im FMFA dosisabhängig Phagozytose aus

In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob Antikörper gegen HPA-1a (B2G1, 26,4 und SZ21) bei Thrombozyten homozygoter Ausprägung der Merkmale HPA-1a oder HPA-1b Phagozytose induzieren. Der Antikörper 26.4 zeigt in den Konzentrationen von 0,1 µg/ml – 10 µg/ml bei Thrombozyten mit dem Merkmal HPA-1a eine signifikant höhere Phagozytoserate als bei Thrombozyten mit dem Merkmal HPA-1b. In der Konzentration 0,01 µg/ml ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen (ungepaarter t-Test: [10 µg/ml] $p=0,0018$; [1 µg/ml] $p=0,0016$; [0.1 µg/ml] $p=0,0324$; [0,01 µg/ml] $p=0,295$). B2G1 und SZ21 zeigen etwas schwächere, aber grundsätzliche vergleichbare Ergebnisse. Auch diese Antikörper haben bei HPA-1a homozygoten Thrombozyten Phagozytose induziert, und bei HPA-1b homozygoten Thrombozyten nicht.

Der Aminosäureaustausch der HPA-1b Variante (Prolin) scheint die Bindungsaffinität des Epitops so zu ändern, dass die drei getesteten anti-HPA-1a Antikörper kaum binden können. Aufgrund der Antigenspezifität der Antikörper wurde bei Thrombozyten mit dem Merkmal

HPA-1b keine Phagozytose induziert. Der FMFA ist in der Lage diese Antigen-spezifität abzubilden (siehe 3.5, Abbildung N).

Denkbar wäre auch eine Beeinträchtigung der Fc-Interaktion mit den Monozyten durch den Aminosäureaustausch. Um dies zu klären, müsste eine Messung der Bindung von Antikörpern an die jeweiligen Thrombozyten durchgeführt werden.

Die Tatsache, dass schon bei geringen Konzentrationen wie 0,1µg/ml ein signifikanter Unterschied in der Phagozytoserate sichtbar wird, zeigt die Sensitivität des Phagozytose Assays.

Betrachtet man nun den Unterschied der Phagozytoserate aller drei Antikörper gegen HPA-1a in den verschiedenen Konzentrationen (siehe 3.5, Abbildung O), fällt auf, dass obwohl alle das gleiche Epitop (HPA-1a) binden, unterschiedlich starke Phagozytoseraten hervorgerufen wurden. Dies kann verschiedene Gründe haben.

Die unterschiedliche Epitop-Spezifität (Antikörpersubtypen, siehe 1.3.2) könnte für die unterschiedliche Phagozytoserate opsonierter Thrombozyten verantwortlich sein. 26.4 gehört zum Subtyp II, wohingegen SZ21 zum Subtyp I gehört. In den

Konzentration von 0,1 – 10 µg/ml induziert 26.4 signifikant mehr Phagozytose als SZ21 in den gleichen Konzentrationen (siehe 3.5, Abbildung O, ungepaarter t-Test, [0,1 µg/ml] p-Wert = 0,0007, [1 µg/ml] p-Wert < 0,0001, [10 µg/ml] p-Wert = 0,0004). Beide Antikörper binden an die β_3 -Untereinheit. SZ21 ist dabei komplexunabhängig und reagiert hauptsächlich mit der PSI-Domäne, während 26.4 als komplexabhängig bezeichnet wird, da dieser die PSI-Domäne zusammen mit EGF-1 als Liganden bindet (Holzwarth et al. 2020; Zhi et al. 2018; Santoso et al. 2016). Eine unterschiedliche Bindungsaffinität der beiden Antikörper könnte auch eine Erklärung für die Differenz der Phagozytoserate sein.

26.4 zeigt im Vergleich zu B2G1 ebenfalls eine signifikant höhere Phagozytoserate in den Konzentrationen 0,1 – 10 µg/ml (siehe 3.5, Abbildung O, ungepaarter t-Test, [0,1 µg/ml] p-Wert = 0,0001, [1 µg/ml] p-Wert < 0,0001, [10 µg/ml] p-Wert < 0,0001).

B2G1 ist wie 26.4 ein anti-HPA-1a Antikörper des Subtyps II, dieser bindet also ebenfalls die PSI-Domäne zusammen mit EGF-1 (Holzwarth et al. 2020; Zhi et al. 2018; Santoso et al. 2016). Bei gleichem Subtyp aber unterschiedlicher Phagozytoserate müssen folglich noch andere Faktoren die Phagozytose beeinflussen.

Die Antikörper 26.4 und B2G1 sind beide humane monoklonaler Antikörper. Der Antikörper 26.4 wurde durch Hybridoma-Technologie aus B-Zellen einer immunisierten Schwangeren generiert (Eksteen et al. 2015), dagegen wurde der rekombinanten Antikörper B2G1 aus einer V Gen Phagen-Display Bibliothek hergestellt. Das VH Gen-Repertoire stammte von einem alloimmunisierten Individuum, während das VL Gen von einem nicht-immunen Individuum stammte (Griffin und Ouwehand 1995). Dies könnte eine geringere Affinität des rekombinanten Antikörpers B2G1 im Vergleich zum Antikörper 26.4 erklären.

Der Antikörper SZ21 ist ein Maus-IgG1-Antikörper, der mit den beiden o.g. Antikörpern nicht direkt vergleichbar ist, da eine unterschiedliche Affinität zu humanen Fc-Rezeptoren anzunehmen ist.

4.2.1.1 Einflussfaktoren der Fc-vermittelten Phagozytose

In dieser Arbeit wurde eine Fc-vermittelte Phagozytose untersucht. Die Bindung der opsonierten Thrombozyten erfolgt demnach über den Fc-Teil des gebundenen Antikörpers mit dem Fc-Rezeptor eines Monozyten. Fc-Rezeptoren haben neben einer immunmodulatorischen

Wirkung einen starken Einfluss auf Phagozytose (Nimmerjahn und Ravetch 2008a). Wiener et al. konnten zeigen, dass mit anti-HPA-1a Antikörpern opsonierte Thrombozyten vor allem an den FcγR I und II binden (Wiener et al. 2000). Diese sind in etwa gleicher Quantität auf klassischen Monozyten exprimiert (Kerntke et al. 2020). In einer weiteren Untersuchung von Wiener et al., wurde die Phagozytose von mit anti-HPA-1a Antikörpern opsonierten Thrombozyten durch Monozyten untersucht. Durch den Zusatz von verschiedenen anti-FcγR Antikörpern sollte die Phagozytose inhibiert werden. Mit dem Antikörper H22 gegen FcγR I ist dies gelungen. Andere Antikörper gegen FcγR II und III konnten dieses Effekt nicht – oder nur deutlich vermindert - erzeugen (Wiener et al. 2003). In einer aktuelleren Studie mit ITP-Seren und Makrophagen der Milz konnte gezeigt werden, dass FcγR I und FcγR III (keine Angabe zur Isoform IIIa oder IIIb) für die Phagozytose von Thrombozyten maßgeblich sind. Die Blockierung dieser Rezeptoren führte zu einer Suppression der Phagozytose (Norris et al. 2021). Die Ergebnisse dieser Studien lassen vermuten, dass nicht alle Fcγ-Rezeptoren in gleichem Maße am Prozess der Phagozytose beteiligt sind. Wie die IgG-Subklasse eines anti-HPA-1a-Antikörpers – bei gleicher variabler Region -

die Phagozytoserate opsonierter Thrombozyten beeinflusst, wäre eine wichtige Fragestellung.

Eine niedrige oder hohe Affinität zu den Fc-Rezeptoren auf Phagozyten, kann eine entscheidende Rolle in der Wirksamkeit eines Antikörpers spielen (Beers et al. 2016; Nimmerjahn und Ravetch 2005). Bruhns et al. haben eine umfassende Untersuchung durchgeführt, um die Affinität der IgG Subklassen zu allen humanen Fc γ -Rezeptoren zu bestimmen (siehe 1.4.1). Die hier eingesetzten monoklonalen Antikörper sind von unterschiedlicher IgG Subklasse: SZ21 (murin) und B2G1 (human) gehören der Subklasse IgG1 an, wohingegen 26.4 (human) der Subklasse IgG3 angehört. Fc γ R I - welcher maßgeblich zur Phagozytose beiträgt (Norris et al. 2021; Wiener et al. 2003) – zeigt zu IgG1 und IgG3 keinen Affinitätsunterschied. Fc γ R IIIa hat zu IgG3 eine höhere oder gleiche Affinität wie IgG1. Fc γ R IIIb zeigt zu IgG1 und IgG3 keinen Affinitätsunterschied (siehe 1.4.1, Tabelle 1) (Bruhns et al. 2009).

In meinen Untersuchungen hat 26.4 (IgG3) signifikant höhere Phagozytoseraten ausgelöst, als B2G1 und SZ21 (IgG1) (siehe 3.5, Abbildung O). Ein sicheren Rückschluss auf die IgG-Subklassifizierung als Ursache für die

unterschiedliche Phagozytoserate lässt sich mit den hier erhobenen Daten, sowie der aktuellen Literatur jedoch nicht ziehen. Bezogen auf FcγR IIIa gibt es, wie oben beschrieben, höchstens einen geringen Unterschied in der Affinität zwischen den beiden Subklassen (Bruhns et al. 2009). FcγR III wird allerdings überwiegend auf nicht-klassischen Monozyten, neutrophilen Granulozyten und NK-Zellen exprimiert (Kerntke et al. 2020), Zellen die in dieser Arbeit nicht oder nur in geringem Umfang untersucht wurden (nicht klassische Monozyten sind nur schwach CD14+).

4.2.1.2 Alternative Wege der Thrombozyteneliminierung

In meiner Arbeit konnte ich in einem ersten Schritt zeigen, dass opsonierte Thrombozyten von CD14+ Monozyten phagozytiert wurden. Im Kontext einer Grunderkrankung wie FNAIT macht dies nur einen Teil der Thrombozyteneliminierung aus. Andere Phagozyten oder sogar andere Formen der Thrombozyteneliminierung, zum Beispiel durch das Komplementsystem, könnten eine Rolle spielen. Bereits 1974 beschrieben Handin und Stossel et al. eine Phagozytose von Thrombozyten durch

Granulozyten. Zum Einsatz kamen „*rabbit anti-human platelet serum*“ oder Serum von Patienten mit ITP, um Thrombozyten zu opsonieren (Handin und Stossel 1974). Im selben Jahr veröffentlichen McMillan et al. eine Arbeit, in der sie eine Thrombozyteneliminierung durch Milz-Leukozyten von ITP Patienten nachwiesen (McMillan et al. 1974).

Die antikörpervermittelte Phagozytose in diesem Assay wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen. Betrachtet wurden dabei nur vitale und CD14+ Zellen (siehe 3.2). In anderen Arbeiten wurden Phagozyten teilweise nur anhand ihrer Morphologie im FSC und SSC identifiziert (Takahashi et al. 2018), teilweise durch ihre CD14-Expression und ihre Morphologie (Hoffmeister et al. 2003). Eine Betrachtung anderer Phagozyten (z.B. Makrophagen, Granulozyten oder andere Leukozyten) findet hier nicht statt.

In meinem Modell wird außerdem nur die antikörpervermittelte, Fc γ -Rezeptor vermittelte Phagozytose untersucht. Eine in der Literatur beschriebene Art der antikörpervermittelten, Fc-unabhängigen Plättcheneliminierung, wurde nicht berücksichtigt. Es ist beschrieben, dass durch Antikörper gegen das Glykoprotein Ib, trotz Entfernung des Fc-Teils, eine

Thrombozytopenie in Mäusen auftrat (Nieswandt et al. 2000).

Ebenso wurde das Komplementsystem und dessen mögliche Auswirkungen auf Thrombozyten nicht untersucht. Van Osch et al. zeigten, dass bei Thrombozytentransfusionen entstandene anti-HLA und anti-HPA Antikörper das Komplementsystems aktivierten. Besonders die Kombination einiger Antikörper steigerte die Ausschüttung der Komplementprotease C3b (van Osch et al. 2022). Rijkers et al. zeigten, dass eine Aktivierung von Thrombozyten ebenfalls eine Komplementaktivierung auslösen kann. Verschiedene HLA-Antikörper führen über den Fc γ -Rezeptor IIa zu einer Thrombozytenaktivierung (Christie und Swinehart 1992) – dieser Aktivierung folgt die Expression von CD62P in der Thrombozytenmembran, dieses kann direkt durch C3b gebunden werden und führt so über den alternativen Weg zu einer Komplementaktivierung (Rijkers et al. 2019; Rijkers et al. 2018). Eine Aktivierung von Thrombozyten kann auch durch eine Interaktion von P-Selektin mit C3, sowie direkt über C1q das Komplementsystem aktivieren (Peerschke et al. 2006; Del Conde et al. 2005).

Das Komplementsystem kann über die Aktivierung von Antikörpern zu einer Eliminierung von Thrombozyten bei

ITP Patienten führen (Hed 1998). Es zeigte sich eine Korrelation zwischen dem Vorhandensein von spezifischen Antikörpern und der Aktivierung des Komplementsystems, sowie eine erhöhte Anzahl an thrombozytären Mikropartikel. Ob diese Thrombozyteneliminierung durch komplementvermittelte Phagozytose oder direkte Zerstörung von Thrombozyten entstanden ist, wurde nicht untersucht (Najaoui et al. 2012).

In der Literatur wird außerdem der Effekt von zytotoxischen T-Zellen auf Plättchen diskutiert, diese können zu Apoptose führen (Zhang et al. 2006; Olsson et al. 2003).

Trotz anderer Wege ist die in dieser Arbeit untersuchte, antikörpervermittelte Phagozytose durch Monozyten, neben dem Komplementsystem, einer der Hauptwege für Thrombozyteneliminierung (Bakchoul und Sachs 2016).

4.2.2 Antikörper gegen $\alpha_v\beta_3$ lösen keine Phagozytose aus

Im Versuch 3.6 wurden Thrombozyten mit dem Antikörper 23C6, welcher gegen $\alpha_v\beta_3$ gerichtet ist, opsoniert. Wie in Abbildung P erkennbar ist, wurde durch diesen Antikörper keine Phagozytose ausgelöst.

Anti-HPA-1a Antikörper des Subtypen III sind bindungsabhängig, sie binden die β_3 -Untereinheit nur in Verbindung mit α_v . Der $\alpha_v\beta_3$ -Komplex ist auf Thrombozyten nur wenig exprimiert (ca. 400/Zelle) (Veldhuisen et al. 2014). Wenige Bindungsstellen für Typ III Antikörper führen zu weniger Antikörperbindung, und somit zu weniger Fc-vermittelter Phagozytose.

Die beiden Hauptintegrine die in dieser Arbeit betrachtet werden sind der $\alpha_v\beta_3$ -Komplex, sowie der $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Komplex. Hier ist vor allem die β_3 -Untereinheit relevant, da auf dieser die Epitope PSI und EGF-1 zu finden sind. Der $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Komplex, welcher für Typ I und II Antikörper als Ligand dient, findet sich ungefähr 60.000-mal pro Zelle auf Thrombozyten (Veldhuisen et al. 2014). Der $\alpha_v\beta_3$ -Komplex ist auf Thrombozyten hingegen nur wenig exprimiert (ca. 400/Zelle). Dieser Unterschied in Expression der Liganden

und Spezifität der Antikörper könnte eine Erklärung dafür sein, dass im Vergleich zu 26.4 und SZ21 (Typ I und II), 23C6 (Als Surrogat für Typ III-Antikörper) keine Phagozytose induziert.

In einzelnen Studien die FNAIT untersucht haben, gab es Fälle in denen keine – oder nur eine milde - Thrombozytopenie vorlag und die Patienten dennoch eine Blutung (z.B. ICH) entwickelten (Vos et al. 2020; Kamphuis et al. 2014). Dies warf die Frage auf, welcher andere Mechanismus neben einer Thrombozytopenie zu einer Blutung geführt haben könnte. Santoso et al. beschrieben in ihren Untersuchungen, dass Antikörper aus Blut von Patienten mit ICH eine signifikant höhere Bindungsaffinität zu $\alpha_V\beta_3$ -Komplexen zeigten als Antikörper von Patienten ohne ICH. Durch Isolierung der Antikörpersubtypen gegen $\alpha_V\beta_3$ (Typ III) mittels Immunpräzipitation konnte deren vermehrtes Vorkommen bei Patienten mit ICH, im Vergleich zu Patienten ohne ICH nachgewiesen werden (Santoso et al. 2016). Dies legt nahe, dass anti-HPA-1a Antikörper vom Subtyp III weniger oder keine Phagozytose induzieren, aber dennoch für eine Blutung ursächlich sein könnten. Die Dichte des $\alpha_V\beta_3$ -Komplexes auf Endothelzellen beträgt etwa 50.000/Zelle, also um ein

vielfaches höher als auf Thrombozyten (Veldhuisen et al. 2014). Die Verteilung der Liganden des Typ III Antikörpers lässt vermuten, dass eine Blutung durch Endothelschäden auftreten könnte, ohne dass eine Thrombozytopenie vorliegen muss.

Bayat et al. stellen in ihren Versuchen fest, dass anti-HPA-1a Antikörper von ICH Patienten Angiogenese beeinträchtigen. Monoklonale Antikörper (z.B. 26.4) gegen $\alpha_{IIb}\beta_3$ oder β_3 hingegen nicht (Bayat et al. 2019). Die Störung der Angiogenese durch anti-HPA-1a Antikörper könnte ein weiterer Mechanismus sein, der für Blutungen verantwortlich ist, ohne dabei Thrombozyten zu eliminieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Komplex thrombozytenspezifisch ist. Deshalb induzieren anti-HPA-1a Antikörper vom Typ I und II erst eine Opsonierung und dann Phagozytose von Thrombozyten. Der $\alpha_V\beta_3$ -Komplex ist vermehrt auf Endothel exprimiert, weshalb es durch anti-HPA-1a Antikörper vom Typ III zu Endothelschäden kommen könnten und weniger zu einer Opsonierung von Thrombozyten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit gehen mit den beschriebenen Studien einher. Phagozytose – und damit Thrombozytopenie – wird durch anti-HPA Antikörper vom Typ I und II ausgelöst. Antikörper vom Typ III lösen keine Phagozytose aus – und somit auch keine Thrombozytopenie, könnten aber über andere Mechanismen Blutungen verursachen (Bayat et al. 2019; Santoso et al. 2016).

4.3 Anti-HPA-1a Antikörpersubtypen beeinflussen die klinische Ausprägung der FNAIT

Die fetale- und neonatale Alloimmunthrombozytopenie präsentiert sich klinisch von asymptomatisch, über leichte Blutungszeichen bis hin zu schwersten intrazerebralen Blutungen. Interessanterweise korrelieren diese Symptome nicht immer mit der Anzahl der Thrombozyten (Vos et al. 2020; Kamphuis et al. 2014; Kroll et al. 2005). Eine Korrelation mit dem anti-HPA-1a Antikörpertiter wird in der Literatur diskutiert (Vos et al. 2020; Kamphuis et al. 2014; Ghevaert et al. 2007; Bertrand et al. 2006; Bessos et al. 2005; Jaegtvik et al. 2000; Proulx et al. 1994). Andere Faktoren scheinen das Auslösen einer Blutung ebenfalls zu

beeinflussen. Anti-HPA-1a Antikörpersubtypen wurden schon in mehreren Studien dahingehend beschrieben (Bayat et al. 2019; Zhi et al. 2018; Santoso et al. 2016), allerdings nicht eingehend mit ihrer Wirkung auf Fc-vermittelte Thrombozyteneliminierung untersucht. Zhi et al. sowie Santoso et al. sind der Auffassung, dass die Identifizierung und Unterscheidung von verschiedenen anti-HPA-1a Antikörpersubtypen ein wichtiger Schritt sei, um das Risiko von FNAIT abzuschätzen (Zhi et al. 2018; Santoso et al. 2016). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der FMFA in der Lage ist, monozytäre Phagozytose von mit monoklonalen Antikörpern opsonierten Thrombozyten dosisabhängig und hochspezifisch nachzuweisen – eine funktionelle Methode, um genau diesen Sachverhalt zu untersuchen.

4.3.1 Fetale- und neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT)

Trotz vielen Untersuchungen sind die Ursachen und Folgen von FNAIT bis heute noch nicht vollends verstanden. Eine zuverlässige Vorhersage über den Schweregrad und Verlauf der Erkrankung ist nach heutigem Stand nicht möglich. Eine schwerwiegende

Komplikation, die intrazerebrale Blutung (ICH), wurde in einer großen retrospektiven Studie von Tiller et al. im Zeitraum von 2001 bis 2010 mit 43 bestätigten FNAIT Fälle aus 9 verschiedenen Ländern untersucht. Es wurde besonders Augenmerk auf den Zeitpunkt einer aufgetretenen Blutung gelegt. Die meisten Blutungen begannen bereits zum Ende des zweiten Trimesters. Von den 43 beschriebenen Fällen haben lediglich 28 überlebt – 23 davon mit schweren neurologischen Defiziten (zerebrale Parese, geistige und körperliche Behinderungen, Blindheit oder Sehbehinderungen, sowie Epilepsien). Ein Großteil der Fälle (63 %) war die erste Geburt der Schwangeren. Schwerwiegende Komplikationen scheinen also auch ohne eine vorausgegangene, immunisierende Schwangerschaft aufzutreten (Tiller et al. 2013). Dies spricht dafür, dass eine Immunisierung frühzeitig stattfindet. Antigen und Antikörper müssen hierfür in jeweiliger Richtung durch die Plazenta transportiert werden.

Eine weitere Studie von Knight et al. aus Großbritannien bestätigt diese Aussage: Von insgesamt 173 Neugeborenen mit der Diagnose FNAIT hatten 43 ältere Geschwister mit einer FNAIT-Anamnese, eine

Prädisposition war also bekannt. Hier wurde in den meisten Fällen eine antenatale Therapie durchgeführt – mindestens mit IVIG, öfter auch zusammen mit Steroiden oder Thrombozytentransfusionen. Die restlichen Fälle waren Erstdiagnosen und eine antenatale Therapie konnte nicht zeitgerecht durchgeführt werden. Die Studie zeigte, dass die Erstdiagnosen in verschiedenen Parametern ein schlechteres Ergebnis erzielten als die Betroffenen mit einer Prädisposition. Erstdiagnosen hatten ein 20 %iges Risiko eine ICH zu entwickeln (Prädisponierte: 4 %), 22 % für allgemeine Komplikationen wie Fehlgeburten, Schwangerschaftsabbrüche oder Tod unter Geburt (Prädisponierte: 8 %). In der 1-Jahres Nachuntersuchung wurden in der Gruppe der Erstdiagnosen 2 Todesfälle und 7 geistige oder körperliche Behinderungen (Sehbehinderung, motorische Störungen oder verlangsamte Entwicklung) beschrieben. In der Gruppe der Prädisponierten gab es weder Todesfälle, noch Fälle geistiger oder körperlicher Behinderung (Knight et al. 2011). Die besseren Ergebnisse in der Gruppe der Prädisponierten können mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die früh eingeleitete Therapie erklärt werden. Eine solche frühe Therapie (laut Tiller et al. am besten vor der 20 SSW) mit IVIG kann nur eingeleitete werden, wenn die

Erkrankung oder eine Prädisposition schon früh erkannt wird. Dies kann z.B. durch eine Anamnese der früheren Schwangerschaften gewährleistet werden. Diese beiden Studien betrachtend, erscheint die Etablierung einer Methode sinnvoll, die in der Lage ist eine zuverlässige Aussage über den Schweregrad der Erkrankung zu treffen. In vielen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Schwangere mit der Diagnose FNAIT erhöhte anti-HPA-1a Titer vorwiesen, jedoch korrelierte dieser Antikörpertiter nicht immer mit dem klinischen Schweregrad der FNAIT (Vos et al. 2020; Kamphuis et al. 2014; Ghevaert et al. 2007; Killie et al. 2007). Interessanterweise fielen Patienten (anti-HPA-1a Antikörper nachgewiesen) beim Vorliegen einer ICH mit einer sehr geringen Thrombozytenzahl auf. Im Zusammenhang mit anti-HPA-1a Antikörpern wurde allerdings auch in vielen Fällen eine geringe Thrombozytenzahl festgestellt, ohne dass die Patienten eine ICH entwickelten. Ein kausaler Zusammenhang zwischen niedrigen Thrombozytenzahlen und Schwere der Komplikationen lässt sich deshalb auch nicht sicher herstellen (Vos et al. 2020; Kamphuis et al. 2014).

4.3.2 Einflussfaktoren der klinischen Ausprägung von FNAIT

In meinen Ergebnissen zeigt sich, dass anti-HPA-1a Antikörper unterschiedlich stark Phagozytose auslösen (siehe 3.5). Antikörpersubtypen könnten ein Faktor sein, der die klinische Ausprägung der FNAIT beeinflusst. Je nachdem, welche Subtypen bei der betroffenen Schwangeren vorliegen, wird mehr oder weniger Phagozytose induziert. Gegebenenfalls werden Symptome wie ICH auch über andere Mechanismen wie Endothelschäden durch Typ III Antikörper hervorgerufen.

In der aktuellen Forschung werden noch weitere Ursachen für die Variabilität der klinischen Symptome vermutet. Eine davon ist die unterschiedliche Glykosylierung von anti-HPA-1a Antikörpern. Sonneveld et al. haben in einer Studie mit 166 FNAIT Fällen, die Glykosylierung von anti-HPA-1a Antikörpern im Vergleich zum Gesamt-IgG untersucht. Der klinische Schweregrad einer Blutung bei Neugeborenen wurde bestimmt. Eine Abnahme von Fucose, sowie eine Zunahme von Galactose in den Kohlenhydratresten der anti-HPA-1a Antikörper, führte im Vergleich zum Gesamt IgG mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zu einer

schweren Blutung (Sonneveld et al. 2016). Wie es zu diesem Effekt kommt, wurde jedoch nicht untersucht. Wuhrer et al. bestätigen diese Ergebnisse. Auch sie haben eine Zunahme der Galactose und eine Abnahme der Fucose bei anti-HPA-1a Antikörpern im Vergleich zum Gesamt IgG bei Schwangeren mit FNAIT beobachtet (Wuhrer et al. 2009). Shields et al. konnten zeigen, dass diese Abnahme von Fucose zu einer erhöhten Bindungsaffinität zu Fcγ-Rezeptoren führt (Shields et al. 2002). Dies könnte ein Grund sein, warum Schwangere mit gering ausgeprägter Fukosylierung der Antikörper eher Neugeborene mit schweren Blutungen zu Welt bringen, da deren Thrombozyten eher von Phagozyten erkannt werden.

Kapur et al. haben ähnliche Ergebnisse publiziert. Die Untersuchungen zeigten, dass eine geringe Fukosylierung der anti-HPA-1a Antikörper von Schwangeren mit FNAIT zu einer höheren Bindungsaffinität dieser mit einigen Fcγ-Rezeptoren führte (IIIa und IIb). Die Menge an Fucose innerhalb der Kohlenhydratketten der Antikörper korrelierte positiv mit der Thrombozytenzahl der Neugeborenen, sowie negativ mit dem Schweregrad der aufgetretenen Blutungen (Kapur et al. 2014).

Van Osch et al. haben weiterhin beschrieben, dass die Glykosylierung von anti-HLA und anti-HPA-1a Antikörpern mit Galactose und Acetylneuraminsäure, besonders wenn diese gemeinsam binden, die Aktivierung des Komplementsystems stärker fördern, als wenn diese nicht glykosyliert wurden (van Osch et al. 2022).

Der HLA-Genotyp der Schwangeren scheint ebenfalls eine Rolle in der klinischen Manifestation von FNAIT zu spielen. Es ist schon lange bekannt, dass fast alle HPA-1a immunisierten Frauen HLA-DRB3*01:01 positiv sind. Dieses Gen kodiert unter anderem für HLA Klasse II Moleküle, die eine wichtige Rolle in der Antigenpräsentation spielen. Ist das Allel HLA-DRB3*01:01 vorhanden, zeigt sich viel wahrscheinlicher (etwa 25-fach) eine Immunisierung gegen HPA-1a, als wenn das Allel nicht vorhanden ist (Kjeldsen-Kragh und Ahlen 2020). Ein Grund könnte das hier kodierte HLA Klasse II Molekül sein, mit dem eine Präsentation von HPA-1a wesentlich effektiver abläuft und das Immunsystem stärker reagiert. Das Ergebnis ist eine verstärkte Produktion von anti-HPA-1a Antikörpern. In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass klinisch auffällige FNAIT-Fälle mit mütterlichen anti-HPA-1a-Antikörpern fast ausschließlich

bei Müttern mit dem Allel HLA-DRB3*01:01 auftreten, allerdings war keine Korrelation mit dem Schweregrad einer Thrombozytopenie oder dem Auftreten einer ICH erkennbar (Wienzek-Lischka et al. 2017).

4.4 Ausblick

Ein Hauptproblem im klinischen Management von FNAIT ist bis heute die Diagnostik der Erkrankung. Viele Fälle werden gar nicht erkannt, da es keinen etablierten Screeningtest gibt (Brojer et al. 2016). In einigen Ländern (z.B. Polen) wurde mittels eines Screenings für HPA-1b homozygote Frauen versucht Schwangere zu identifizieren, die theoretisch anti-HPA-1a Antikörper bilden können (Uhrynowska et al. 2015). Jedoch konnte anschließend keine Vorhersage über das Auftreten an sich, oder den Schweregrad der Erkrankung getroffen werden. Verschiedene Autoren haben versucht eine Korrelation zwischen dem anti-HPA-1a Antikörpertiter und dem Schweregrad der FNAIT herzustellen. Dies konnte jedoch nie sicher belegt werden (Kjaer et al. 2019).

Die Etablierung eines nicht invasiven, funktionellen *in vitro* Tests, der in der Lage ist, eine Vorhersage über den Schweregrad der fetalen Thrombozytopenie zu treffen, würde die Versorgung von FNAIT-Patienten deutlich verbessern.

Der in dieser Arbeit untersuchte FMIPA ist in der Lage eine dosisabhängige, antigenspezifische monozytäre Phagozytose nachzuweisen. Dies macht ihn zu einem

nützlichen Werkzeug, um antikörperbedingte Phagozytose qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Der FMPA könnte so als Prädiktor für die klinische Ausprägung der FNAIT genutzt werden: Die Phagozytoserate, welche im FMPA bestimmt wird, könnte mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelieren. Versuche mit Serum von betroffenen Schwangeren, bei denen anti-HPA-1a Antikörper nachgewiesen wurden, würden eine sinnvolle Anwendung darstellen, um dies zu überprüfen. Eine Erkennung von Schwangeren mit einem Risiko für schwere Symptome, wäre hilfreich, um eine adäquate fetale Blutungsprophylaxe einzuleiten.

Auch die differenzierte Begutachtung von weiteren Antikörpersubtypen, ist mit der etablierten Methodik vorstellbar.

Wie bereits erwähnt sind wahrscheinlich noch andere Faktoren, wie die Ausprägung und Affinität von Fcγ-Rezeptoren, IgG-Subklassen oder die Glykosylierung der Antikörper von Bedeutung für die Thrombozyteneliminierung. Diese Faktoren wurden in meiner Arbeit nicht untersucht. Der FMPA bietet jedoch gute methodische Grundlagen, um auch diese Einflussfaktoren zu untersuchen.

Um den FMPA als klinischen Test nutzen zu können, sollte die Methodik noch effizienter gestaltet werden. Die Bearbeitung einer Probe dauert insgesamt sechs Stunden. Das verwendete Material wird nicht optimal genutzt – für zwölf Vertiefungen mit isolierten Monozyten werden ca. 30 ml Vollblut benötigt. Für eine entsprechende Menge Thrombozyten ca. 15 ml Vollblut. Die Abläufe sollten vereinfacht und die Materialausschöpfung erhöht werden. Denkbar wäre eine andere Isolationsmethode, eventuell in einem Flüssigmedium ohne Adhärenz der Monozyten. Die Aussage über die Eliminierung von Thrombozyten durch den FMPA ist gegebenenfalls ungenau. Im Durchflusszytometer wurden nicht die phagozytierten Thrombozyten gezählt, sondern die Monozyten, die phagozytiert haben – die Zahl der phagozytierten Thrombozyten je Monozyt wurde nicht berücksichtigt (siehe 3.3, Abbildung H). Ebenfalls nicht beachtet wird die Eliminierung von Thrombozyten im Gewebe, z.B. durch Makrophagen.

Das hier etablierte *in vitro*-Modell der anti-HPA-1a induzierten Phagozytose opsonierter Thrombozyten zeigte eine deutliche Abhängigkeit der Phagozytoserate von der Antikörperkonzentration. Eine prospektive klinische Studie

sollte klären, ob die *in vitro*-Phagozytoserate mit der fetalen/neonatalen Thrombozytenzahl bei anti-HPA-1a-immunisierten Schwangeren assoziiert ist. Zutreffendenfalls könnte ein funktioneller *in vitro*-Test das Management von anti-HPA-1a immunisierten Schwangeren deutlich verbessern.

5 Zusammenfassung

Die fetale- und neonatale Alloimmunthrombozytopenie ist eine folgenschwere Erkrankung, deren Pathomechanismus noch nicht vollends geklärt ist. Betroffene Neugeborene zeigen ein sehr breites klinisches Spektrum – von asymptomatisch bis hin zu schweren intrazerebralen Blutungen. Als Ursache hierfür sind in den meisten Fälle Antikörper der Mutter gegen humane Plättchenantigene des Kindes gefunden worden (anti-HPA Antikörper). In der kaukasischen Bevölkerung immunisiert sich die Mutter am häufigsten durch das Merkmal HPA-1a, dies auch bereits in einer ersten Schwangerschaft. Verschiedene Berichte über einen Zusammenhang zwischen Antikörpertiter oder Antikörpersubtypen und der klinischen Manifestation der Erkrankung werden in der Literatur kontrovers diskutiert.

In dieser Arbeit wurde ein Phagozytoseassay (FMPA) etabliert, der zur Untersuchung monozytärer Phagozytose als mögliche Ursache von FNAIT genutzt werden soll. Es konnte gezeigt werden, dass der entwickelte Assay antigenspezifisch und dosisabhängig die Phagozytose von mit pHrodo markierten und mit Antikörpern opsonierten

Thrombozyten nachweisen kann. Monoklonale Antikörper gegen HPA-1a (Subtyp I und II) haben antigenspezifisch und dosisabhängig signifikant HPA-1a homozygote Thrombozyten opsoniert und zur Phagozytose geführt. Im Vergleich zu Antikörpern gegen $\alpha_v\beta_3$ (als Surrogat für Subtyp III) – diese habe keine Phagozytose induziert. Innerhalb der Antikörpersubtypen I und II kam es zu unterschiedlich starker Phagozytose.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der etablierte Assay monozytäre Phagozytose antigenspezifisch und dosisabhängig darstellen kann. Nur bestimmte Anti-HPA-1a Antikörpersubtypen induzieren Phagozytose. Eine Assoziation der *in vitro*-Phagozytoserate mit dem Schweregrad der fetale/neonatalen Thrombozytopenie erscheint möglich. Diese Hypothese sollte in einer prospektiven klinischen Studie überprüft werden.

6 Summary

Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia is a serious disease whose pathomechanism is not yet fully understood. Affected newborns show a very broad clinical spectrum - from asymptomatic to severe intracranial hemorrhage. In most cases, the cause is found to be antibodies of the mother against human platelet antigens of the child (anti-HPA antibodies). In the Caucasian population, mothers most frequently are immunized by HPA-1a, even in their first pregnancy. Various reports discuss an association between antibody titers or antibody subtypes and clinical manifestation of the disease.

In this work, a phagocytosis assay (FMFA) was established to investigate monocytic phagocytosis as a possible cause of FNAIT. It was shown that the developed assay can reliably detect phagocytosis of platelets labeled with pHrodo and opsonized with antibodies. Monoclonal antibodies against HPA-1a (subtype I and II) significantly opsonized HPA-1a homozygous platelets in an antigen-specific and dose-dependent manner and led to phagocytosis. Compared with antibodies against $\alpha V\beta 3$ (surrogate for subtype III) - these had not induced phagocytosis.

In conclusion, the designed assay can represent monocytic phagocytosis in an antigen-specific and dose-dependent manner. Only certain anti-HPA-1a antibody subtypes induce phagocytosis. An association of the in vitro phagocytosis rate with the severity of fetal/neonatal thrombocytopenia appears possible. This hypothesis should be tested in a prospective clinical study.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABH	A-,B- und H-Transferase
ACD-A	Acid-Citrate-Dextrose Solution A
APC	Allophycocyanin
B	B-Zelle
Ba	Basophiler Granulozyt
C1q	Teil 1q des Komplementsystems
Ca ²⁺	Calcium zweifach positive geladen
CaCl ₂	Calciumchlorid
CD	Clusters of differentiation
cDNS	c Desoxyribonukelinsäure
CFDA-SE	5(6)-Carboxyfluorescein-Diacetate-Succinimidyl-Ester
C _H	Konstante Region, schwere Kette
C _L	Konstante Region, leichte Kette
DC	Dendritische Zellen
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DDGZ	doppelte Dichtegradienten-Zentrifugation
DRB3	DR Beta 3
EDGZ	einfachen Dichtegradienten-Zentrifugation
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EGF-1	Epidermal growth factor 1
Eo	Eosinophile Granulozyten
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting

Abkürzungsverzeichnis

FcR	Fc Rezeptor
FCS	Fetal calf serum
FMPA	Flow cytometric monocyte-based phagocytosis assay
FNAIT	Fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie
FSC	Forward scatter
GP	Glykoprotein
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
HBSS	Hanks balanced salt solution
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HPA	Humanes Plättchantigen
ICH	Intracranial hemorrhage
IgA	Immunglobulin A
IgD	Immunglobulin D
IgE	Immunglobulin E
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IGSF	Immunglobulin Superfamilie
IL	Interleukin
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
IVIG	Intravenöse Gabe von Immunglobulin G
LPS	Lipopolysaccharide
Ma	Makrophagen
MAIPA	Monoclonal Antibody Immobilization Assay

Abkürzungsverzeichnis

Mg ²⁺	Magnesium, zweifach positive geladen
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHC	Major histocompatibility complex
MIP-β1	Macrophage inflammatory protein β1
Mo	Monozyt
MPS	Monozytäres Phagozytose-System
n	Anzahl
Ne	Neutrophile Granulozyten
NK	Natürliche Killerzellen
P/E/P	Prostaglandin E ₁ /EDTA/PBS
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PRP	Plättchenreiches Plasma
PSI	Plexin-semaphorin-integrin
RGD	Arginyl-glycyl-aspartic acid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SD	Standardabweichung
SSC	Side scatter
SSW	Schwangerschaftswochen
Thro	Thrombozyten
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose Faktor
UKGM	Universität Klink Gießen und Marburg
V _H	Variable Region, schwere Kette

Abkürzungsverzeichnis

V _L	Variable Region, leichte Kette
VLA-2	Membran-Glykoprotein Ia-IIa
vWF	Von Willebrand Faktor
WBZ	Weiße Blutzellen

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung A. Schematische Darstellung des $\alpha\text{V}\beta_3$ -Komplexes	15
Abbildung B. Schematische Darstellung des $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ Komplexes mit eingezeichneten Lokalisationen der HPA-Antigene	19
Abbildung C. Schematische Darstellung eines Antikörpers	21
Abbildung D. Fc γ -rezeptorvermittelte Phagozytose.	28
Abbildung E. Schematische Darstellung des optischen Apparates eines Durchflusszytometers.	50
Abbildung F. Versuchsaufbau	54
Abbildung G. Adhärente Monozyten phagozytieren opsonierte Thrombozyten	58
Abbildung H. Mikroskopische Darstellung monozytärer Phagozytose von opsonierten Thrombozyten in 100-facher Vergrößerung.....	60
Abbildung I. Schematische Darstellung der Funktionsweise von pHrodo	61
Abbildung J. Die Monozytenausbeute der doppelten Dichtegradienten- Zentrifugation (DDGZ) ist signifikant niedriger als die der einfachen Dichtegradienten-Zentrifugation (EDGZ).	64
Abbildung K. Die Phagozytoserate der Monozyten nach einfacher Dichtegradienten-Zentrifugation (EDGZ) zeigt keinen signifikanten Unterschied zu der Phagozytoserate der Monozyten, nach doppelter Dichtegradienten-Zentrifugation (DDGZ)	66
Abbildung L. Monozyten phagozytieren opsonierte Thrombozyten besser in Anwesenheit von divalenten Kationen.....	68
Abbildung M. Monozyten phagozytieren opsonierte Thrombozyten in RPMI1640 unabhängig von FCS.	70
Abbildung N. Monoklonale Antikörper gegen das HPA-1a Antigen induzieren antigenspezifisch Phagozytose	72
Abbildung O. Der monoklonale Antikörper 26.4 induziert signifikant mehr Phagozytose als SZ21 oder B2G1	75
Abbildung P. Monoklonale Antikörper gegen $\alpha\text{V}\beta_3$ induzieren keine Phagozytose	77

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Affinität der verschiedenen Fcγ-Rezeptoren	31
Tabelle 2 Labormaterial	33
Tabelle 3 Chemikalien	35
Tabelle 4 Pufferlösungen	37
Tabelle 5 Antikörper	38
Tabelle 6 Genutzte Fluoreszenzen mit dem zugehörigen FACS-Kanal.....	39
Tabelle 7 Geräte.....	40
Tabelle 8 Software	41

10 Literaturverzeichnis

Abbas, Abul K.; Lichtman, Andrew H.; Pillai, Shiv (2015): Cellular and molecular immunology. 8. ed., internat. ed. Philadelphia, Pa.: Elsevier Saunders.

Ackerman, Margaret E.; Moldt, Brian; Wyatt, Richard T.; Dugast, Anne-Sophie; McAndrew, Elizabeth; Tsoukas, Stephen et al. (2011): A robust, high-throughput assay to determine the phagocytic activity of clinical antibody samples. In: *Journal of immunological methods* 366 (1-2), S. 8–19. DOI: 10.1016/j.jim.2010.12.016.

Allen, D. L.; Samol, J.; Benjamin, S.; Verjee, S.; Tusold, A.; Murphy, M. F. (2004): Survey of the use and clinical effectiveness of HPA-1a/5b-negative platelet concentrates in proven or suspected platelet alloimmunization. In: *Transfusion medicine (Oxford, England)* 14 (6), S. 409–417. DOI: 10.1111/j.1365-3148.2004.00536.x.

Alm, Julia; Duong, Yalin; Wienzek-Lischka, Sandra; Cooper, Nina; Santoso, Sentot; Sachs, Ulrich J. et al. (2022): Anti-human platelet antigen-5b antibodies and fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia; incidental association or cause and effect? In: *British journal of haematology* 198 (1), S. 14–23. DOI: 10.1111/bjh.18173.

Anderson, C. L.; Shen, L.; Eicher, D. M.; Wewers, M. D.; Gill, J. K. (1990): Phagocytosis mediated by three distinct Fc gamma receptor classes on human leukocytes. In: *The Journal of Experimental Medicine* 171 (4), S. 1333–1345. DOI: 10.1084/jem.171.4.1333.

Bakchoul, Tamam; Kubiak, Sebastian; Krautwurst, Annika; Roderfeld, Monika; Siebert, Hans C.; Bein, Gregor et al. (2011): Low-avidity anti-HPA-1a alloantibodies are capable of antigen-

positive platelet destruction in the NOD/SCID mouse model of alloimmune thrombocytopenia. In: *Transfusion* 51 (11), S. 2455–2461. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2011.03171.x.

Bakchoul, Tamam; Sachs, Ulrich J. (2016): Platelet destruction in immune thrombocytopenia. Understanding the mechanisms. In: *Hamostaseologie* 36 (3), S. 187–194. DOI: 10.5482/HAMO-14-09-0043.

Baker, Jillian M.; Shehata, Nadine; Bussel, James; Murphy, Michael F.; Greinacher, Andreas; Bakchoul, Tamam et al. (2019): Postnatal intervention for the treatment of FNAIT: a systematic review. In: *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association* 39 (10), S. 1329–1339. DOI: 10.1038/s41372-019-0360-7.

Bayat, Behnaz; Traum, Annalena; Berghöfer, Heike; Werth, Silke; Zhu, Jieqing; Bein, Gregor et al. (2019): Current Anti-HPA-1a Standard Antibodies React with the $\beta 3$ Integrin Subunit but not with $\alpha 1b\beta 3$ and $\alpha v\beta 3$ Complexes. In: *Thrombosis and haemostasis* 119 (11), S. 1807–1815. DOI: 10.1055/s-0039-1696716.

Beers, Stephen A.; Glennie, Martin J.; White, Ann L. (2016): Influence of immunoglobulin isotype on therapeutic antibody function. In: *Blood* 127 (9), S. 1097–1101. DOI: 10.1182/blood-2015-09-625343.

Bennett, J. S.; Catella-Lawson, F.; Rut, A. R.; Vilaire, G.; Qi, W.; Kapoor, S. C. et al. (2001): Effect of the PI(A2) alloantigen on the function of beta(3)-integrins in platelets. In: *Blood* 97 (10), S. 3093–3099. DOI: 10.1182/blood.v97.10.3093.

Bertrand, G.; Martageix, C.; Jallu, V.; Vitry, F.; Kaplan, C. (2006): Predictive value of sequential maternal anti-HPA-1a antibody concentrations for the severity of fetal alloimmune

thrombocytopenia. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 4 (3), S. 628–637. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2006.01809.x.

Bessos, H.; Turner, M.; Urbaniak, S. J. (2005): Is there a relationship between anti-HPA-1a concentration and severity of neonatal alloimmune thrombocytopenia? In: *Immunohematology* 21 (3), S. 102–109.

Birchall, Janet E.; Murphy, Michael F.; Kaplan, Cecile; Kroll, Hartmut (2003): European collaborative study of the antenatal management of feto-maternal alloimmune thrombocytopenia. In: *British journal of haematology* 122 (2), S. 275–288. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2003.04408.x.

Bizzozzero, Julius (1882): Ueber einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung. In: *Archiv f. pathol. Anat.* 90 (2), S. 261–332. DOI: 10.1007/BF01931360.

Borne AEGK, Decary F. von dem (Hg.) (1990): Working party on platelet serology. Nomenclature of platelet-specific antigens. ICSH/ISBT.

Böyum, A. (1968): Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. In: *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation. Supplementum* 97, S. 77–89.

Brojer, Ewa; Husebekk, Anne; Dębska, Marzena; Uhrynowska, Małgorzata; Guz, Katarzyna; Orzińska, Agnieszka et al. (2016): Fetal/Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia: Pathogenesis, Diagnostics and Prevention. In: *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 64 (4), S. 279–290. DOI: 10.1007/s00005-015-0371-9.

Bruhns, Pierre; Iannascoli, Bruno; England, Patrick; Mancardi, David A.; Fernandez, Nadine; Jorieux, Sylvie; Daëron, Marc (2009): Specificity and affinity of human Fcγ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. In: *Blood* 113 (16), S. 3716–3725. DOI: 10.1182/blood-2008-09-179754.

Bundesärztekammer Querschnitts-Leitlinien. Querschnitts-Leitlinien (BÄK) zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten - Gesamtnovelle 2020 (2021). Online verfügbar unter <https://www.bundesaeztekammer.de/aerzte/medizin-und-ethik/wissenschaftlicher-beirat/veroeffentlichungen/haemotherapietransfusionsmedizin/querschnitt-leitlinie/>, zuletzt aktualisiert am 18.06.2021, zuletzt geprüft am 07.04.2022.

Charo, I. F.; Nannizzi, L.; Smith, J. W.; Cheresch, D. A. (1990): The vitronectin receptor α_vβ₃ binds fibronectin and acts in concert with α₅β₁ in promoting cellular attachment and spreading on fibronectin. In: *The Journal of Cell Biology* 111 (6 Pt 1), S. 2795–2800. DOI: 10.1083/jcb.111.6.2795.

Chen, Zi Yan; Oswald, Brigitta Elaine; Sullivan, Jade A.; Dahmani, Fatima Zohra; Pasman, Yfke; Liu, Zhenze et al. (2019): Platelet physiology and immunology: pathogenesis and treatment of classical and non-classical fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. In: *Ann. Blood* 4, S. 29. DOI: 10.21037/aob.2019.12.04.

Christie, D. J.; Swinehart, C. D. (1992): Human platelet activating antibodies. In: *Seminars in thrombosis and hemostasis* 18 (2), S. 186–192. DOI: 10.1055/s-2007-1002424.

Coller, Barry S.; Shattil, Sanford J. (2008): The GPIIb/IIIa (integrin α_{IIb}β₃) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend. In: *Blood* 112 (8), S. 3011–3025. DOI: 10.1182/blood-2008-06-077891.

Curtis, B. R.; McFarland, J. G. (2014): Human platelet antigens - 2013. In: *Vox sanguinis* 106 (2), S. 93–102. DOI: 10.1111/vox.12085.

Daffos, F.; Forestier, F.; Muller, J.Y; Reznikoff-Etievant, M.F; Habibi, B.; Capella-Pavlovsky, M. et al. (1984): Prenatal treatment of alloimmune thrombocytopenia. In: *The Lancet* 324 (8403), S. 632. DOI: 10.1016/S0140-6736(84)90614-7.

Dale, David C.; Boxer, Laurence; Liles, W. Conrad (2008): The phagocytes: neutrophils and monocytes. In: *Blood* 112 (4), S. 935–945. DOI: 10.1182/blood-2007-12-077917.

Dekkers, Gillian; Bentlage, Arthur E. H.; Stegmann, Tamara C.; Howie, Heather L.; Lissenberg-Thunnissen, Suzanne; Zimring, James et al. (2017): Affinity of human IgG subclasses to mouse Fc gamma receptors. In: *mAbs* 9 (5), S. 767–773. DOI: 10.1080/19420862.2017.1323159.

Del Conde, Ian; Cruz, Miguel A.; Zhang, Hui; López, José A.; Afshar-Kharghan, Vahid (2005): Platelet activation leads to activation and propagation of the complement system. In: *The Journal of Experimental Medicine* 201 (6), S. 871–879. DOI: 10.1084/jem.20041497.

Dong, Xianchi; Mi, Li-Zhi; Zhu, Jianghai; Wang, Wei; Hu, Ping; Luo, Bing-Hao; Springer, Timothy A. (2012): $\alpha(V)\beta(3)$ integrin crystal structures and their functional implications. In: *Biochemistry* 51 (44), S. 8814–8828. DOI: 10.1021/bi300734n.

Durchflusszytometrie – Fabian K. (Diskussion) - Eigenes Werk (2022), zuletzt aktualisiert am 17.05.2022, zuletzt geprüft am 31.05.2022.

Eksteen, Mariana; Tiller, Heidi; Averina, Maria; Heide, Gøril; Kjaer, Mette; Ghevaert, Cedric et al. (2015): Characterization of a human platelet antigen-1a-specific monoclonal antibody derived

from a B cell from a woman alloimmunized in pregnancy. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 194 (12), S. 5751–5760. DOI: 10.4049/jimmunol.1401599.

Elefant, Elisabeth (2012): Le passage placentaire des immunoglobulines. In: *Bulletin de l'Academie nationale de medecine* 196 (8), S. 1601–1612.

Epstein, Robert D.; Lozner, Eugene L.; Cobbey, Theodore S.; Davidson, Charles S. (1950): Congenital thrombocytopenic purpura. In: *The American Journal of Medicine* 9 (1), S. 44–56. DOI: 10.1016/0002-9343(50)90007-6.

Fiedler, M. (2011): Identifikation zellulärer Liganden Cytomegalovirus-kodierter Fcγ-Rezeptoren. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

Fiore, Mathieu; Bayat, Behnaz; Phuangtham, Roongaroon; Blouin, Laura; Huguenin, Yoann; Bein, Gregor; Santoso, Sentot (2021): Immunization against αIIb β3 and αv β3 in Glanzmann thrombasthenia patients carrying the French Gypsy mutation. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 19 (1), S. 255–261. DOI: 10.1111/jth.15117.

Flannagan, Ronald S.; Jaumouillé, Valentin; Grinstein, Sergio (2012): The cell biology of phagocytosis. In: *Annual review of pathology* 7, S. 61–98. DOI: 10.1146/annurev-pathol-011811-132445.

Gawaz, Meinrad Paul (1999): Das Blutplättchen. Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung. Stuttgart: Thieme.

Ghevaert, Cedric; Campbell, Kate; Stafford, Prachi; Metcalfe, Paul; Casbard, Angela; Smith, Graham A. et al. (2007): HPA-1a antibody potency and bioactivity do not predict severity of

fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. In: *Transfusion* 47 (7), S. 1296–1305. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2007.01273.x.

Ginsberg, M. H.; Du, X.; O'Toole, T. E.; Loftus, J. C. (1995): Platelet integrins. In: *Thrombosis and haemostasis* 74 (1), S. 352–359.

Gremmel, Thomas; Frelinger, Andrew L.; Michelson, Alan D. (2016): Platelet Physiology. In: *Seminars in thrombosis and hemostasis* 42 (3), S. 191–204. DOI: 10.1055/s-0035-1564835.

Griffin, H. M.; Ouwehand, W. H. (1995): A human monoclonal antibody specific for the leucine-33 (P1A1, HPA-1a) form of platelet glycoprotein IIIa from a V gene phage display library. In: *Blood* 86 (12), S. 4430–4436. DOI: 10.1182/blood.V86.12.4430.bloodjournal86124430.

Guilliams, Martin; Mildner, Alexander; Yona, Simon (2018): Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. In: *Immunity* 49 (4), S. 595–613. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.10.005.

Hagberg, I. A.; Lyberg, T. (2000): Evaluation of circulating platelet-leukocyte conjugates: a sensitive flow cytometric assay well suited for clinical studies. In: *Platelets* 11 (3), S. 151–160. DOI: 10.1080/095371000403080.

Handin, R. I.; Stossel, T. P. (1974): Phagocytosis of antibody-coated platelets by human granulocytes. In: *The New England journal of medicine* 290 (18), S. 989–993. DOI: 10.1056/NEJM197405022901803.

Hed, J. (1998): Role of complement in immune or idiopathic thrombocytopenic purpura. In: *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992). Supplement* 424, S. 37–40. DOI: 10.1111/j.1651-2227.1998.tb01231.x.

Hoffmeister, Karin M.; Felbinger, Thomas W.; Falet, Hervé; Denis, Cécile V.; Bergmeier, Wolfgang; Mayadas, Tanya N. et al. (2003): The clearance mechanism of chilled blood platelets. In: *Cell* 112 (1), S. 87–97. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)01253-9.

Holzwarth, Sarah Theresa; Bayat, Behnaz; Zhu, Jieqing; Phuangtham, Roongaroon; Fischer, Lars; Boeckelmann, Doris et al. (2020): Naturally occurring point mutation Cys460Trp located in the I-EGF1 domain of integrin $\beta 3$ alters the binding of some anti-HPA-1a antibodies. In: *Transfusion* 60 (9), S. 2097–2107. DOI: 10.1111/trf.15960.

Hulme, Edward C.; Trevethick, Mike A. (2010): Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation. In: *British journal of pharmacology* 161 (6), S. 1219–1237. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00604.x.

Humphries, M. J.; Mould, A. P. (2001): Structure. An anthropomorphic integrin. In: *Science (New York, N. Y.)* 294 (5541), S. 316–317. DOI: 10.1126/science.1066240.

Hynes, Richard O. (1992): Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. In: *Cell* 69 (1), S. 11–25. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90115-S.

Hynes, Richard O. (2002): Integrins. In: *Cell* 110 (6), S. 673–687. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00971-6.

Ishikawa, Tomoko; Takizawa, Takami; Iwaki, Jun; Mishima, Takuya; Ui-Tei, Kumiko; Takeshita, Toshiyuki et al. (2015): Fc gamma receptor IIb participates in maternal IgG trafficking of human placental endothelial cells. In: *International Journal of Molecular Medicine* 35 (5), S. 1273–1289. DOI: 10.3892/ijmm.2015.2141.

Jaegtvik, S.; Husebekk, A.; Aune, B.; Oian, P.; Dahl, L. B.; Skogen, B. (2000): Neonatal alloimmune thrombocytopenia due

to anti-HPA 1a antibodies; the level of maternal antibodies predicts the severity of thrombocytopenia in the newborn. In: *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 107 (5), S. 691–694. DOI: 10.1111/j.1471-0528.2000.tb13315.x.

Jefferis, Roy; Lund, John (2002): Interaction sites on human IgG-Fc for FcγR: current models. In: *Immunology Letters* 82 (1-2), S. 57–65. DOI: 10.1016/S0165-2478(02)00019-6.

Jenny C. Jin; Polina Ferd; Madhavi Lakkaraja; Karen Manotas; James B. Bussel (2014): Necessity of therapeutic prophylaxis in fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia antenatally in first pregnancies. In: *American Journal of Hematology* 89 (6), E17-E17. Online verfügbar unter https://www.researchgate.net/publication/278261748_Necessity_of_therapeutic_prophylaxis_in_fetalneonatal_alloimmune_thrombocytopenia_antenatally_in_first_pregnancies.

Jung, Sunghoon; Sen, Arindom; Rosenberg, Lawrence; Behie, Leo A. (2010): Identification of growth and attachment factors for the serum-free isolation and expansion of human mesenchymal stromal cells. In: *Cytotherapy* 12 (5), S. 637–657. DOI: 10.3109/14653249.2010.495113.

Kamphuis, Marije M.; Paridaans, Noortje P.; Porcelijn, Leendert; Lopriore, Enrico; Oepkes, Dick (2014): Incidence and consequences of neonatal alloimmune thrombocytopenia: a systematic review. In: *Pediatrics* 133 (4), S. 715–721. DOI: 10.1542/peds.2013-3320.

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. In: *British journal of haematology* 78 (3), S. 425–429. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1991.tb04459.x.

- Kaplan, Cecile (2006): Foetal and neonatal alloimmune thrombocytopaenia. In: *Orphanet journal of rare diseases* 1, S. 39. DOI: 10.1186/1750-1172-1-39.
- Kapur, Rick; Heitink-Pollé, Katja M. J.; Porcelijn, Leendert; Bentlage, Arthur E. H.; Bruin, Marrie C. A.; Visser, Remco et al. (2015): C-reactive protein enhances IgG-mediated phagocyte responses and thrombocytopenia. In: *Blood* 125 (11), S. 1793–1802. DOI: 10.1182/blood-2014-05-579110.
- Kapur, Rick; Kustiawan, Iwan; Vestrheim, Anne; Koeleman, Carolien A. M.; Visser, Remco; Einarsdottir, Helga K. et al. (2014): A prominent lack of IgG1-Fc fucosylation of platelet alloantibodies in pregnancy. In: *Blood* 123 (4), S. 471–480. DOI: 10.1182/blood-2013-09-527978.
- Kerntke, Christina; Nimmerjahn, Falk; Biburger, Markus (2020): There Is (Scientific) Strength in Numbers: A Comprehensive Quantitation of Fc Gamma Receptor Numbers on Human and Murine Peripheral Blood Leukocytes. In: *Frontiers in immunology* 11, S. 118. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00118.
- Kiefel, V. (1992): The MAIPA assay and its applications in immunohaematology. In: *Transfusion medicine (Oxford, England)* 2 (3), S. 181–188. DOI: 10.1111/j.1365-3148.1992.tb00153.x.
- 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. In: *Blood* 70 (6), S. 1722–1726.
- Kiefel, Volker (2010): Transfusionsmedizin und Immunhämatologie. Grundlagen - Therapie - Methodik. 4. überarbeitete und erweiterte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter

<http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10448293>.

Killie, Mette Kjaer; Husebekk, Anne; Kaplan, Cecile; Taaning, Ellen; Skogen, Bjørn (2007): Maternal human platelet antigen-1a antibody level correlates with the platelet count in the newborns: a retrospective study. In: *Transfusion* 47 (1), S. 55–58. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2007.01063.x.

Kjaer, Mette; Bertrand, Gerald; Bakchoul, Tamam; Massey, Edwin; Baker, Jillian M.; Lieberman, Lani et al. (2019): Maternal HPA-1a antibody level and its role in predicting the severity of Fetal/Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia: a systematic review. In: *Vox sanguinis* 114 (1), S. 79–94. DOI: 10.1111/vox.12725.

Kjeldsen-Kragh, Jens; Ahlen, Maria Therese (2020): Foetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia - The role of the HLA-DRB3*01:01 allele for HPA-1a-immunisation and foetal/neonatal outcome. In: *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis* 59 (1), S. 102707. DOI: 10.1016/j.transci.2019.102707.

Kjeldsen-Kragh, Jens; Bein, Gregor; Tiller, Heidi (2023): Pregnant Women at Low Risk of Having a Child with Fetal and Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia Do Not Require Treatment with Intravenous Immunoglobulin. In: *JCM* 12 (17), S. 5492. DOI: 10.3390/jcm12175492.

Kjeldsen-Kragh, Jens; Titze, Thomas L.; Lie, Benedicte Alexandra; Vaage, John T.; Kjær, Mette (2019): HLA-DRB3*01:01 exhibits a dose-dependent impact on HPA-1a antibody levels in HPA-1a-immunized women. In: *Blood advances* 3 (7), S. 945–951. DOI: 10.1182/bloodadvances.2019032227.

Knight, Marian; Pierce, Matthias; Allen, Dave; Kurinczuk, Jennifer J.; Spark, Patsy; Roberts, David J.; Murphy, Michael F. (2011): The incidence and outcomes of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia: a UK national study using three data sources. In: *British journal of haematology* 152 (4), S. 460–468. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2010.08540.x.

Kroll, Hartmut; Penke, Gabriele; Santoso, Sentot (2005): Functional heterogeneity of alloantibodies against the human platelet antigen (HPA)-1a. In: *Thrombosis and haemostasis* 94 (6), S. 1224–1229. DOI: 10.1160/TH05-03-0159.

Kroll H (2000): Prenatal treatment of fetal alloimmune thrombocytopenia due to anti Br(a) (HPA-5b). Unter Mitarbeit von Bald R, Kiefel V, Giers G. In: *Blood*, 96:250a.

Kumpel, Belinda M.; Sibley, Karin; Jackson, David J.; White, Graham; Soothill, Peter W. (2008): Ultrastructural localization of glycoprotein IIIa (GPIIIa, beta 3 integrin) on placental syncytiotrophoblast microvilli: implications for platelet alloimmunization during pregnancy. In: *Transfusion* 48 (10), S. 2077–2086. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2008.01832.x.

Leu, R. W.; Rummage, J. A.; Horn, M. J. (1989): Characterization of murine macrophage Fc receptor-dependent phagocytosis and antibody-dependent cellular cytotoxicity during in vitro culture with interferons-gamma, alpha/beta and/or fetal bovine serum. In: *Immunobiology* 178 (4-5), S. 340–350. DOI: 10.1016/S0171-2985(89)80057-9.

Lillenthal, Gina-Maria; Rahmüller, Johann; Petry, Janina; Bartsch, Yannic C.; Leliavski, Alexei; Ehlers, Marc (2018): Potential of Murine IgG1 and Human IgG4 to Inhibit the Classical Complement and Fcγ Receptor Activation Pathways. In: *Frontiers in immunology* 9, S. 958. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00958.

Lim, Jihyang; Kim, Yonggoo; Han, Kyungja; Kim, Myungshin; Lee, Kyo-Young; Kim, Won-Il et al. (2002): Flow cytometric monocyte phagocytic assay for predicting platelet transfusion outcome. In: *Transfusion* 42 (3), S. 309–316. DOI: 10.1046/j.1537-2995.2002.00042.x.

Luo, Bing-Hao; Carman, Christopher V.; Springer, Timothy A. (2007): Structural basis of integrin regulation and signaling. In: *Annual review of immunology* 25, S. 619–647. DOI: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141618.

MacPherson, B. R.; Cornish, N. (1986): Platelet adherence and phagocytosis. A method for the detection of platelet antibodies. In: *Transfusion* 26 (5), S. 467–470. DOI: 10.1046/j.1537-2995.1986.26587020128.x.

Mawas, F.; Wiener, E.; Williamson, L. M.; Rodeck, C. H. (1997): Immunoglobulin G subclasses of anti-human platelet antigen 1a in maternal sera: relation to the severity of neonatal alloimmune thrombocytopenia. In: *European journal of haematology* 59 (5), S. 287–292. DOI: 10.1111/j.1600-0609.1997.tb01688.x.

McMillan, R.; Longmire, R. L.; Tavassoli, M.; Armstrong, S.; Yelenosky, R. (1974): In vitro platelet phagocytosis by splenic leukocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura. In: *The New England journal of medicine* 290 (5), S. 249–251. DOI: 10.1056/NEJM197401312900505.

Meinke, Stephan; Sandgren, Per; Mörtberg, Anette; Karlström, Cecilia; Kadri, Nadir; Wikman, Agneta; Höglund, Petter (2016): Platelets made HLA deficient by acid treatment aggregate normally and escape destruction by complement and phagocytes in the presence of HLA antibodies. In: *Transfusion* 56 (2), 370-82; quiz 369. DOI: 10.1111/trf.13350.

Menck, Kerstin; Behme, Daniel; Pantke, Mathias; Reiling, Norbert; Binder, Claudia; Pukrop, Tobias; Klemm, Florian (2014): Isolation of human monocytes by double gradient centrifugation and their differentiation to macrophages in teflon-coated cell culture bags. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (91), e51554. DOI: 10.3791/51554.

Metchnikoff E. (1884): Über Beziehung der Phagocyten zu Milzbrandbacillen.

Murphy, Kenneth M. (2009): Janeway Immunologie. [Place of publication not identified]: Springer.

Murphy, Michael F.; Bussel, James B. (2007): Advances in the management of alloimmune thrombocytopenia. In: *British journal of haematology* 136 (3), S. 366–378. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2006.06418.x.

Najaoui, Abderrahim; Bakchoul, Tamam; Stoy, Johanna; Bein, Gregor; Rummel, Mathias J.; Santoso, Sentot; Sachs, Ulrich J. (2012): Autoantibody-mediated complement activation on platelets is a common finding in patients with immune thrombocytopenic purpura (ITP). In: *European journal of haematology* 88 (2), S. 167–174. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2011.01718.x.

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. In: *J. Clin. Invest.* 83 (5), S. 1778–1781. DOI: 10.1172/JCI114082.

Nieswandt, B.; Bergmeier, W.; Rackebrandt, K.; Gessner, J. E.; Zirngibl, H. (2000): Identification of critical antigen-specific mechanisms in the development of immune thrombocytopenic purpura in mice. In: *Blood* 96 (7), S. 2520–2527.

Nimmerjahn, Falk; Ravetch, Jeffrey V. (2005): Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. In: *Science (New York, N.Y.)* 310 (5753), S. 1510–1512. DOI: 10.1126/science.1118948.

Nimmerjahn, Falk; Ravetch, Jeffrey V. (2008a): Fcγ receptors as regulators of immune responses. In: *Nature reviews. Immunology* 8 (1), S. 34–47. DOI: 10.1038/nri2206.

Nimmerjahn, Falk; Ravetch, Jeffrey V. (2008b): Innate immunity. Totowa, NJ: Humana Press (Methods in molecular biology, 415).

Nogués, Núria (2020): Recent advances in non-invasive fetal HPA-1a typing. In: *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis* 59 (1), S. 102708. DOI: 10.1016/j.transci.2019.102708.

Norris, Peter A. A.; Segel, George B.; Burack, W. Richard; Sachs, Ulrich J.; Lissenberg-Thunnissen, Suzanne N.; Vidarsson, Gestur et al. (2021): FcγRI and FcγRIII on splenic macrophages mediate phagocytosis of anti-glycoprotein IIb/IIIa autoantibody-opsonized platelets in immune thrombocytopenia. In: *Haematologica* 106 (1), S. 250–254. DOI: 10.3324/haematol.2020.248385.

Nurden, Alan T.; Pillois, Xavier; Wilcox, David A. (2013): Glanzmann thrombasthenia: state of the art and future directions. In: *Seminars in thrombosis and hemostasis* 39 (6), S. 642–655. DOI: 10.1055/s-0033-1353393.

Olsson, Bob; Andersson, Per-Ola; Jernås, Margareta; Jacobsson, Stefan; Carlsson, Björn; Carlsson, Lena M. S.; Wadenvik, Hans (2003): T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. In: *Nature medicine* 9 (9), S. 1123–1124. DOI: 10.1038/nm921.

Ouzegdouh Mammasse, Yasmine; Chenet, Christophe; Drubay, Damien; Martageix, Corinne; Cartron, Jean-Pierre; Vainchenker, William; Petermann, Rachel (2020): A new efficient tool for non-invasive diagnosis of fetomaternal platelet antigen incompatibility. In: *British journal of haematology* 190 (5), S. 787–798. DOI: 10.1111/bjh.16593.

Papadea, C.; Check, I. J. (1989): Human immunoglobulin G and immunoglobulin G subclasses: biochemical, genetic, and clinical aspects. In: *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 27 (1), S. 27–58. DOI: 10.3109/10408368909106589.

Pedraza, Claudio E.; Chien, Yung-Ching; McKee, Marc D. (2008): Calcium oxalate crystals in fetal bovine serum: implications for cell culture, phagocytosis and biomineralization studies in vitro. In: *Journal of cellular biochemistry* 103 (5), S. 1379–1393. DOI: 10.1002/jcb.21515.

Peerschke, E. I. B.; Yin, W.; Grigg, S. E.; Ghebrehiwet, B. (2006): Blood platelets activate the classical pathway of human complement. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 4 (9), S. 2035–2042. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2006.02065.x.

Peterson, Julie A.; McFarland, Janice G.; Curtis, Brian R.; Aster, Richard H. (2013): Neonatal alloimmune thrombocytopenia: pathogenesis, diagnosis and management. In: *British journal of haematology* 161 (1), S. 3–14. DOI: 10.1111/bjh.12235.

Platelet Antigen Database | HPA | Versiti (2022). Online verfügbar unter <https://www.versiti.org/hpa>, zuletzt aktualisiert am 14.03.2022, zuletzt geprüft am 14.03.2022.

Price, P. J.; Gregory, E. A. (1982): Relationship between in vitro growth promotion and biophysical and biochemical properties of the serum supplement. In: *In vitro* 18 (6), S. 576–584. DOI: 10.1007/BF02810081.

Proulx, C.; Fillion, M.; Goldman, M.; Bradley, A.; Devine, D.; Décarry, F.; Chartrand, P. (1994): Analysis of immunoglobulin class, IgG subclass and titre of HPA-1a antibodies in alloimmunized mothers giving birth to babies with or without neonatal alloimmune thrombocytopenia. In: *British journal of haematology* 87 (4), S. 813–817. DOI: 10.1111/j.1365-2141.1994.tb06742.x.

Radaev, S.; Motyka, S.; Fridman, W. H.; Sautes-Fridman, C.; Sun, P. D. (2001): The structure of a human type III Fcγ receptor in complex with Fc. In: *Journal of Biological Chemistry* 276 (19), S. 16469–16477. DOI: 10.1074/jbc.M100350200.

Radder, C. M.; Brand, A.; Kanhai, H. H. (2001): A less invasive treatment strategy to prevent intracranial hemorrhage in fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 185 (3), S. 683–688. DOI: 10.1067/mob.2001.116727.

Rijkers, Maaïke; Saris, Anno; Heidt, Sebastiaan; Mulder, Arend; Porcelijn, Leendert; Claas, Frans H. J. et al. (2018): A subset of anti-HLA antibodies induces FcγRIIa-dependent platelet activation. In: *Haematologica* 103 (10), S. 1741–1752. DOI: 10.3324/haematol.2018.189365.

Rijkers, Maaïke; Schmidt, David; Lu, Nina; Kramer, Cynthia S. M.; Heidt, Sebastiaan; Mulder, Arend et al. (2019): Anti-HLA antibodies with complementary and synergistic interaction geometries promote classical complement activation on platelets. In: *Haematologica* 104 (2), S. 403–416. DOI: 10.3324/haematol.2018.201665.

Robson, H. N.; Walker, C. H. M. (1951): Congenital and neonatal thrombocytopenic purpura. In: *Archives of disease in childhood* 26 (126), S. 175–183. DOI: 10.1136/adc.26.126.175.

- Roopenian, Derry C.; Akilesh, Shreeram (2007): FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. In: *Nature reviews. Immunology* 7 (9), S. 715–725. DOI: 10.1038/nri2155.
- Roos, Anja; Daha, Mohamed R. (2002): Antibody-mediated activation of the classical complement pathway in xenograft rejection. In: *Transplant immunology* 9 (2-4), S. 257–270. DOI: 10.1016/s0966-3274(02)00042-4.
- Sachs, Ulrich J.; Bedei, Ivonne; Wienzek-Lischka, Sandra; Cooper, Nina; Ehrhardt, Harald; Axt-Fliedner, Roland; Bein, Gregor (2021a): Fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie, Teil 1. In: *Transfusionsmedizin* 11 (02), S. 112–126. DOI: 10.1055/a-1258-1238.
- Sachs, Ulrich J.; Bedei, Ivonne; Wienzek-Lischka, Sandra; Cooper, Nina; Ehrhardt, Harald; Axt-Fliedner, Roland; Bein, Gregor (2021b): Fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie, Teil 2. In: *Transfusionsmedizin* 11 (02), S. 127–142. DOI: 10.1055/a-1479-8504.
- Santoso, S.; Kiefel, V. (2001): Human platelet alloantigens. In: *Wiener klinische Wochenschrift* 113 (20-21), S. 806–813. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11732116/>.
- Santoso, Sentot; Kroll, Hartmut; Andrei-Selmer, Cornelia L.; Socher, Ines; Rankin, Angela; Kretzschmar, Evelyne et al. (2006): A naturally occurring LeuVal mutation in beta3-integrin impairs the HPA-1a epitope: the third allele of HPA-1. In: *Transfusion* 46 (5), S. 790–799. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2006.00797.x.
- Santoso, Sentot; Wihadmadyatami, Hevi; Bakchoul, Tamam; Werth, Silke; Al-Fakhri, Nadia; Bein, Gregor et al. (2016): Antiendothelial $\alpha\beta 3$ antibodies are a major cause of intracranial bleeding in fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia. In:

Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology 36 (8), S. 1517–1524. DOI: 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. In: *Vox sanguinis* 91 (2), S. 181–183. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2006.00809.x.

Schroeder, Harry W.; Cavacini, Lisa (2010): Structure and function of immunoglobulins. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 125 (2 Suppl 2), S41-52. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.09.046.

Shi, MinLong; Sundramurthy, Kumar; Liu, Bin; Tan, Suet-Mien; Law, S. K. Alex; Lescar, Julien (2005): The crystal structure of the plexin-semaphorin-integrin domain/hybrid domain/I-EGF1 segment from the human integrin beta2 subunit at 1.8-A resolution. In: *Journal of Biological Chemistry* 280 (34), S. 30586–30593. DOI: 10.1074/jbc.M502525200.

Shields, Robert L.; Lai, Jadine; Keck, Rodney; O'Connell, Lori Y.; Hong, Kyu; Meng, Y. Gloria et al. (2002): Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fcγ₃ and antibody-dependent cellular toxicity. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (30), S. 26733–26740. DOI: 10.1074/jbc.M202069200.

Shulman, N. R.; Aster, R. H.; Leitner, A.; Hiller, M. C. (1961): Immunoreactions involving platelets. V. post-transfusion purpura due to a complement-fixing antibody against a genetically controlled platelet antigen, a proposed mechanism for thrombocytopenia and its relevance in "autoimmunity". In: *J. Clin. Invest.* 40 (9), S. 1597–1620. DOI: 10.1172/JCI104383.

Sondermann, P.; Huber, R.; Jacob, U. (1999): Crystal structure of the soluble form of the human fcγ₂ receptor IIb: a new member of the immunoglobulin superfamily at 1.7 Å resolution. In: *The EMBO journal* 18 (5), S. 1095–1103. DOI: 10.1093/emboj/18.5.1095.

Sonneveld, Myrthe E.; Natunen, Suvi; Sainio, Susanna; Koeleman, Carolien A. M.; Holst, Stephanie; Dekkers, Gillian et al. (2016): Glycosylation pattern of anti-platelet IgG is stable during pregnancy and predicts clinical outcome in alloimmune thrombocytopenia. In: *British journal of haematology* 174 (2), S. 310–320. DOI: 10.1111/bjh.14053.

Stanfield, Robyn L.; Wilson, Ian A. (2014): Antibody structure. In: *Microbiology spectrum* 2 (2). DOI: 10.1128/microbiolspec.AID-0012-2013.

Takagi, Junichi; Springer, Timothy A. (2002): Integrin activation and structural rearrangement. In: *Immunological reviews* 186, S. 141–163. DOI: 10.1034/j.1600-065x.2002.18613.x.

Takahashi, Daisuke; Fujihara, Mitsuhiro; Miyazaki, Toru; Matsubayashi, Keiji; Sato, Shinichiro; Azuma, Hiroshi et al. (2017): Flow cytometric quantitation of platelet phagocytosis by monocytes using a pH-sensitive dye, pHrodo-SE. In: *Journal of immunological methods* 447, S. 57–64. DOI: 10.1016/j.jim.2017.04.009.

Takahashi, Daisuke; Fujihara, Mitsuhiro; Miyazaki, Toru; Matsubayashi, Keiji; Sato, Shinichiro; Azuma, Hiroshi et al. (2018): Corrigendum to "Flow cytometric quantitation of platelet phagocytosis by monocytes using a pH-sensitive dye, pHrodo-SE" *Journal of Immunological Methods* 447 (2017) 57-64. In: *Journal of immunological methods* 454, S. 89. DOI: 10.1016/j.jim.2018.02.001.

Thinn, Aye Myat Myat; Wang, Zhengli; Zhou, Dongwen; Zhao, Yan; Curtis, Brian R.; Zhu, Jieqing (2018): Autonomous conformational regulation of β 3 integrin and the conformation-dependent property of HPA-1a alloantibodies. In: *Proc Natl Acad Sci USA* 115 (39), E9105-E9114. DOI: 10.1073/pnas.1806205115.

Tiller, Heidi; Kamphuis, Marije M.; Flodmark, Olof; Papadogiannakis, Nikos; David, Anna L.; Sainio, Susanna et al. (2013): Fetal intracranial haemorrhages caused by fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: an observational cohort study of 43 cases from an international multicentre registry. In: *BMJ open* 3 (3). DOI: 10.1136/bmjopen-2012-002490.

Triantafilou, Martha; Miyake, Kensuke; Golenbock, Douglas T.; Triantafilou, Kathy (2002): Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. In: *Journal of cell science* 115 (Pt 12), S. 2603–2611.

Tsubakio, T.; Kurata, Y.; Kanayama, Y.; Yonezawa, T.; Tarui, S.; Kitani, T. (1983): In vitro platelet phagocytosis in idiopathic thrombocytopenic purpura. In: *Acta haematologica* 70 (4), S. 250–256. DOI: 10.1159/000206736.

Uhrynowska, Małgorzata Ewa; Dębska, Marzena; Guz, Katarzyna; Orzińska, Agnieszka; Wróbel, Agnieszka; Maślanka, Krystyna et al. (2015): Zapobieganie alloimmunologicznej małopłytkowości płodów i noworodków (AIMPN) w Polsce--program PREVFNAIT. In: *Ginekologia polska* 86 (1), S. 62–66. DOI: 10.17772/gp/1901.

Ulmer, A. J.; Flad, H. D. (1979): Discontinuous density gradient separation of human mononuclear leucocytes using Percoll as gradient medium. In: *Journal of immunological methods* 30 (1), S. 1–10. DOI: 10.1016/0022-1759(79)90268-0.

Uribe-Querol, Eileen; Rosales, Carlos (2020): Phagocytosis: Our current understanding of a universal biological process. In: *Frontiers in immunology* 11, S. 1066. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01066.

van Loghem JJ, J.; Dorfmeijer, H.; van Hart, M.; Schreuder, F. (1959): Serological and genetical studies on a platelet antigen (Zw). In: *Vox sanguinis* 4 (2), S. 161–169. DOI: 10.1111/j.1423-0410.1959.tb04032.x.

van Osch, Thijs L. J.; Oosterhoff, Janita J.; Bentlage, Arthur E. H.; Nouta, Jan; Koeleman, Carolien A. M.; Geerdes, Dionne M. et al. (2022): Fc galactosylation of anti-platelet human IgG1 alloantibodies enhances complement activation on platelets. In: *Haematologica* 107 (10), S. 2432–2444. DOI: 10.3324/haematol.2021.280493.

Veldhuisen, Barbera; Porcelijn, Leendert; van der Ellen Schoot, C.; Haas, Masja de (2014): Molecular typing of human platelet and neutrophil antigens (HPA and HNA). In: *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis* 50 (2), S. 189–199. DOI: 10.1016/j.transci.2014.02.014.

Vidarsson, Gestur; Dekkers, Gillian; Rispens, Theo (2014): IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. In: *Frontiers in immunology* 5, S. 520. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00520.

Vos, T. W. de; Winkelhorst, D.; Haas, M. de; Lopriore, E.; Oepkes, D. (2020): Epidemiology and management of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. In: *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for*

Haemapheresis 59 (1), S. 102704. DOI:
10.1016/j.transci.2019.102704.

Wiener, E.; Abeyakoon, O.; Benchetrit, G.; Lyall, M.; Keler, T.; Rodeck, C. H. (2003): Anti-HPA-1a-mediated platelet phagocytosis by monocytes in vitro and its inhibition by Fc gamma receptor (FcgammaR) reactive reagents. In: *European journal of haematology* 70 (2), S. 67–74. DOI: 10.1034/j.1600-0609.2003.00025.x.

Wiener, E.; Mawas, F.; Coates, P.; Hossain, A. K.; Perry, M.; Snachall, S. et al. (2000): HPA-1a-mediated platelet interaction with monocytes in vitro: involvement of Fcgamma receptor (FcgammaR) classes and inhibition by humanised monoclonal anti-FcgammaRI H22. In: *European journal of haematology* 65 (6), S. 399–406. DOI: 10.1034/j.1600-0609.2000.065006399.x.

Wienzek-Lischka, Sandra; König, Inke R.; Papenkort, Eva-Maria; Hackstein, Holger; Santoso, Sentot; Sachs, Ulrich J.; Bein, Gregor (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. In: *Transfusion* 57 (3), S. 533–540. DOI: 10.1111/trf.13950.

Williamson, L. M.; Hackett, G.; Rennie, J.; Palmer, C. R.; Maciver, C.; Hadfield, R. et al. (1998): The natural history of fetomaternal alloimmunization to the platelet-specific antigen HPA-1a (PIA1, Zwa) as determined by antenatal screening. In: *Blood* 92 (7), S. 2280–2287.

Winkelhorst, Dian; Kamphuis, Marije M.; Kloet, Liselotte C. de; Zwaginga, Jaap Jan; Oepkes, Dick; Lopriore, Enrico (2016): Severe bleeding complications other than intracranial hemorrhage in neonatal alloimmune thrombocytopenia: a case series and review of the literature. In: *Transfusion* 56 (5), S. 1230–1235. DOI: 10.1111/trf.13550.

Winkelhorst, Dian; Murphy, Michael F.; Greinacher, Andreas; Shehata, Nadine; Bakchoul, Taman; Massey, Edwin et al. (2017): Antenatal management in fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: a systematic review. In: *Blood* 129 (11), S. 1538–1547. DOI: 10.1182/blood-2016-10-739656.

Wuhrer, Manfred; Porcelijn, Leendert; Kapur, Rick; Koeleman, Carolien A. M.; Deelder, André; Haas, Masja de; Vidarsson, Gestur (2009): Regulated glycosylation patterns of IgG during alloimmune responses against human platelet antigens. In: *Journal of proteome research* 8 (2), S. 450–456. DOI: 10.1021/pr800651j.

Xiong, J. P.; Stehle, T.; Diefenbach, B.; Zhang, R.; Dunker, R.; Scott, D. L. et al. (2001): Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. In: *Science (New York, N.Y.)* 294 (5541), S. 339–345. DOI: 10.1126/science.1064535.

Xiong, Yu-Mei; Haas, Thomas A.; Zhang, Li (2002): Identification of functional segments within the beta2I-domain of integrin alphaMbeta2. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (48), S. 46639–46644. DOI: 10.1074/jbc.M207971200.

Zhang, Feng; Chu, Xiaoxia; Wang, Lin; Zhu, Yuanyuan; Li, Lizhen; Ma, Daoxin et al. (2006): Cell-mediated lysis of autologous platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. In: *European journal of haematology* 76 (5), S. 427–431. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2005.00622.x.

Zhao, Yang; Zou, Weilong; Du, Junfeng; Zhao, Yong (2018): The origins and homeostasis of monocytes and tissue-resident macrophages in physiological situation. In: *Journal of cellular physiology* 233 (10), S. 6425–6439. DOI: 10.1002/jcp.26461.

Zhi, Huiying; Ahlen, Maria Therese; Thinn, Aye Myat Myat; Weiler, Hartmut; Curtis, Brian R.; Skogen, Bjørn et al. (2018):

High-resolution mapping of the polyclonal immune response to the human platelet alloantigen HPA-1a (PIA1). In: *Blood advances* 2 (21), S. 3001–3011. DOI: 10.1182/bloodadvances.2018023341.

Zhou, Dongwen; Thinn, Aye Myat Myat; Zhao, Yan; Wang, Zhengli; Zhu, Jieqing (2018): Structure of an extended $\beta 3$ integrin. In: *Blood* 132 (9), S. 962–972. DOI: 10.1182/blood-2018-01-829572.

Zhu, Guangheng; Zhang, Qing; Reddy, Emily C.; Carrim, Naadiya; Chen, Yunfeng; Xu, Xiaohong Ruby et al. (2017): The integrin PSI domain has an endogenous thiol isomerase function and is a novel target for antiplatelet therapy. In: *Blood* 129 (13), S. 1840–1854. DOI: 10.1182/blood-2016-07-729400.

Ziegler-Heitbrock, Loems; Ancuta, Petronela; Crowe, Suzanne; Dalod, Marc; Grau, Veronika; Hart, Derek N. et al. (2010): Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. In: *Blood* 116 (16), e74-80. DOI: 10.1182/blood-2010-02-258558.

11 Ehrenwörtliche Erklärung

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

Ehrenwörtliche Erklärung

gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

12 Veröffentlichungen

International Society of Blood Transfusion (ISBT)
Posterpräsentation 14.12.2020

O. Lause¹, D. Takahashi², B. Bayat¹, U. Sachs¹, N. Cooper¹, G. Michel¹, S. Santoso¹, G. Bein¹ (2020) *“Anti-HPA-1a antibody subtype against beta-3 integrin, but not alpha-V/beta-3 complex mediates platelet phagocytosis in vitro”*

1 Institute for Clinical Immunology and Transfusion Medicine, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany

2 Central Blood Institute Medical Center, Japanese Red Cross Society, Tokyo, Japan

13 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Gregor Bein für die Bereitstellung des Themas, die fachliche Unterstützung sowie die allumfassende Betreuung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Gabriela Michel, ohne welche die praktische Umsetzung meiner Versuche wohl unmöglich gewesen wäre. Sie stand mir zu jeder Zeit geduldig mit Rat und Tat zur Seite.

Zudem danke ich Herrn Dr. rer. nat. Sentot Santoso sowie Frau Dr. Nina Cooper gleichermaßen für ihre kritische Beurteilung meines Schaffens und der regelmäßigen Anregung für neue Lösungsansätze.

Den Mitarbeiter*innen des Thrombozytenlabors am UKGM danke ich recht herzlich für die methodische Einarbeitung in dieses Projekt.

Mein Dank gilt außerdem den Kollegen*innen, sowie den Spendern, der Blutbank am UKGM die täglich bereit waren mir Proben zur Verfügung zu stellen.

Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie, meiner Partnerin, sowie meinen Freunden für ihre immerwährende Unterstützung und Ratschläge danken.