

**Fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie:
Einfluss des mütterlichen und kindlichen HLA-Genotyps**

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

vorgelegt von Philipp Rainer Andreas Daigfuß
aus Nürnberg

Gießen 2024

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Institut für klinische Immunologie, Transfusionsmedizin und Hämostaseologie

1. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Sachs
2. Gutachter: Prof. Dr. Dieter Körholz

Tag der Disputation: 30.09.2024

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Schwangerschaft und Immunsystem	1
1.2	Die fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie.....	2
1.2.1	Ätiologie und Pathogenese.....	2
1.2.2	Klinisches Bild	3
1.2.3	Pränatales Management.....	5
1.2.4	Postpartale Therapie	6
1.3	HLA-System.....	9
1.4	HLA auf Thrombozyten	10
1.5	Zusammenhang zwischen FNAIT und Anti-HLA-Antikörpern.....	11
1.6	Zielsetzung der Arbeit	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Patientenmaterial	13
2.2	Reagenzien, Materialien und Geräte	16
2.3	HLA-Genotypisierung.....	19
2.3.1	Polymerase-Kettenreaktion	19
2.3.1.1	Theoretische Grundlagen.....	19
2.3.1.2	Praktische Durchführung.....	20
2.3.2	Reverse SSO.....	23
2.3.2.1	Theoretische Grundlagen.....	23
2.3.2.2	Praktische Durchführung.....	24
2.3.2.3	Probenmessung.....	25
2.3.2.4	Auswertung.....	26
2.4	Lymphozytotoxischer Test.....	27
2.4.1	Theoretische Grundlagen.....	27
2.4.2	Praktische Durchführung.....	28
2.4.3	Auswertung.....	29
3	Ergebnisse	31
3.1	Verteilung der Geschlechter und Thrombozytenzahlen.....	31
3.2	Verteilung der HLA-Klasse-I-Merkmale der Kinder.....	34
3.3	Verteilung der HLA-Klasse-I-Merkmale der Mütter.....	35
3.4	Verteilung der HLA-Klasse-II-Merkmale der Mütter	37
3.5	Unterteilung der Verumgruppe	39
3.6	Verteilung der paternal vererbten HLA-Klasse-I-Merkmale der Kinder in der <i>Verumgruppe*</i>	42

3.7 Verteilung der HLA-Klasse-II-Merkmale der Mütter in der <i>Verumgruppe</i> *	44
3.8 Erneute Unterteilung der Gruppen	46
3.9 Bonferroni-Korrektur	49
4 Diskussion	50
4.1 Diskussion der Methoden	50
4.1.1 Diskussion der Probandenauswahl	50
4.1.2 Diskussion der Kreuzprobe zur Unterscheidung der Gruppen	51
4.1.3 Diskussion der HLA-Typisierung	52
4.1.4 Diskussion des Lymphozytoxischen Tests	53
4.2 Diskussion der Ergebnisse	55
4.2.1 Diskussion der Statistischen Analyse	55
4.2.2 Antikörperanalyse versus Epitopenanalyse	55
4.2.3 Verteilung der Geschlechter	57
4.2.4 Verteilung der HLA-Allele	57
4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse und Vergleich mit anderen Arbeiten	58
4.4 Ausblick	59
5 Zusammenfassung	60
6 Summary	61
7 Abkürzungsverzeichnis	62
8 Abbildungsverzeichnis	64
9 Tabellenverzeichnis	65
10 Literaturverzeichnis	66
11 Publikationsverzeichnis	76
12 Ehrenwörtliche Erklärung	77
13 Danksagung	78

1 Einleitung

1.1 Schwangerschaft und Immunsystem

Eine zentrale Eigenschaft des Immunsystems ist die immunologische Toleranz. Darunter versteht man die ausbleibende oder stark verminderte Immunreaktion gegenüber einem präsentierten Antigen. Antigene, welche von körpereigenen Zellen exprimiert werden, bezeichnet man als Autoantigene. Demgegenüber stehen sogenannte Alloantigene, die auf Zellen eines anderen Individuums derselben Art vorkommen. Häufige Alloantigene sind Proteine, die von Genen mit hohem Polymorphismus codiert werden. Klassische Beispiele sind Blutgruppenantigene oder Humane Leukozyten-Antigene (HLA; werden auch als *Major Histocompatibilitycomplex*, MHC, bezeichnet). Diese Alloantigene können beispielsweise durch eine Bluttransfusion, Transplantation oder Schwangerschaft in einen Organismus eingebracht werden. Kommt es nun aufgrund einer fehlenden Immuntoleranz zu einer Immunantwort des Empfängers, kann diese unter Umständen gravierende Folgen haben.

Da ein Fetus sowohl genetisches Material von der Mutter als auch vom Vater vererbt bekommt, ist er bezüglich der Mutter semiallogen. Während der Schwangerschaft findet immer wieder ein feto-maternaler Zelltransfer über die Plazenta statt (Bianchi 2007). Dies führt dazu, dass dem mütterlichen Immunsystem während einer Schwangerschaft fetale Alloantigene präsentiert werden. Glücklicherweise ist der Fetus aber immunprivilegiert und fetale Antigene werden von der Mutter in der Regel toleriert, sodass fetomaternale Inkompatibilitäten mit klinischer Relevanz eher die Ausnahme als die Regel darstellen (Guleria und Sayegh 2007). Zwar geht man davon aus, dass sich etwa ein Drittel bis die Hälfte aller Frauen während einer Schwangerschaft gegen väterliche HL-Antigene immunisieren, doch hat dies normalerweise für den Erfolg einer Schwangerschaft keine Bedeutung (Morin-Papunen et al. 1984; King et al. 1996; Masson et al. 2013; Regan et al. 1991).

Trotzdem kann eine fetomaternale Inkompatibilität in manchen Fällen große Probleme für das Kind bedeuten. Das wohl bekannteste Krankheitsbild, für welches eine Immunreaktion der Mutter gegen kindliche Alloantigene ursächlich ist, ist der *Morbus haemolyticus neonatorum* (auch als *hemolytic disease of the fetus and newborn*,

kurz: HDFN, bezeichnet). Klassischerweise wird dieses Krankheitsbild durch maternale Anti-RhD-Antikörper ausgelöst, es sind jedoch auch Fälle durch Antikörper anderer Blutgruppensysteme beschrieben (z.B. ABO oder Kell). Ist eine Mutter RhD-negativ und der Fetus RhD-positiv, und es kommt während der Geburt zum Übertritt von kindlichem Blut in den mütterlichen Kreislauf, kann dies bei der Mutter die Bildung von Anti-RhD-Antikörpern induzieren. Bei einer zweiten Schwangerschaft mit einem RhD-positiven Kind kann dann der diaplazentare Übertritt von Anti-RhD-Antikörpern, welche typischerweise vom IgG-Typ sind, zu einer antikörpervermittelten Hämolyse fetaler Erythrozyten führen.

Analog zum HDFN gibt es aber auch Fälle, bei denen es nicht zur Zerstörung kindlicher Erythrozyten, sondern der Thrombozyten oder neutrophilen Granulozyten kommt. In diesen Fällen spricht man von einer fetalen bzw. neonatalen Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT) oder einer neonatalen Alloimmunneutropenie (NAN). Bei diesen Krankheitsbildern sind die zugrundeliegenden Antikörper nicht gegen Erythrozytenantigene, sondern gegen Antigene auf Thrombozyten bzw. auf neutrophilen Granulozyten gerichtet. Diese Arbeit soll sich mit den Ursachen der FNAIT beschäftigen.

1.2 Die fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie

1.2.1 Ätiologie und Pathogenese

Die Inzidenz der FNAIT wird auf etwa 20 bis 100 pro 100.000 Neugeborene geschätzt (Sternbach et al. 1986; Sidiropoulos und Straume 1984; Mueller-Eckhardt et al. 1989a). Damit ist die FNAIT die häufigste Ursache für Thrombozytopenien bei ansonsten gesunden Neugeborenen. Ein wesentlicher Unterschied im Vergleich zum HDFN ist, dass bei der FNAIT häufig bereits das erste Kind der Frau betroffen ist (Bussel et al. 2021).

Verantwortlich für das Auftreten der FNAIT sind mütterliche Antikörper, welche gegen väterliche Thrombozytenmerkmale, sogenannte Humane Plättchen-Antigene (HPA), auf den kindlichen Blutplättchen gerichtet sind. Diese Antigene stellen genetische Varianten der Glykoproteine IIb/IIIa, Ib/IX und Ia/IIa dar. Hierbei handelt es sich um Polymorphismen von Oberflächenrezeptoren auf Thrombozyten, denen eine wichtige Rolle bei der Thrombozytenaggregation zukommt, indem sie beispielsweise Fibrinogen

(IIb/IIIa) oder den Von-Willebrand-Faktor (Ib/IX) binden. Als erstes Thrombozytenblutgruppenmerkmal wurde das Humane Plättchen-Antigen HPA-1a im Jahr 1959 bei Frauen entdeckt, die nach Bluttransfusionen eine Thrombozytopenie entwickelt hatten (van Loghem et al. 1959). In 79 % der Fälle wird die FNAIT von Anti-HPA-1a-Alloantikörpern ausgelöst. Am zweithäufigsten findet sich Anti-HPA-5b (9 %), gefolgt von Anti-HPA-1b (4 %) und Anti-HPA-3a (2 %) (Davoren et al. 2004). Mittlerweile wird jedoch die Rolle von Anti-HPA-5b-Antikörpern bei der Entstehung der FNAIT kontrovers diskutiert (Alm et al. 2022).

Durch den Fc-Rezeptor-abhängigen diaplazentaren Übertritt von mütterlichen IgG-Antikörpern kommt es zu einer antikörpervermittelten Thrombozytopenie des Fetus (Chen et al. 2010). Obwohl der zugrundeliegende Pathomechanismus noch nicht vollständig geklärt ist, wird davon ausgegangen, dass die Zerstörung der Thrombozyten auf einer Aktivierung des retikulohistiozytären Systems und des Komplementsystems beruht (Bussel und Javed 2012). Die Folge ist eine fetale Thrombozytopenie mit konsekutiver Blutungsneigung aufgrund der gestörten primären Hämostase.

1.2.2 Klinisches Bild

Charakteristisch für die FNAIT sind verminderte Thrombozytenzahlen sowie Blutungen ohne andere erkennbare Ursache (Kroll und Bein 1999). In etwa 90 % der Fälle kommt es zu milden Symptomen wie Petechien, Purpura oder Hämatomen (Arnold et al. 2008; Kaplan 2006; Mueller-Eckhardt et al. 1985). Diese sind entweder schon bei der Geburt vorhanden oder treten bei persistierender Thrombozytopenie kurz nach der Geburt auf. Ein Ikterus tritt in etwa 30-40 % der Fälle auf, selten kommt es auch zu gastrointestinalen Blutungen (Bussel und Javed 2012; Kao et al. 1986).

Bei etwa 10 % aller FNAIT-Fälle kommt es zu intrakraniellen Blutungen (*intracranial hemorrhage*, ICH), die schwere neurologische Ausfälle und sogar den Tod des Fetus zur Folge haben können (Kaplan 2001; Spencer und Burrows 2001; Ghevaert et al. 2007; Muller et al. 1985; Skupski und Bussel 1999). Eine ICH kann sowohl während der Schwangerschaft, als auch unter oder nach der Geburt auftreten. Es wird vermutet, dass das Risiko für intrakranielle Blutungen erhöht ist, wenn die Thrombozytopenie bereits früh in der Schwangerschaft, also schon vor der 20. Schwangerschaftswoche (SSW),

auftritt (Bussel et al. 1990). Mehr als die Hälfte aller intrakraniellen Blutungen treten bis zur 28. SSW auf (Murphy et al. 1994; Tiller et al. 2013).

Abbildung 1 veranschaulicht die Wahrscheinlichkeiten der FNAIT aus einem Kollektiv von 10.000 weißen Frauen.

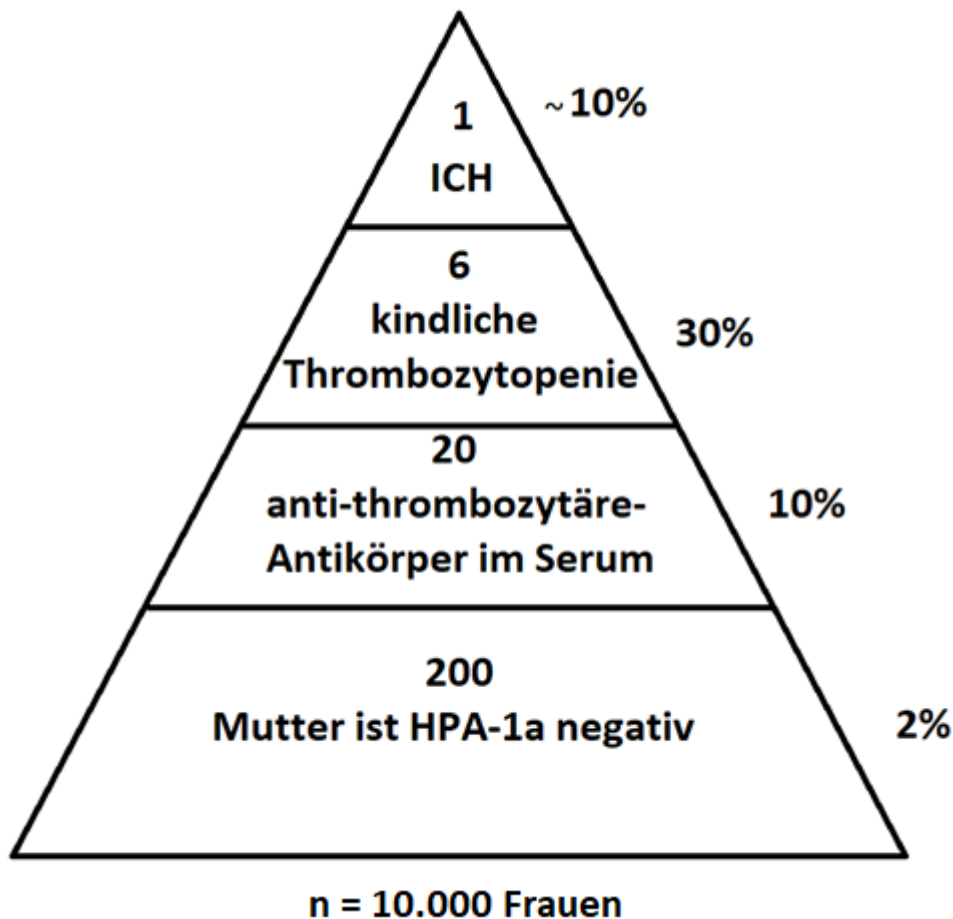


Abbildung 1: Pyramidenmodell der FNAIT, modifiziert nach Arnold et al. 2008. Etwa 2 % aller weißen Frauen sind HPA-1a-negativ. Dies ist die Voraussetzung für die Bildung von Anti-HPA-1a-Alloantikörpern in der Schwangerschaft, welche für ungefähr 79 % aller FNAIT-Fälle verantwortlich sind. Etwa 10 % dieser Frauen bilden dann während der Schwangerschaft tatsächlich Antikörper gegen HPA-1a-positive kindliche Thrombozyten, welche wiederum mit einer Wahrscheinlichkeit von 30 % eine FNAIT verursachen. Bei 10 % aller FNAIT-Patienten kommt es zu intrakraniellen Blutungen.

1.2.3 Pränatales Management

Beim Management der FNAIT unterscheidet man zwischen Prophylaxe und Therapie. Die pränatale Prophylaxe setzt ein rechtzeitiges Erkennen der Krankheit voraus. In der Regel findet in Deutschland bei schwangeren Frauen jedoch kein HPA-1a-Screening statt und eine intrauterine Diagnostik ist sehr risikobehaftet (Kamphuis et al. 2010). Daher wird eine FNAIT häufig nur bei denjenigen Kindern vor der Geburt erkannt, bei welchen die Mutter bereits ein Kind mit FNAIT zur Welt gebracht hat (Davoren et al. 2003; Kjeldsen-Kragh et al. 2007). Ist eine Frau zum ersten Mal schwanger, wird eine FNAIT daher nicht vor der Geburt diagnostiziert.

Eine pränatal häufig eingesetzte Behandlungsoption der FNAIT ist die intravenöse Gabe von Immunglobulinen (IVIg), gegebenenfalls in Kombination mit Kortikosteroiden (ACOG practice bulletin Thrombocytopenia in pregnancy 1999; Espinoza et al. 2013; Bussel et al. 1996; Kaplan et al. 1994). Besonders bei Frauen, die bereits ein Kind mit FNAIT zur Welt gebracht haben, kommen IVIg in der Folgeschwangerschaft zum Einsatz. Der Wirkmechanismus von IVIg ist sehr komplex, da die Immunglobuline auf mehreren Ebenen das Immunsystem beeinflussen. Er beinhaltet unter anderem eine Modulation der Expression und Funktion von Fc-Rezeptoren, eine Wechselwirkung mit Zytokinen und dem Komplementsystem, sowie Effekte auf die Aktivierung und Differenzierung von B- und T-Lymphozyten (Yu und Lennon 1999; Simister und Story 1997). Darüber hinaus wird durch die hohe Konzentration von IgG im mütterlichen Blut der über den neonatalen Fc-Rezeptor (FcRn) vermittelte diaplazentare Übertritt der antithrombozytären Antikörper kompetitiv gehemmt (Kazatchkine und Kaveri 2001; Vos et al. 2020; Omwandho et al. 2004). Die Prophylaxe mit Immunglobulinen beginnt abhängig vom Risiko und Schweregrad der FNAIT zwischen der 12. und der 20. SSW (Lieberman et al. 2019). Die Überprüfung des Therapieerfolgs durch Chordozentesen zur Messung der fetalen Thrombozyten wird allgemein nicht mehr empfohlen (Vos et al. 2020; Zdravic et al. 2016; Mueller-Eckhardt et al. 1989b; Murphy et al. 1994; Murphy et al. 1999). Sollte zusätzlich die Gabe von Kortikosteroiden erwogen werden, ist Prednison gegenüber Dexamethason vorzuziehen, da letzteres ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Oligohydramnions birgt (Bussel et al. 1996; Lynch et al. 1992). Eine weitere Möglichkeit zur antenatalen Therapie der FNAIT stellen intrauterine Transfusionen dar. Aufgrund des hohen Risikos für einen intrauterinen Fruchttod bei der

Chordozentese wird diese früher häufig angewandte Therapieoption heutzutage nicht mehr empfohlen (Paidas et al. 1995; Overton et al. 2002; Lieberman et al. 2019; Roberts et al. 2008). Abbildung 2 zeigt die Strategie zur antenatalen Behandlung der FNAIT.

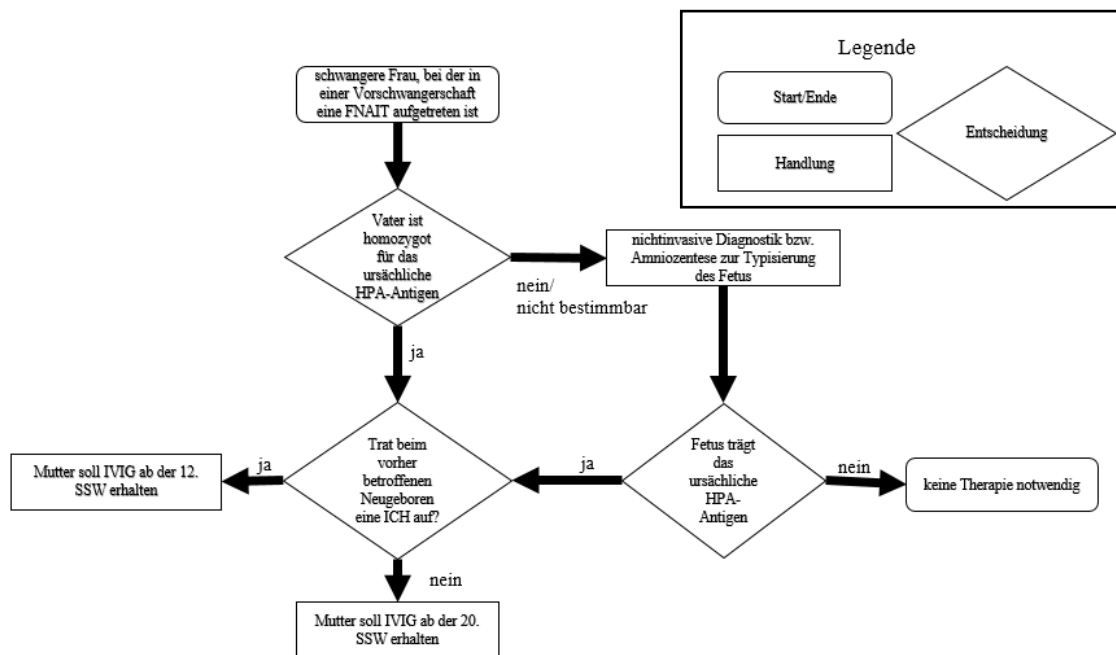


Abbildung 2: Entscheidungsbaum zur antenatalen Behandlung der FNAIT, modifiziert nach Lieberman et al. 2019.

1.2.4 Postpartale Therapie

Neben der Prophylaxe gibt es postpartale Therapieansätze, welche zum Einsatz kommen, wenn die FNAIT erst nach der Geburt diagnostiziert wurde oder wenn sie trotz pränataler Behandlung auch nach der Geburt persistiert.

Aufgrund der Seltenheit und der Heterogenität des Krankheitsbildes ist noch keine optimale Strategie zur Therapie der FNAIT bekannt (Vos et al. 2020). Eine internationale Leitlinie von Lieberman et al. aus dem Jahr 2019 empfiehlt bei postnatal auftretender FNAIT eine engmaschige Überwachung des Neugeborenen, sowie Thrombozytentransfusionen bei Plättchenzahlen unter 30 x G/L. Bei klinischem Verdacht auf eine lebensbedrohliche Blutung wird eine umgehende Transfusion auf 100 x G/L Thrombozyten empfohlen, sowie die Aufrechterhaltung von Plättchenzahlen von mindestens 50 x G/L für die nächsten sieben Tage.

Bei Thrombozytentransfusionen sind, falls verfügbar, antigenkompatible Thrombozytenkonzentrate (d.h. in der Regel HPA-1a-negative) gepoolten Thrombozytenkonzentraten vorzuziehen (Kiefel et al. 2006). Bei antigenkompatiblen Thrombozytenkonzentraten ist sowohl mit einem höheren Inkrement, als auch mit einer fast doppelt so hohen Halbwertszeit der transfundierten Plättchen zu rechnen (1,9 Tage versus 1,0 Tage) (Allen et al. 2007). Sind antigenkompatible Thrombozytenkonzentrate nicht sofort verfügbar, können jedoch auch gepoolte Plättchen zur Überbrückung transfundiert werden. Kiefel et al. vermuten, dass hierbei vor allem die Adsorption der Alloantikörper zu einer Verkürzung der neonatalen Thrombozytopenie führt (Kiefel et al. 2006). Alternativ kann die Gabe mütterlicher Thrombozyten erwogen werden (Ouweland et al. 2000).

Eine Verabreichung von IVIG sollte nur erwogen werden, falls überhaupt keine Thrombozytenkonzentrate verfügbar sind, da bei IVIG-Gabe frühestens nach 24-72 h mit einem Inkrement zu rechnen ist (Lieberman et al. 2019).

Bei schwangeren Frauen, bei denen in der Vergangenheit bereits ein Kind von einer FNAIT betroffen war, sollte zur Risikoabschätzung im Fall einer Folgeschwangerschaft eine Typisierung des Vaters zur Bestimmung der Zygotie für das ursächliche Allel durchgeführt werden (Wienzek-Lischka et al. 2020). Bei Heterozygotie ist eine nichtinvasive Typisierung des Fetus aus maternalem Blut (NIPD) oder alternativ eine Amniozentese des Fetus möglich. Ist der Fetus positiv für das ursächliche HPA-Antigen, sollten antenatal IVIG verabreicht werden. Ist in einer Vorschwangerschaft bereits ein Kind mit einer ICH auffällig geworden, sollte mit der IVIG-Gabe bereits zwischen der 12. und 16. SSW begonnen werden. Anderenfalls kann bis zur 20. SSW gewartet werden. Bei dieser Empfehlung handelt es sich jedoch lediglich um Expertenmeinungen und nicht um das Ergebnis klinischer Studien (Lieberman et al. 2019).

Abbildung 3 zeigt die Strategie zur postnatalen Behandlung der FNAIT.

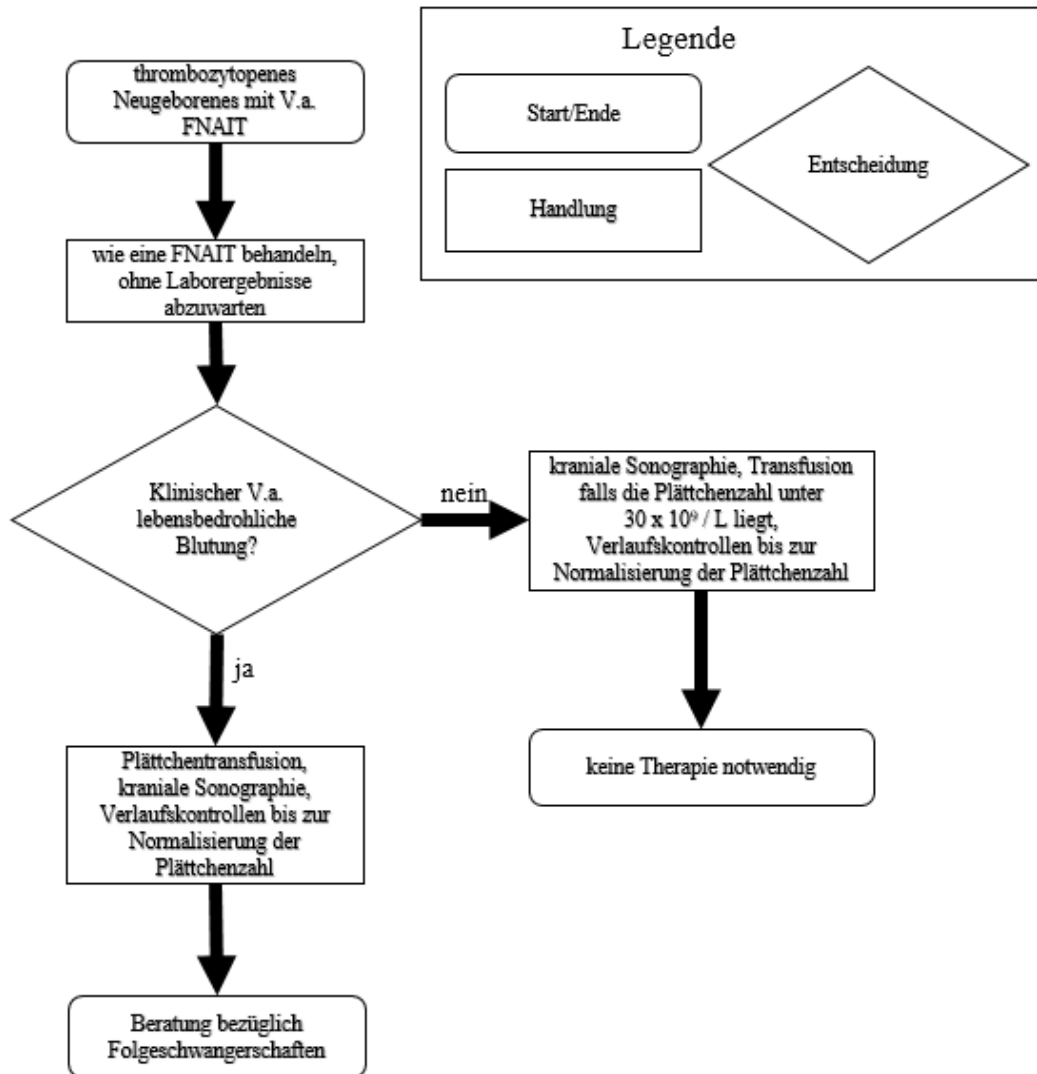


Abbildung 3: Entscheidungsbaum zur postnatalen Behandlung der FNAIT, modifiziert nach (Lieberman et al. 2019)

1.3 HLA-System

Das HLA-System beschreibt ein System von Proteinen, welches dem Immunsystem eine Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ ermöglicht, und damit eine wesentliche Rolle bei der Erkennung von fremden oder entarteten Zellen spielt. HLA ist die Abkürzung für „Humanes Leukozyten-Antigen“ und beschreibt die Haupthistokompatibilitätskomplexe des Menschen. Die ersten MHC-Moleküle wurden 1948 bei Mäusen entdeckt (Gorer et al. 1948). Heute weiß man, dass sie bei allen Kiefernäulern (*Gnathostomata*) vorkommen und damit entwicklungsgeschichtlich sehr tief verankert sind (Gorer et al. 1948; Flajnik und Kasahara 2001). Alle HLA-Moleküle werden auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 codiert. Es handelt sich um hochpolymorphe Genloci, von denen heute (Februar 2024) bereits 38.008 verschiedene Allele bekannt sind (EMBL-EBI 2024). HLA-Moleküle lassen sich in drei verschiedene Klassen einteilen.

HLA-Klasse-I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen sowie auf Thrombozyten exprimiert und präsentieren endogene Peptide. Diese Proteinbruchstücke entstehen bei der Prozessierung von intrazellulären Eiweißen im Proteasom. Die Peptide werden anschließend im endoplasmatischen Retikulum auf die HLA-Klasse-I-Moleküle aufgeladen und dann an der Zelloberfläche präsentiert, wo sie von CD8+-zytotoxischen T-Zellen erkannt werden (Janeway et al. 2008). Die Interaktion zwischen HLA-Klasse-I und dem T-Zell-Rezeptor der CD8+-T-Zelle spielt eine wichtige Rolle bei der Erkennung von virusinfizierten und entarteten Zellen, aber auch bei der Abstoßung von allogenen Transplantaten. Da die präsentierende Zelle sich über ihre HLA-Klasse-I-Moleküle gegenüber der zytotoxischen T-Zelle „ausweist“, kommt es beispielsweise bei der Präsentation von Viruspeptiden oder HLA-Inkompatibilität zur Induktion einer Immunantwort (Waßmuth 2005).

HLA-Klasse-II-Moleküle werden im Gegensatz zur Klasse-I nur auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen exprimiert und dienen der Präsentation exogener Peptide, die aus dem Extrazellulärraum stammen. Sie interagieren mit dem T-Zell-Rezeptor von CD4+-T-Zellen und spielen unter anderem eine zentrale Rolle bei der Abwehr von bakteriellen Krankheitserregern (Parham 2009). Die wichtigsten Klasse-II-Subtypen werden als HLA-DQ und HLA-DR bezeichnet. Daneben existieren noch HLA-DP, HLA-DM und HLA-DO.

Zu den HLA-Klasse-III-Molekülen zählen einige Komplementfaktoren und Zytokine, die an der unspezifischen Immunabwehr beteiligt sind. Es handelt sich hierbei um Proteine, die auf weitaus weniger polymorphen Genloci codiert werden. Da es sich im Gegensatz zu den anderen beiden Klassen ausschließlich um Plasmaproteine handelt, kommen HLA-Klasse-III Moleküle nicht auf der Zelloberfläche vor (Janeway et al. 2008).

HLA-Klasse-I-Moleküle sind die einzigen HLA-Moleküle, die auf Thrombozyten exprimiert werden (Santoso et al. 1986). Sie bestehen aus einer schweren Kette, der α -Kette, sowie dem β 2-Mikroglobulin. Die α -Kette lässt sich außerdem in drei Domänen unterteilen mit einem intrazellulären, einem transmembranösen und einem extrazellulären Bereich. Das β 2-Mikroglobulin besteht dagegen nur aus einer extrazellulären Domäne (Parham 2009). HLA-Klasse-I kann man darüber hinaus in drei Untergruppen unterteilen: HLA-A, HLA-B und HLA-C. Letzteres wird bei serologischer Typisierung auch als „HLA-Cw“ bezeichnet (Waßmuth 2005). Neben diesen drei „klassischen“ Gruppen mit hoher Polymorphie und Expressionsdichte auf der Zelloberfläche, gibt es noch die drei weniger bekannten Gene HLA-E, HLA-F und HLA-G. Diese sind weitaus konservierter als die ersten drei Gruppen und werden auch nur in geringem Maß auf Zellen exprimiert. Außerdem existieren einige nicht exprimierte Pseudogene (EMBL-EBI 2024).

1.4 HLA auf Thrombozyten

Neben Humanen Plättchen-Antigenen werden auf Thrombozyten auch HLA-A- und HLA-B-Moleküle in hoher Dichte exprimiert. Diese Antigene spielen eine wichtige Rolle bei Refraktärzuständen nach Thrombozytentransfusionen (Colombani et al. 1971; Mueller-Eckhardt 1988; Janson et al. 1986). Thrombozyten tragen auf ihrer Oberfläche zwischen 55.000 und 113.000 HLA-Klasse-I-Antigene und besitzen damit etwa 73 % aller im Blut zirkulierenden HLA-A- und HLA-B- Antigene (Kao et al. 1986). Dagegen kommen die HLA-C-Antigene in deutlich geringerer Konzentration auf Thrombozyten vor und unterliegen, ebenso wie HLA-A und HLA-B, großen interindividuellen Schwankungen (Duquesnoy et al. 1977; Mueller-Eckhardt et al. 1980). Datema et. al konnten zeigen, dass HLA-C-Moleküle nicht nur in geringer Dichte auf Plättchen exprimiert werden, sondern Anti-HLA-C-Antikörper darüber hinaus auch kaum dazu imstande sind, eine komplementvermittelte Lyse von Thrombozyten einzuleiten (Datema

et al. 2000). Daraus wird abgeleitet, dass HLA-C keine wichtige Rolle bei Refraktärzuständen nach Thrombozytentransfusionen spielt. Die Vermutung liegt also nahe, dass HLA-C auch bei Thrombozytopenien, die aufgrund fetomaternaler Inkompatibilitäten entstehen, vernachlässigt werden kann.

1.5 Zusammenhang zwischen FNAIT und Anti-HLA-Antikörpern

Ein gutes Drittel aller Frauen bildet während einer Schwangerschaft Anti-HLA-Antikörper, wobei die genauen Häufigkeiten von der Analysetechnik abhängig sind und zwischen 31 % und 54,1 % schwanken (King et al. 1996; Masson et al. 2013). Die große Spannbreite zwischen diesen Zahlen ergibt sich aus der unterschiedlichen Sensitivität der Testmethoden. Während der lymphozytotoxische Test als sehr robust gilt und mit 31 % zu einer eher konservativen Schätzung kommt, gilt die Durchflusszytometrie als sehr sensitiv und kann bei über der Hälfte aller Schwangeren Anti-HLA-Antikörper nachweisen (King et al. 1996; Regan et al. 1991; Masson et al. 2013; Morin-Papunen et al. 1984). Aufgrund der im Vergleich hierzu niedrigen Inzidenz der FNAIT von gerade einmal ca. 0,1 %, ging man lange davon aus, dass Anti-HLA-Antikörper keine Rolle bei der Entstehung der FNAIT spielen. Man weiß allerdings seit einiger Zeit, dass Anti-HLA-Antikörper sehr wohl dazu in der Lage sind Thrombozyten zu zerstören und transfusionsrefraktäre Thrombozytopenien zu verursachen (Cid et al. 2015). Obwohl in der überwiegenden Mehrheit der FNAIT-Fälle Anti-HPA-Antikörper im mütterlichen Serum nachweisbar sind, sind in der Literatur auch Fälle beschrieben, in denen diese Antikörper nicht als Auslöser einer FNAIT identifiziert werden konnten. Jedoch konnten bei diesen Fällen oftmals Anti-HLA-Antikörper im mütterlichen Serum nachgewiesen werden (Monchamont et al. 2004; Thude et al. 2006; Tar et al. 2002; Starcevic et al. 2010; Gramatges et al. 2009; Bonstein et al. 2015; Meler et al. 2017). Aktuell wird ein Zusammenhang zwischen Anti-HLA-Klasse-I-Antikörpern und FNAIT kontrovers diskutiert. Sachs et al. konnten zeigen, dass Anti-HLA-Klasse-I-Antikörper bei Kindern mit einer durch Anti-HPA-1a-Antikörper ausgelösten FNAIT keinen Einfluss auf die fetale Plättchenzahl, das Geburtsgewicht oder das Risiko für intrakranielle Blutungen haben (Sachs et al. 2020).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Mit dieser Arbeit sollen die Zusammenhänge zwischen dem Auftreten einer FNAIT und der fetomaternalen HLA-Inkompatibilität geklärt werden. Insbesondere sollen folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Sind bestimmte HLA-Klasse-I-Merkmale bei Kindern von Müttern mit Anti-HLA-Klasse-I-Antikörpern häufiger? Oder anders gefragt: Sind bestimmte HLA-Klasse-I-Merkmale in der Schwangerschaft besonders immunogen?
2. Gibt es bestimmte mütterliche HLA-Klasse-II-Antigene, die zu einer vermehrten Immunisierung gegen väterliche HLA-Klasse-I-Antigene führen?

2 Material und Methoden

2.1 Patientenmaterial

Zur Beantwortung der Fragestellungen wurden Serumreste und EDTA-Blut klinischer Blutproben von Müttern und deren thrombozytopenen Neugeborenen untersucht. Entsprechende Proben wurden von 2002 bis 2016 am Universitätsklinikum Gießen und Marburg (UKGM), Standort Gießen, gesammelt und im Rahmen der klinischen Diagnostik bereits auf Anti-HPA- und Anti-HLA-Antikörper im mütterlichen Serum untersucht. Das Probenmaterial wurde danach bei -30 °C gelagert. Die Identifizierung der Mutter-Kind-Paare erfolgte über das Laborinformationssystem (LIS).

Für die Untersuchungsgruppe wurde gezielt nach Müttern gesucht, die Kinder mit weniger als 100.000 Thrombozyten/ μ l Blut geboren haben und bei denen der MAIPA-Assay (**monoklonale antikörperspezifische Immobilisierung von Plättchenantigenen**) keinen Nachweis für Anti-HPA-Antikörper erbracht hatte. Das Kriterium für die Zuordnung zur Verum- oder Kontrollgruppe war der Nachweis von Anti-HLA-Antikörpern in der Kreuzprobe von maternalem Serum gegen paternale Thrombozyten. Zur Immobilisierung wurde der monoklonale Antikörper W6/32 verwendet, der HLA-Moleküle unabhängig vom Genotyp über das β 2-Mikroglobulin bindet.

Zusammenfassung der Einschlusskriterien:

- Patienten, die zwischen 2002 und 2016 am UKGM behandelt wurden
- thrombozytopenes Neugeborenes mit <100.000 Thrombozyten/ μ l
- kein Nachweis von Anti-HPA-Antikörpern im MAIPA

Durch den Ausschluss von Anti-HPA-Antikörpern konnte sichergestellt werden, dass die Thrombozytopenie nicht durch Antikörper gegen Plättchenantigene aus dem HPA-System ausgelöst wurde. Bei positivem Nachweis von Anti-HLA-Antikörpern im Crossmatch wurden die Mutter-Kind-Paare der Verumgruppe zugeordnet, bei negativem Testergebnis der Kontrollgruppe. Über das LIS konnten 95 Mutter-Kind-Paare für die Verumgruppe und 73 Mutter-Kind-Paare für die Kontrollgruppe identifiziert werden.

Um auszuschließen, dass andere Störfaktoren die Neugeborenthrombozytopenie ausgelöst haben, wurden die Krankenakten, Arztbriefe und Untersuchungsbefunde der Patienten eingehend studiert. Patienten, bei denen eines der in Tabelle 1 aufgeführten Kriterien zutraf, wurden aus der Untersuchungsgruppe ausgeschlossen.

Ausschlussgrund	Ausgeschlossene Mutter-Kind-Paare der Verumgruppe	Ausgeschlossene Mutter-Kind-Paare der Kontrollgruppe
Infektion (z.B. Amnioninfektionssyndrom, Neugeboreneninfektion, Sepsis)	14	11
Plazentainsuffizienz	4	1
Bekannte Thrombozytopenie in der Familie (z.B. Immunthrombozytopenie, benigne mediterrane Thrombozytopenie)	3	5
Genetische Ursachen (z.B. Trisomie 21, May-Hegglin-Anomalie, Bernard-Soulier-Syndrom)	7	9
Anderweitige Komplikationen in der Schwangerschaft (Gestationsdiabetes, HELLP-Syndrom, mütterlicher Lupus erythematodes)	6	4
Sehr unvollständige Patientenakten	3	3
Thrombose des Neugeborenen	1	0
Nach zwei Monaten persistierende Thrombozytopenie	0	2
Σ	38	35

Tabelle 1: Ausschlusskriterien

Die oben aufgeführten Diagnosen können theoretisch direkt oder indirekt eine Thrombozytopenie verursachen, weshalb die betroffenen Kinder ausgeschlossen wurden. Bei insgesamt sechs Mutter-Kind-Paaren waren die Patientenakten so unvollständig, dass andere Gründe für eine Thrombozytopenie nicht sicher ausgeschlossen werden konnten. Auch diese Patienten wurden vorsichtshalber nicht in die Studie aufgenommen.

Von ursprünglich 95 identifizierten Mutter-Kind-Paaren der Verumgruppe wurden 38 Patientenpaare aufgrund der oben genannten Kriterien ausgeschlossen. Somit belief sich die Größe der Verumgruppe auf 57 Mütter und Kinder. Bei der Kontrollgruppe wurden von den 73 identifizierten Mutter-Kind-Paaren 35 Paare ausgeschlossen, sodass die Kontrollgruppe aus 38 Mutter-Kind-Paaren bestand.

Die Patienten wurden vor der Zuordnung zu den beiden Kohorten vollständig anonymisiert. Lediglich der Bezug Mutter-Kind blieb bestehen. Ein positives Ethikvotum der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität Gießen liegt vor (AZ 82/09).

2.2 Reagenzien, Materialien und Geräte

Reagenzien und Materialien

Aqua dest.	Fa. Braun, Melsungen
Dithiothreitol	Fa. Sigma-Aldrich, Buchs (Schweiz)
Eppendorfgefäß 1,8 ml	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe
Ficoll Paque Plus™	Fa. Pharmacia, Uppsala (Schweden)
FluoroQuench™ Acridine Orange/ Ethidium Bromide	Fa. BMT One Lambda, Meerbusch
Kaninchenkomplement (lyophilisiert)	Fa. BAG Health Care, Lich
LABType® SSO A Locus Typing Test Bestandteile: SSO Bead Mix 400 µl Primer Set 400 µl Primer Set D-Mix 2 x 690 µl Hybridization Buffer 3,4 ml Denaturation Solution 2,25 ml Wash Buffer 55 ml SAPE Buffer 4,95 ml Neutralization Buffer 2,5 ml	Fa. BMT One Lambda, Meerbusch

<p>LABType® SSO B Locus Typing Test</p> <p>Bestandteile: SSO Bead Mix 400 µl Primer Set 400 µl Primer Set D-Mix 2 x 690 µl Hybridization Buffer 3,4 ml Denaturation Solution 2,25 ml Wash Buffer 55 ml SAPE Buffer 4,95 ml Neutralization Buffer 2,5 ml</p>	<p>Fa. BMT One Lambda, Meerbusch</p>
<p>LABType® SSO DQ Locus Typing Test</p> <p>Bestandteile: SSO Bead Mix 400 µl Primer Set 400 µl Primer Set D-Mix 2 x 690 µl Hybridization Buffer 3,4 ml Denaturation Solution 2,25 ml (NaOH-Lösung) Wash Buffer 55 ml SAPE Buffer 4,95 ml Neutralization Buffer 2,5 ml</p>	<p>Fa. BMT One Lambda, Meerbusch</p>
<p>LABType® SSO DR Locus Typing Test</p> <p>Bestandteile: SSO Bead Mix 400 µl Primer Set 400 µl Primer Set D-Mix 2 x 690 µl Hybridization Buffer 3,4 ml Denaturation Solution 2,25 ml Wash Buffer 55 ml SAPE Buffer 4,95 ml Neutralization Buffer 2,5 ml</p>	<p>Fa. BMT One Lambda, Meerbusch</p>

Gentra® Puregene® Blood Kit	Fa. Qiagen, Hilden
Isopropanol p.A.	Fa. Riedel de Haen, Seelze
Ethanol 100 % p.A.	Fa. Riedel de Haen, Seelze
L-Cystin	Fa. Sigma-Aldrich, Buchs (Schweiz)
LX200™ Calibration Kit	Fa. Dia Mex, Heidelberg
LX200™ Performance Verification Kit	Fa. Dia Mex, Heidelberg
Parafilm	American Can Company, New York (USA)
PBS	Fa. Thermo Fisher, München
PE-konjugiertes Streptavidin	Fa. BMT One Lambda, Meerbusch
Polyröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	Fa. Thermo Fisher, München
Sheath Fluid	Fa. Dia Mex, Heidelberg
TAQ 50	Fa. BMT One Lambda, Meerbusch
Terasaki Testplatte	Fa. Greiner Bio-One, Frickenhausen

Tabelle 2: verwendete Reagenzien und Materialien

Verwendete Geräte

96-Well-PCR-Platte	Fa. Thermo Fisher, München
COSTAR™-96-Well-Platte	Fa. VWR International, Darmstadt
Diavert Fluoreszenzmikroskop	Fa. Leica Microsystems, Wetzlar
Luminex® 200™ (TL-146)	Fa. BMT One Lambda, Meerbusch
Mastercycler® pro S (TL-137/1 - 4)	Fa. Eppendorf, Hamburg
NanoDrop® Spectrophotometer	Fa. ThermoFisher Scientific
Pipetten und Pipettenspitzen	Fa. Eppendorf, Hamburg
Automatic Seradot	Fa. Biotest, Dreieich
Zentrifuge Rotanta 460	Fa. Hettich, Mühlheim an der Ruhr
Zentrifuge Rotina 380	Fa. Hettich, Mühlheim an der Ruhr

Tabelle 3: verwendete Geräte

2.3 HLA-Genotypisierung

Mütterliche Proben wurden für HLA-A, HLA-B, HLA-DR, HLA-DQA und HLA-DQB typisiert. Kindliche Proben wurden für HLA-A und HLA-B typisiert. Die Typisierung wurde mittels reverser SSO-Methode (reverse sequenzspezifische Oligonukleotid-Methode) durchgeführt.

Diese Untersuchung beruht auf einer Amplifizierung der DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und anschließender Hybridisierung an SSO für HLA-Allele. Da bei der reversen SSO-Methode die Oligonukleotide an farbcodierte Beads gebunden sind, kann die Detektion der jeweiligen PCR-Produkte photospektrometrisch erfolgen. Eine anschließende Auswertung und die Zuordnung der detektierten Gensequenzen zu den entsprechenden HLA-Allelen erfolgte mithilfe der FusionTM-Software der Firma BMT/One Lambda.

2.3.1 Polymerase-Kettenreaktion

2.3.1.1 Theoretische Grundlagen

Bevor die Typisierung der Proben erfolgen konnte, musste die DNA zunächst mittels Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt werden. Diese besteht aus drei Schritten.

Im ersten, als Denaturierung bezeichneten Schritt, werden die DNA-Doppelstränge bei hohen Temperaturen (hier bei 96 °C) in zwei Einzelstränge aufgebrochen. Dieser Schritt ist notwendig, damit die Primer anschließend an die DNA-Abschnitte binden können.

Der zweite Schritt der PCR wird Hybridisierung oder auch *Annealing* (engl. für „Anlagerung“) genannt. Dabei kommt es bei Temperaturen von 60 °C zur Bindung der HLA-Locus-spezifischen Primer an komplementäre DNA-Sequenzen. Bei diesem Schritt ist es wichtig, dass die Primer im Überschuss vorhanden sind, damit die DNA-Gegenstränge kompetitiv verdrängt werden können. Außerdem darf die Temperatur nicht zu hoch sein, damit die Primer tatsächlich an die DNA-Einzelstränge binden können und nicht sofort denaturieren.

Der letzte Schritt wird als Elongation oder Extension bezeichnet. Hierbei spielt die DNA-Polymerase eine Schlüsselrolle. Dieses Enzym beginnt am 3'-Ende des angelagerten Primers die Synthese des neuen DNA-Strangs mit freien Nukleotiden in 5'→3'-Richtung. Für den Einsatz zur PCR hat sich die Verwendung der Taq-Polymerase etabliert. Diese Polymerase kommt natürlicherweise in Bakterien der Art *Thermus aquaticus* vor und zeichnet sich durch ihre besondere Hitzebeständigkeit aus. Aufgrund dieser Eigenschaft ist sie für den Einsatz zur PCR besonders geeignet. Das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase liegt zwischen 70 und 80 °C, weshalb die Elongation bei 72 °C durchgeführt wird.

Nun kann der nächste Zyklus von vorne beginnen. Theoretisch wird die Konzentration der DNA mit jedem Zyklus verdoppelt. Solange also genug Substrat vorhanden ist, erhöht sich die DNA-Konzentration nach 10 PCR-Zyklen um etwa den Faktor 10^3 . Diese Amplifikation ist eine wichtige Grundlage für die nachfolgende photospektrometrische Bestimmung HLA-spezifischer Gensequenzen.

2.3.1.2 Praktische Durchführung

Zunächst wurde die DNA aus dem EDTA-Blut mithilfe des Puregene®-Isolation-Kits isoliert. Dazu wurde das Vollblut zuerst mit einem Lysepuffer für Erythrozyten und im Anschluss mit einem Lysepuffer für Leukozyten sowie mit einer Proteinfällungslösung gemischt. Danach folgten zwei Waschschriffe, nach denen man die reine DNA erhielt.

Anschließend wurde die Konzentration der isolierten DNA aus dem EDTA-Blut der Mütter und Kinder mithilfe des NanoDrop® ND-1000 Spektralphotometers bestimmt. Dazu wurden die aufgetauten Proben gevortext und anschließend jeweils 2 µl DNA-Lösung auf den Probenarm pipettiert. Die DNA wurde mit destilliertem Wasser auf eine Konzentration von ungefähr 20 ng/µl verdünnt und zur weiteren Lagerung bei -30 °C eingefroren.

Im nächsten Schritt wurde die DNA mittels PCR amplifiziert. Dafür musste die gefrorene DNA zunächst im Heizblock bei 66 °C für 5 min aufgetaut und anschließend gevortext werden. Auf eine beschriftete 96-Well-PCR-Platte wurden dann in die jeweiligen Vertiefungen 2 µl verdünnte DNA pipettiert.

Die HLA-Locus-spezifischen biotinylierten Primer und das D-Mix-Reagenz wurden ebenfalls aufgetaut und gründlich gevortext. Beim D-Mix-Reagenz handelt es sich um eine nucleotidhaltige Pufferlösung.

Anschließend wurden für den PCR-Ansatz Primer-Set und D-Mix-Reagenz mit der Taq-Polymerase vermischt. Für einen Ansatz mit 2 µl DNA wurden 4 µl Primer-Lösung, 13,8 µl D-Mix-Reagenz und 0,2 µl Taq-Lösung benötigt. Die Primer-D-Mix-Taq-Mischung wurde gevortext und dann wurden 18 µl des PCR-Ansatzes in jede Vertiefung pipettiert, sodass sich ein Gesamtvolumen von 20 µl pro Well ergab. Die Taq-Polymerase wurde erst ganz zum Schluss dem PCR-Ansatz hinzugefügt, um eine Reaktion der Lösung mit sich selbst und der Bildung von Primerdimeren vorzubeugen. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die verwendeten Reagenzien und Volumina für die PCR.

13,8 µl	D-Mix-Reagenz
4 µl	Primer-Set für die spezifische HLA-Region
0,2 µl	Taq-Polymerase
2 µl	genomische DNA (ca. 20 ng/µl)

Tabelle 4: PCR-Ansatz zur HLA-Typisierung, ein Ansatz entspricht einem Gesamtvolumen von 20 µl.

Anschließend wurde die 96-Well-Platte mit einer thermostabilen Folie luftdicht verschlossen und in den Thermocycler gestellt. Das PCR-Programm ist in Tabelle 5 abgebildet.

	Temperatur	Inkubationszeit	Anzahl der Zyklen	
1. Schritt	96 °C	3 min	1	initiale Denaturierung
2. Schritt	96 °C	20 s	5	Denaturierung
	60 °C	20 s		Primerhybridisierung
	72 °C	20 s		Elongation
3. Schritt	96 °C	10 s	30	Denaturierung
	60 °C	15 s		Primerhybridisierung
	72 °C	20 s		Elongation
4. Schritt	72 °C	10 min	1	abschließende Elongation
5. Schritt	4 °C	Bis zur Weiterverarbeitung	1	Lagerung bis zur Weiterverarbeitung

Tabelle 5: PCR-Programm

Auf eine anschließende Überprüfung der Amplifikation mittels Gelelektrophorese wurde aus Praktikabilitätsgründen verzichtet. Fehler bei der PCR, die zu einer erfolglosen Amplifikation geführt hätten, wären spätestens bei der Auswertung mit dem Luminex® 200™ aufgefallen.

2.3.2 Reverse SSO

Bei der reversen SSO-Methode können mit einem Ansatz mehrere Analyten gleichzeitig untersucht werden. Da für jeden HLA-Locus viele verschiedene Genotypen bekannt sind, eignet sich die reverse SSO-Methode besonders gut zur HLA-Typisierung.

Sowohl in der Untersuchungs- als auch in der Kontrollgruppe wurden alle untersuchten Mütter und Kinder auf die HLA-Klasse-I-Antigene HLA-A und HLA-B untersucht. Bei den Müttern beider Gruppen wurden zusätzlich die Allele für die HLA-Klasse-II-Antigene HLA-DR, HLA-DQA und HLA-DQB bestimmt.

2.3.2.1 Theoretische Grundlagen

Das Prinzip der reversen SSO-Methode beruht darauf, die amplifizierten DNA-Abschnitte an sequenzspezifische Oligonukleotide (SSO) zu binden. Die SSO selbst sind an farbkodierte Mikrosphären (Beads) gebunden. Diese Mikrosphären sind kleine Polystyrol-Kügelchen mit spezifischer Färbung. Die Färbung geschieht sowohl mit roten als auch infraroten Fluoreszenzfarbstoffen. Die Kombination der beiden Farbstoffe in jeweils zehn unterschiedlichen Farbkonzentrationen führt zu 100 unterscheidbaren Farbschattierungen für rot und infrarot. Jede Mikrosphärenpopulation hat ein anderes, HLA-spezifisches Oligonukleotid gebunden und kann anhand ihrer Fluoreszenzkodierung exakt zugeordnet werden. Von einer reversen SSO-Methode spricht man, da die Oligonukleotidsonden selbst bereits an die Mikrosphären gebunden sind. Bei der „normalen“ SSO-Methode wird dagegen das PCR-Produkt auf einer Trägermembran (z.B. Nylon) fixiert und anschließend mit freien Oligonukleotiden hybridisiert.

Der spezifische Nachweis der Bindung der amplifizierten HLA-Allele an die komplementären Oligonukleotide erfolgt über ein Detektionsmolekül. Da das zu analysierende PCR-Produkt an den Primern biotinyliert ist, ist eine Kopplung an grün fluoreszierendes SAPE (mit Streptavidin konjugiertes R-Phycoerythrin) zum Nachweis des Analyten möglich.

Mithilfe von Lasern und Photodioden können die Mikrosphären anschließend im Luminex® 200™ identifiziert werden. Diejenigen Mikrosphären, welche über die

sequenzspezifischen Oligonukleotide an die amplifizierte DNA gebunden sind, fluoreszieren nicht nur im roten und infraroten, sondern auch im grünen Bereich. Dies ermöglicht eine eindeutige Typisierung der einzelnen HLA-Allele.

2.3.2.2 Praktische Durchführung

Nach Abschluss der PCR wurden jeweils 5 µl des Amplikons auf eine neue, beschriftete 96-Well-Platte pipettiert. Da das Prinzip der SSO-Methode auf einer Bindung der amplifizierten DNA an sequenzspezifische Oligonukleotide beruht, musste die DNA zunächst denaturiert werden, um anschließend mit den HLA-Locus-spezifischen Oligonukleotiden hybridisieren zu können. Dazu wurden in jede Vertiefung 2,5 µl Denaturierungspuffer pipettiert. Die Platte wurde dann mit einer Schutzfolie versiegelt und gründlich gevortext, um anschließend 10 min bei Raumtemperatur zu inkubieren.

Im nächsten Arbeitsschritt wurde die Denaturierungsreaktion unterbrochen, indem in jede Kavität 5 µl Neutralisierungspuffer pipettiert wurden. Eine erfolgreiche Neutralisation wurde durch einen Farbumschlag von violett zu blassgelb angezeigt. Blieb dieser Farbumschlag aus, wurde so lange Neutralisationspuffer in 1 µl-Schritten in die Vertiefungen titriert, bis sich die Farbänderung einstellte (insgesamt max. 8 µl pro Ansatz). Um eine erneute Hybridisierung der DNA-Einzelstränge zu vermeiden, wurde die Platte anschließend auf Eis gestellt.

Nun wurde die Hybridisierungslösung angesetzt. Dafür wurden für jeden Ansatz 34 µl Hybridisierungspuffer mit 4 µl der entsprechenden Mikrosphärenmischung (Bead-Mix) vermischt. Vorher musste der Bead-Mix jedoch für mehrere Minuten gründlich gevortext werden. 38 µl der Hybridisierungslösung wurden in jede Kavität pipettiert. Anschließend wurde die Platte mit einer hitzestabilen Klebefolie luftdicht verschlossen und für 15 min bei 60 °C in den vorgeheizten Thermocycler gestellt. Während dieser Inkubationszeit kam es zur Hybridisierung der mikrosphärengelassenen Oligonukleotide mit den amplifizierten DNA-Einzelsträngen.

Beim anschließenden Waschvorgang wurden 100 µl Waschpuffer zu jedem Ansatz pipettiert. Danach wurde die Platte bei 800 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Platte gevortext. Der Waschvorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Ziel dieses Schritts war es, die nicht-hybridisierten PCR-Produkte zu

entfernen und dadurch unspezifische Hintergrundsignale bei der nachfolgenden Messung zu minimieren.

Während des letzten Waschvorgangs wurde die SAPE-Lösung vorbereitet. Dazu wurden für jeden Ansatz 49,5 µl SAPE-Puffer mit 0,5 µl SAPE vermischt. Von dieser Lösung wurden dann 50 µl in jede Kavität der 96-Well-Platte pipettiert. Die Platte wurde erneut für 5 min bei 60 °C im Thermocycler inkubiert.

Nach einem weiteren, abschließenden Waschschrift wurde der Ansatz in 75 µl Waschpuffer resuspendiert und anschließend vorsichtig auf eine neue 96-Well-Platte (COSTAR™) übertragen. Die Platte konnte nun bis zur Messung lichtgeschützt im Kühlschrank gelagert werden (max. 7 Tage).

2.3.2.3 Probenmessung

Die Messung der Proben erfolgte mithilfe des Luminex® 200™. Es wurde darauf geachtet, dass die 96-Well-Platte vor der Messung gut gevortext wurde. Während der Messung wurden die Fluoreszenzsignale der Mikrosphären quantitativ gemessen. Die Mikrosphären selbst fluoreszierten im roten und infraroten Spektralbereich. Eine erfolgreiche Hybridisierung der SSO mit der amplifizierten DNA hatte über die Bindung an Biotin und Streptavidin eine Kopplung mit grün fluoreszierendem R-Phycoerythrin zur Folge (s. Abbildung 4). Somit konnten die Identifikation der Mikrosphären und die Quantifizierung des Analyten parallel durchgeführt werden.

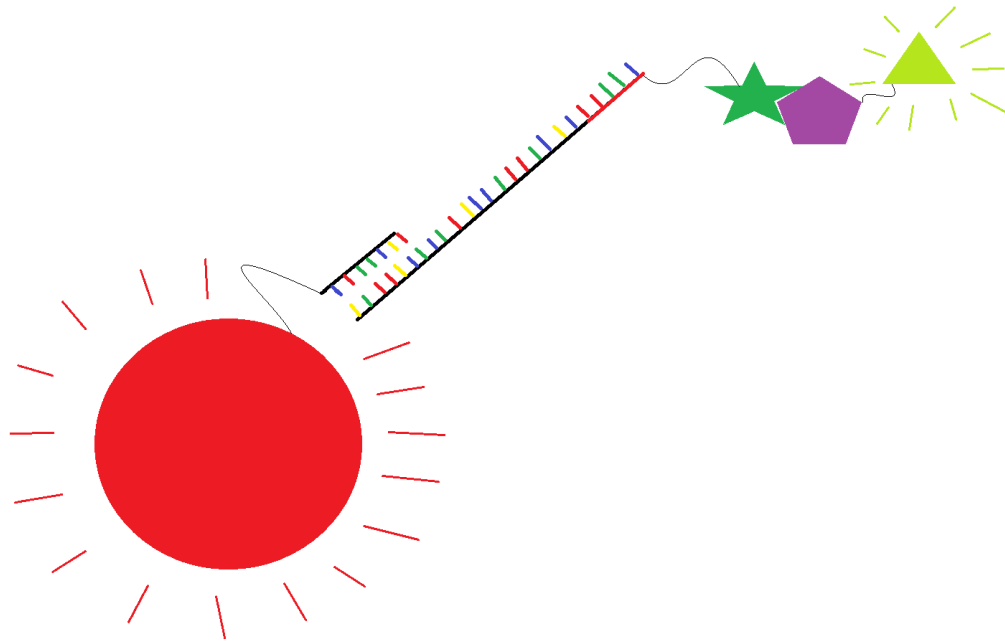


Abbildung 4: Schematische Darstellung einer hybridisierten Mikrosphäre, selbst erstellt: An die rot gefärbte Mikrosphäre ist ein HLA-spezifisches Oligonukleotid gebunden. Der komplementäre DNA-Strang hybridisiert mit dem Oligonukleotid. Der DNA-Strang ist biotinyliert (grüner Stern). Das Biotin hat eine starke Affinität zu Streptavidin (lilafarbenes Fünfeck) und ist selbst an R-Phycoerythrin (hellgrünes Dreieck) gekoppelt.

2.3.2.4 Auswertung

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mithilfe der FusionTM-Software der Firma BMT/One-Lambda. Die Software ermittelte anhand der gemessenen Fluoreszenzsignale die nachgewiesenen DNA-Sequenzen und verglich diese mit einer Datenbank. Somit war eine Zuordnung der Messergebnisse zu den korrespondierenden HLA-Allelen möglich. In manchen Fällen musste eine Anpassung der Toleranzgrenze (Cut-off) erfolgen. Die Auswertung erfolgte nach dem Vier-Augen-Prinzip mit freundlicher Unterstützung einer erfahrenen Mitarbeiterin des HLA-Labors.

2.4 Lymphozytotoxischer Test

Zur Bestimmung maternalen HLA-Antikörper kam der Lymphozytotoxische Test (LCT) zum Einsatz. Dieser Test hat im Gegensatz zu anderen Nachweismethoden von HLA-Antikörpern den Vorteil, dass er als sehr robust gilt. Während andere kommerzielle Verfahren wie beispielsweise der Festplatten-Immunoassay (ELISA) Anti-HLA-Antikörper direkt nachweisen und deshalb sehr sensitiv, aber auch fehleranfällig sind, werden im LCT die entsprechenden Antikörper nur indirekt über eine Schädigung der eingesetzten Lymphozyten nachgewiesen. Aus dieser Schädigung lässt sich in der Regel aber auch eine klinische Relevanz der detektierten Antikörper ableiten, die bei anderen Tests häufig fraglich ist. Es reagieren nämlich nur die Testseren positiv, die einen Antikörper enthalten, der tatsächlich in der Lage ist das Komplementsystem zu aktivieren.

Es wurden nur die mütterlichen Seren aus der Untersuchungsgruppe mittels LCT differenziert, bei denen der Antikörpernachweis schon aus dem Crossmatch bekannt war. Die Kontrollgruppe bestand nur aus Mutter-Kind-Paaren, bei denen die im Vorfeld durchgeführte Kreuzprobe von maternalem Serum gegen paternale Plättchen negativ war. Daher konnte das Vorliegen von anti-paternalen Anti-HLA-Antikörpern in den mütterlichen Seren dieser Gruppe bereits ausgeschlossen werden.

2.4.1 Theoretische Grundlagen

Der LCT ist ein Verfahren zum Nachweis komplementabhängiger Anti-HLA-Antikörper. Hierbei werden Spenderlymphozyten mit bekannten HLA-Klasse-I-Merkmalen mit den zu testenden Seren inkubiert. Die Auswahl der Spender erfolgt so, dass möglichst alle HL-Antigene repräsentiert sind. Bei Vorhandensein der entsprechenden Antikörper in den Testseren kommt es zur Ausbildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes an der Lymphozytenmembran. Dieser Komplex führt dann zu einer komplementvermittelten Zytolyse. Durch die Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffgemischs aus Ethidiumbromid (rote Anfärbung der lysierten Zellen) und Acridinorange (grüne Anfärbung der vitalen Zellen) kann das Testergebnis unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Die Beurteilung der Reaktionsstärke erfolgt anschließend durch Ermittlung des ASHI-Scores, welcher auf den Standards der *American Society for Histocompatibility*

and *Immunogenetics* basiert. Dafür wird der Prozentsatz der avitalen Zellen unter dem Mikroskop bestimmt. Während ein Score von 6 oder 8 als positive Reaktion gewertet wird, gilt ein Wert von 1 oder 2 als negativ.

Da theoretisch nicht nur HLA-spezifische IgG-Antikörper, sondern auch unspezifische IgM-Antikörper zu einer komplementvermittelten Lyse der untersuchten Lymphozyten führen können, kann es erforderlich sein bei Seren mit fraglichen IgM-Antikörpern eine zweite Testung mit Dithiotretiol (DTT) durchzuführen. DTT zerstört die Disulfidbrücken der IgM-Pentamere, wodurch bei einem DTT-Ansatz praktisch nur IgG-Antikörper nachgewiesen werden.

2.4.2 Praktische Durchführung

Die Spenderlymphozyten mit bekannten HLA-Oberflächenantigenen wurden zunächst mittels Ficoll-Gradienten aus Heparin-Blut isoliert. Diesem Verfahren liegt das Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation zugrunde, bei dem sich die einzelnen Blutkomponenten abhängig von ihrem spezifischen Gewicht in unterschiedliche Phasen auftrennen. Dazu wurden in einem Polypropylenröhrchen 5 ml Ficoll (Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer) mit 5 ml Blut vorsichtig überschichtet. Das Röhrchen wurde anschließend für 10 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Die nun als weißer Ring sichtbare Lymphozytenschicht (sog. „*buffy coat*“) wurde dann mit einer Pasteurpipette aufgenommen und in ein zweites Polypropylenröhrchen überführt. Es wurde darauf geachtet möglichst wenig Ficoll aufzunehmen. Um die Thrombozyten zu entfernen, wurde die Probe im nächsten Schritt mit einem Zellkulturmedium (RPMI) versetzt und für 10 min bei 800 rpm zentrifugiert. Der thrombozytenhaltige Überstand wurde verworfen. Es folgte ein erneuter Waschschriff, bei dem die Lymphozyten mit RPMI aufgefüllt wurden und anschließend für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert wurden. Wieder wurde der Überstand abgekippt und der Bodensatz gevortext. Nun konnten die isolierten Lymphozyten mit RPMI auf eine Zellzahl von ungefähr 4000 / μ l verdünnt und für den Einsatz beim LCT aufbewahrt werden.

Im nächsten Schritt wurden 60 Terasakiplatten mit 5 μ l Paraffinöl pro Kavität versetzt. Mithilfe des Automatic-Seradot-Geräts wurde dann entsprechend eines vorher

festgelegten Pipettierschemas 1 µl Testserum in jede Kavität der Platten gegeben. Anschließend wurde in jede Vertiefung auf der Platte 1 µl Lymphozytensuspension getropft. Danach inkubierten die Platten für 30 min bei Raumtemperatur.

Währenddessen wurde die Komplementlösung vorbereitet, indem lyophilisiertes Kaninchenkomplement in Wasser gelöst wurde. Anschließend wurden 6 µl Komplementlösung in jede Kavität pipettiert und die Platten erneut für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden zu jedem Ansatz 6 µl FluoroQuench hinzugefügt und die Platten wurden abschließend für 5 min in den Kühlschrank gestellt, da das im FluoroQuench enthaltene Acridinorange licht- und wärmeempfindlich ist.

2.4.3 Auswertung

Die anschließende Auswertung erfolgte am Diavert-Fluoreszenzmikroskop. Vitale Zellen leuchteten durch die Färbung mit Acridinorange grün, während die durch Komplementaktivierung geschädigten Zellen durchlässig für Ethidiumbromid wurden und daher rot fluoreszierten (s. Abbildung 5). Tabelle 6 gibt den Zusammenhang zwischen dem Prozentsatz der geschädigten Zellen und dem ASHI-Score, sowie die Interpretation der Befunde wieder.

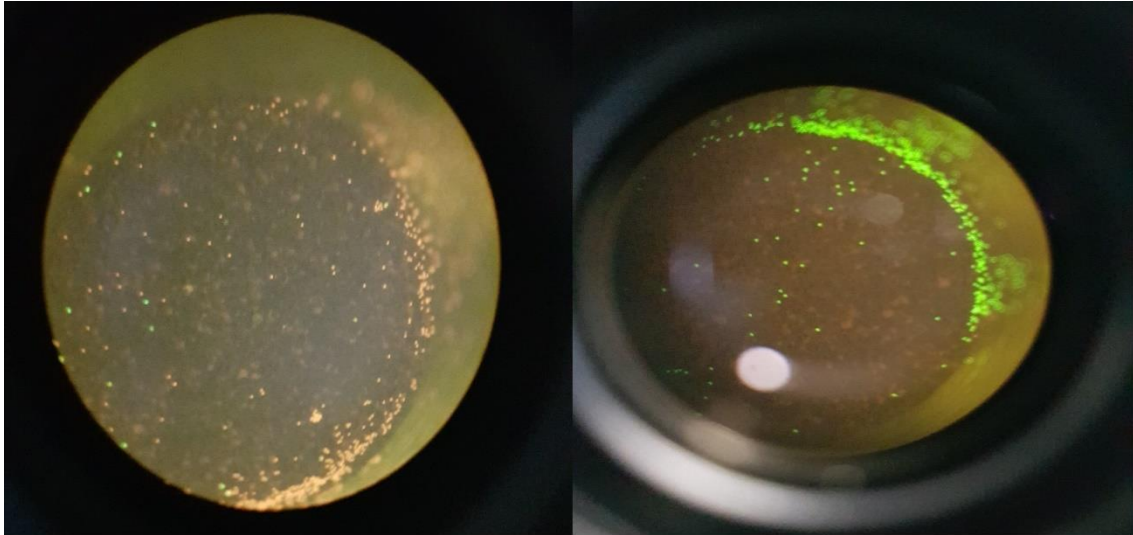


Abbildung 5: Reaktionsbild unter dem Fluoreszenzmikroskop, selbst fotografiert. Dargestellt sind zwei verschiedene Reaktionsbilder des lymphozytotoxischen Tests. Im linken Bild sieht man fast nur orange gefärbte (zerstörte) Zellen, dies entspricht einem ASHI-Score von 8. Es handelt sich hierbei um die Positivkontrolle. Im rechten Bild sieht man nur grün angefärbte Zellen. Dies entspricht einem ASHI-Score von 1 und zeigt die Negativkontrolle.

Anteil der geschädigten Zellen	ASHI-Score	Interpretation
0 – 10%	1	negativ
11 – 20%	2	fraglich negativ
21 – 40%	4	fraglich positiv
41 – 80%	6	positiv
81 – 100%	8	stark positiv

Tabelle 6: Auswertung des lymphozytotoxischen Tests

3 Ergebnisse

Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte mittels EXCEL (Microsoft Office 365; Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) und PRISM 8 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Zum Vergleich der Häufigkeitsverteilungen bestimmter Allele zwischen der Verum- und Kontrollgruppe kam der exakte Test nach Fisher zum Einsatz. Dieser bietet im Gegensatz zum χ^2 -Test den Vorteil, dass er auch bei kleinen Stichprobengrößen zuverlässige Ergebnisse liefert. Darüber hinaus wurde die Bonferroni-Korrektur eingesetzt, um eine α -Fehler-Kumulierung zu vermeiden.

3.1 Verteilung der Geschlechter und Thrombozytenzahlen

Die Geschlechterverteilung beider Gruppen ist in Abbildung 6 dargestellt. Bei der Analyse zeigte sich, dass in der Verumgruppe männliche Neugeborene häufiger als weibliche vertreten waren (35 versus 22). Dies war zwar auch in der Kontrollgruppe der Fall, dort zeigte sich jedoch eine annähernd gleiche Geschlechterverteilung (21 versus 17). Mit $p=0,67$ war der Unterschied zwischen den Kohorten statistisch nicht signifikant. Der mittlere Thrombozytennadir lag in der Verumgruppe (Abbildung 7) bei 47,6 G/L ($\sigma = 27,1$ G/L) und in der Kontrollgruppe (Abbildung 8) bei 42,8 G/L ($\sigma = 20,8$ G/L). Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

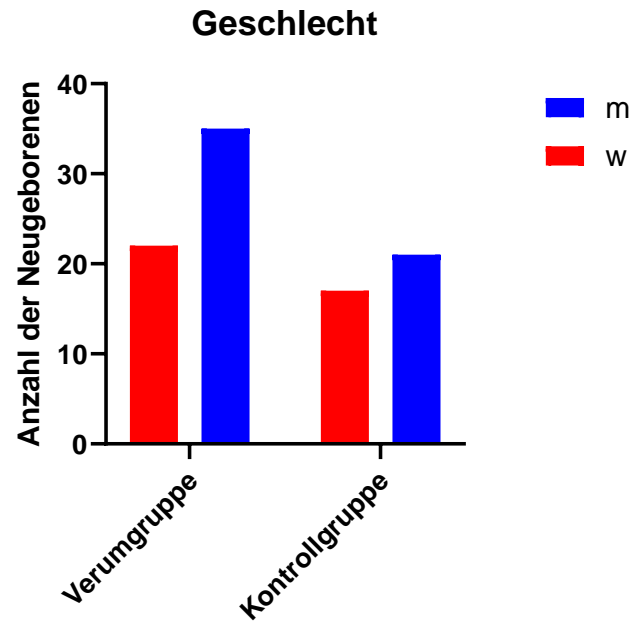


Abbildung 6: Geschlechterverteilung in der Verum- und Kontrollgruppe. Die Grafik zeigt die Geschlechterverteilung in der Verum- und Kontrollgruppe. Die männlichen Patienten sind blau dargestellt, die weiblichen rot.

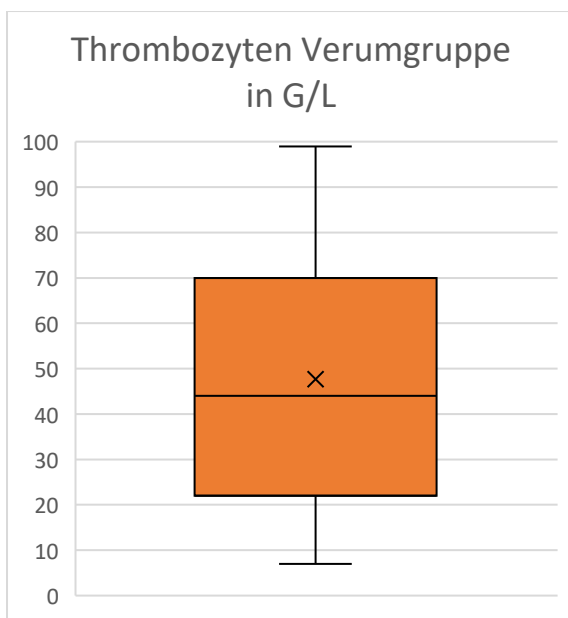


Abbildung 7: Thrombozytenzahlen in der Verumgruppe. Das Kastendiagramm zeigt die Verteilung des Thrombozytennadirs in der Verumgruppe. Die eingefärbte Box begrenzt das obere und das untere Quartil, der Querstrich zeigt den Median. Das Kreuz in der Box beschreibt den Mittelwert, die Antennen stellen die Werte außerhalb der beiden Quartile dar.

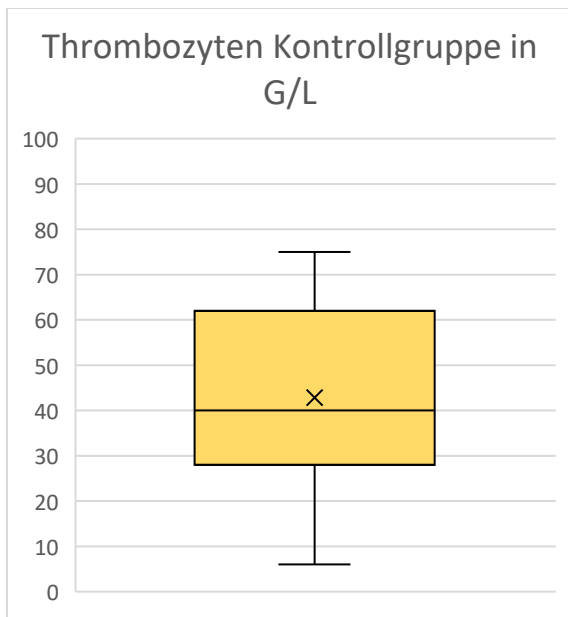


Abbildung 8: Thrombozytenzahlen in der Kontrollgruppe. Das Kastendiagramm zeigt die Verteilung des Thrombozytennadirs in der Kontrollgruppe. Die eingefärbte Box begrenzt das obere und das untere Quartil, der Querstrich zeigt den Median. Das Kreuz in der Box beschreibt den Mittelwert, die Antennen stellen die Werte außerhalb der beiden Quartile dar.

	Verumgruppe	Kontrollgruppe
weiblich/männlich	22/35	17/21
Thrombozytennadir	47,6 G/L ($\sigma = 27,1$ G/L)	42,8 G/L ($\sigma = 20,8$ G/L)

Tabelle 7: Zusammenfassung der Geschlechterverteilung und Thrombozytenwerte

3.2 Verteilung der HLA-Klasse-I-Merkmale der Kinder

Um die Frage beantworten zu können, ob bestimmte HL-Antigene bei thrombozytopenen Neugeborenen mit einem erhöhten Risiko für eine Immunisierung der Mutter assoziiert sind, wurden die Frequenzen der kindlichen HLA-Allele beider Gruppen miteinander verglichen. Durch den Vergleich der jeweiligen breiten Antigenspezifitäten wurden mögliche Kreuzreaktionen berücksichtigt (z.B. wurden HLA-A23 und HLA-A24 als HLA-A9 zusammengefasst). Bei dieser Analyse zeigte sich für keines der HLA-Klasse-I-Merkmale ein signifikanter Unterschied zwischen Verum- und Kontrollgruppe. Abbildung 9 zeigt die Verteilung der kindlichen HLA-A-Allele. Die HLA-B-Allele sind in Abbildung 10 dargestellt.

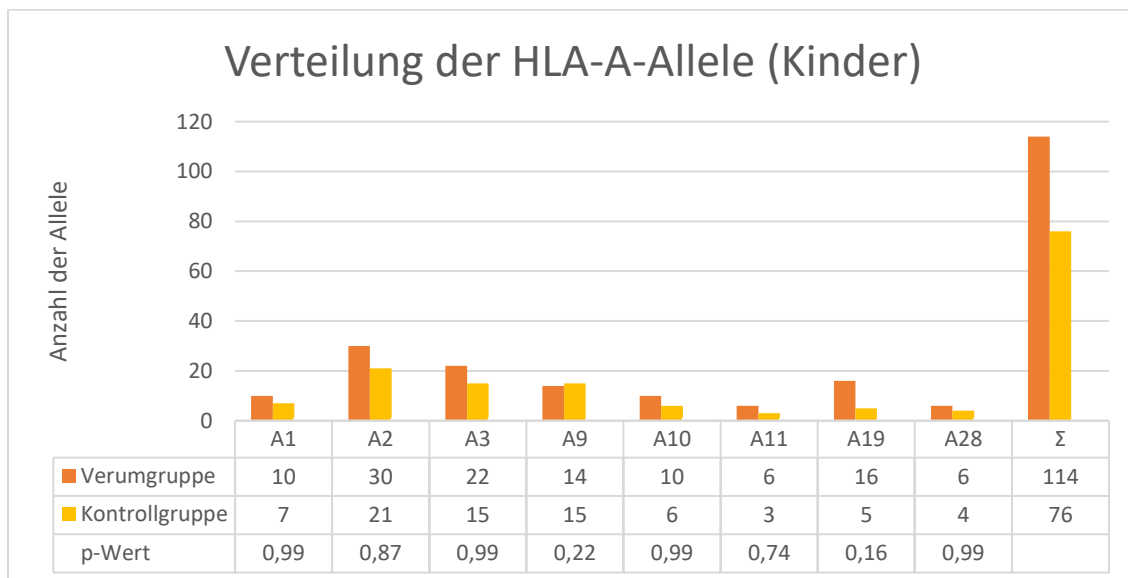


Abbildung 9: Verteilung der HLA-A-Allele (Kinder). Die Grafik zeigt die Verteilung der HLA-A-Allele der untersuchten Kinder. Zusätzlich sind die mithilfe des exakten Fishertests berechneten p-Werte angegeben. Werte über 0,05 gelten als statistisch nicht signifikant.

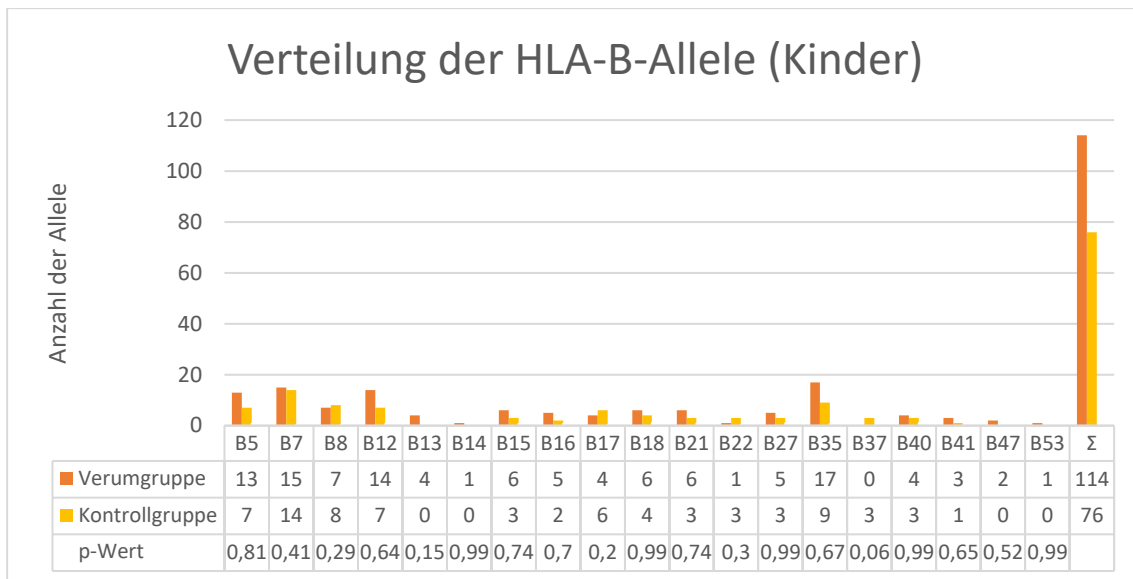


Abbildung 10: Verteilung der HLA-B-Allele (Kinder). Die Grafik zeigt die Verteilung der HLA-B-Allele der untersuchten Kinder. Zusätzlich sind die mithilfe des exakten Fishertests berechneten p-Werte angegeben. Werte über 0,05 gelten als statistisch nicht signifikant.

3.3 Verteilung der HLA-Klasse-I-Merkmale der Mütter

Die Verteilung der maternalen HLA-Klasse-I-Allele spielt für die Beantwortung der Fragestellung nach dem Zusammenhang zwischen HLA und FNAIT eine eher untergeordnete Rolle. Trotzdem wurden die Häufigkeiten statistisch analysiert, da die Abwesenheit eines HLA-Merkmals bei der Mutter Voraussetzung für die Alloimmunisierung gegen ein bestimmtes fetales Antigen ist. Zudem wurde in der Vergangenheit über die Rolle von maternalem HLA-B8 für ein erhöhtes Risiko der Bildung von Anti-HPA-1a-Antikörpern bei der FNAIT spekuliert (Taaning et al. 1983). Daher scheint eine durch HLA-Klasse-I-Moleküle induzierte Alloimmunisierung gegen fremde HLA-Merkmale zumindest in der Theorie als Ursache denkbar. Die Auswertung der erhobenen Daten zeigte jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Verum- und Kontrollgruppe. Abbildung 11 zeigt die Verteilung der mütterlichen HLA-A-Allele. Die HLA-B-Allele sind in Abbildung 12 dargestellt.

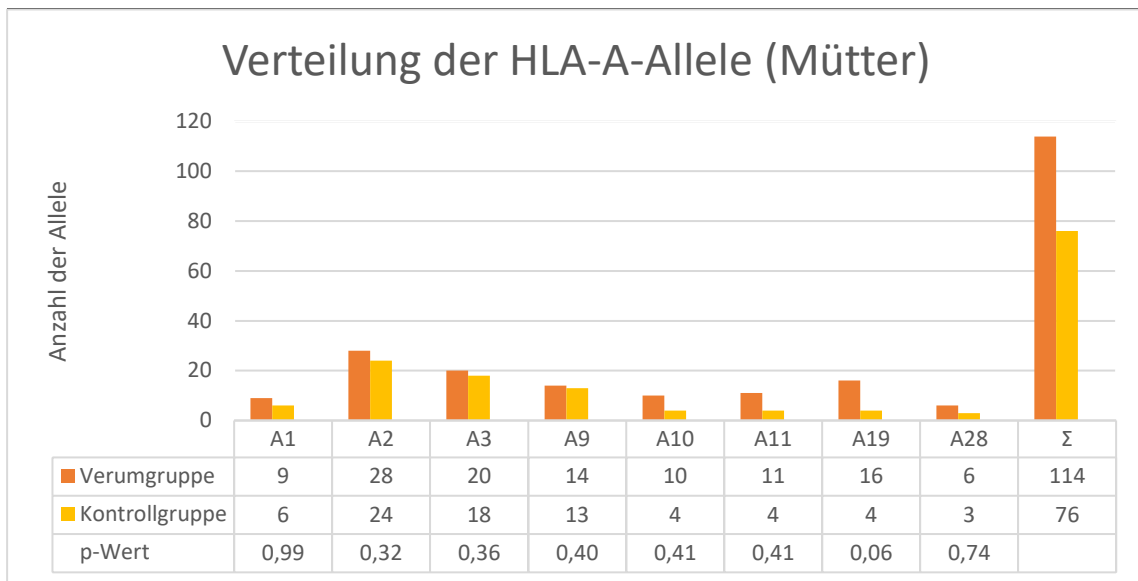


Abbildung 11: Verteilung der HLA-A-Allele (Mütter). Die Grafik zeigt die Verteilung der HLA-A-Allele der untersuchten Mütter. Zusätzlich sind die mithilfe des exakten Fishertests berechneten p-Werte angegeben. Werte über 0,05 gelten als statistisch nicht signifikant.

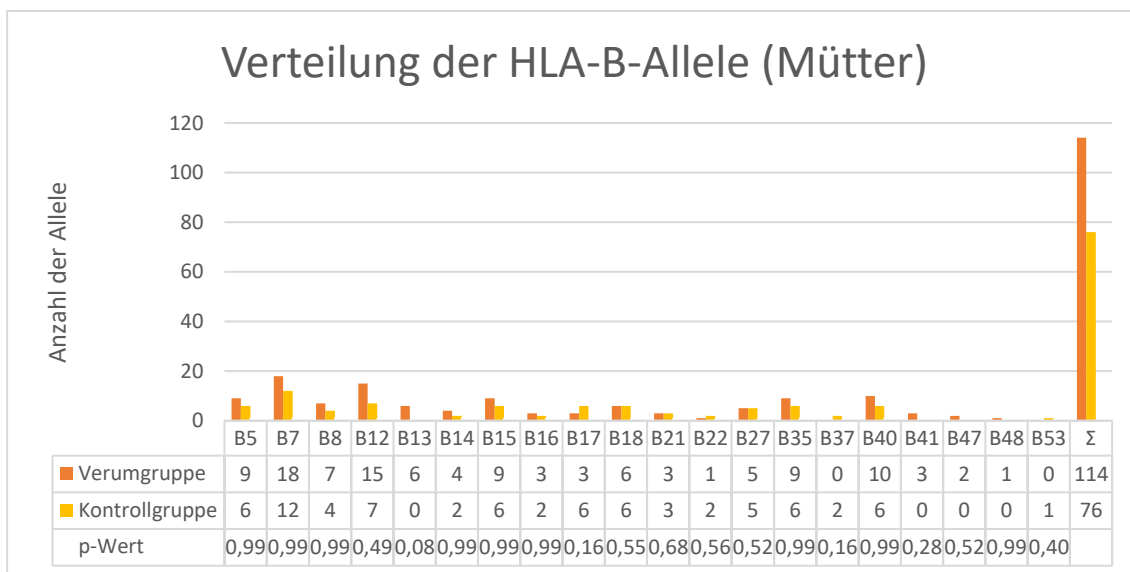


Abbildung 12: Verteilung der HLA-B-Allele (Mütter). Die Grafik zeigt die Verteilung der HLA-B-Allele der untersuchten Mütter. Zusätzlich sind die mithilfe des exakten Fishertests berechneten p-Werte angegeben. Werte über 0,05 gelten als statistisch nicht signifikant.

3.4 Verteilung der HLA-Klasse-II-Merkmale der Mütter

HLA-Klasse-II spielt eine zentrale Rolle bei der Erkennung körperfremder Zellen und der damit einhergehenden Immunantwort und Antikörperbildung. Da verschiedene HLA-Klasse-II-Moleküle unterschiedliche Peptide besonders gut präsentieren können, geht das Vorhandensein oder die Abwesenheit eines bestimmten HLA-Klasse-II-Allels mit einer unterschiedlichen Immunisierungswahrscheinlichkeit gegen spezifische Antigene einher. Wienzek-Lischka et al. konnten zeigen, dass das Vorhandensein des Allels HLA-DRB*3:01:01 mit einem erhöhten Risiko der maternalen Immunisierung gegen HPA-1a assoziiert ist (Wienzek-Lischka et al. 2017). Um zu untersuchen, ob dies auch für die Immunisierung gegen paternale HLA-Merkmale zutrifft, wurden die unterschiedlichen HLA-Klasse-II-Allele der Mütter aus beiden Gruppen miteinander verglichen. Für die Verteilung der Allele HLA-DRB (Abbildung 13), HLA-DQA (Abbildung 14) und HLA-DQB (Abbildung 15) zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Verum- und Untersuchungsgruppe.

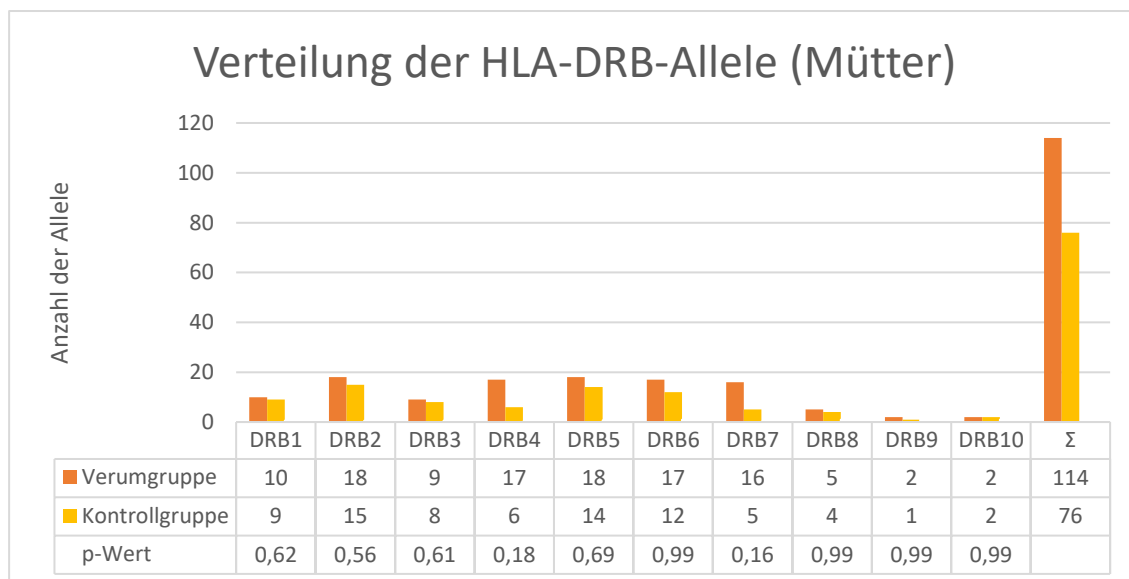


Abbildung 13: Verteilung der HLA-DRB-Allele (Mütter). Die Grafik zeigt die Verteilung der HLA-DRB-Allele der untersuchten Mütter. Zusätzlich sind die mithilfe des exakten Fishertests berechneten p-Werte angegeben. Werte über 0,05 gelten als statistisch nicht signifikant.

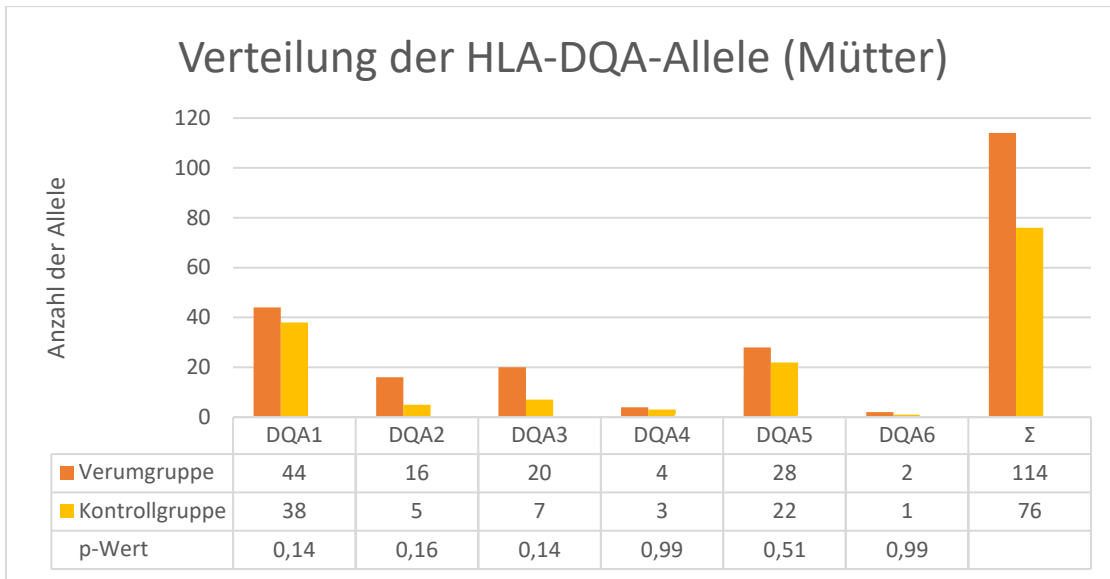


Abbildung 14: Verteilung der HLA-DQA-Allele (Mütter). Die Grafik zeigt die Verteilung der HLA-DQA-Allele der untersuchten Mütter. Zusätzlich sind die mithilfe des exakten Fishertests berechneten p-Werte angegeben. Werte über 0,05 gelten als statistisch nicht signifikant.

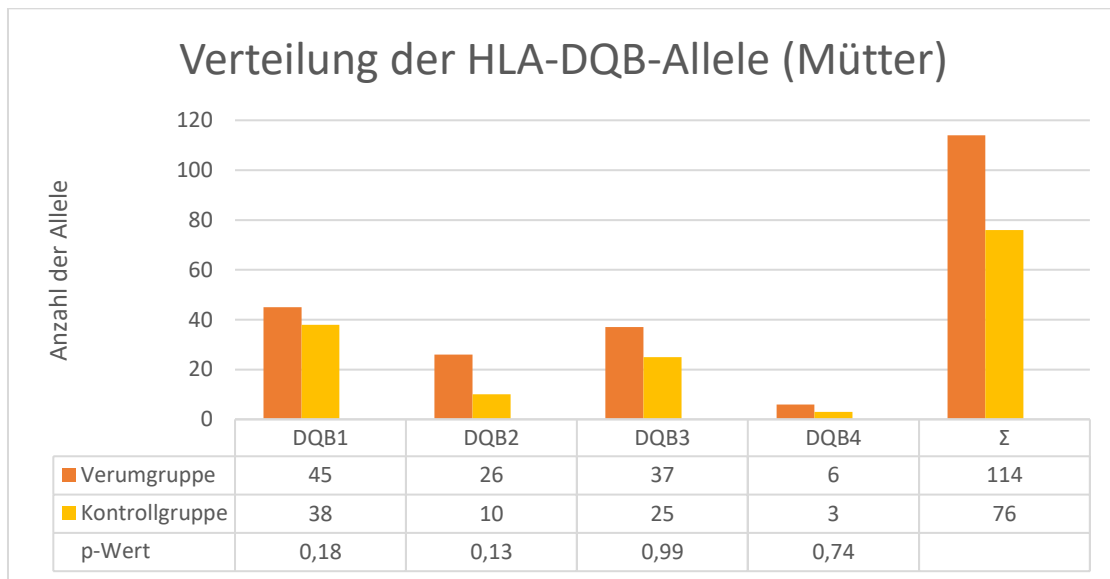


Abbildung 15: Verteilung der HLA-DQB-Allele (Mütter). Die Grafik zeigt die Verteilung der HLA-DQB-Allele der untersuchten Mütter. Zusätzlich sind die mithilfe des exakten Fishertests berechneten p-Werte angegeben. Werte über 0,05 gelten als statistisch nicht signifikant.

3.5 Unterteilung der Verumgruppe

Da bei den bisherigen Analysen keine statistisch signifikanten Ergebnisse beobachtet werden konnten, wurde die Verumgruppe unterteilt, nämlich in diejenigen Mütter, bei denen im LCT *fetusspezifische* Anti-HLA-Antikörper nachgewiesen werden konnten und diejenigen, bei denen die nachgewiesenen Antikörper nicht für fetale Antigene spezifisch waren. Bei drei Müttern konnte aufgrund mangelnden Probenmaterials kein LCT durchgeführt werden. Die Frequenzen der im LCT nachgewiesenen antifetalen Anti-HLA-Antikörper sind in den Tabellen 8 und 9 dargestellt.

Anti-HLA-A-Antikörper, fetusspezifisch	n	Häufigkeit
nicht durchgeführt	3	5,26 %
nicht nachweisbar	30	52,63 %
nachweisbar	24	42,11 %
davon:		
A1	3	5,26 %
A2	6	10,53 %
A3	6	10,53 %
A9	2	3,51 %
A10	3	5,26 %
A19	2	3,51 %
A28	2	3,51 %

Tabelle 8: Verteilung der fetusspezifischen HLA-A-Antikörper. Die dargestellte Tabelle zeigt die Frequenzen für antifetale HLA-A-Antikörper in den mütterlichen Seren.

Anti-HLA-B-Antikörper, fetusspezifisch	n	Häufigkeit
nicht durchgeführt	3	5,26 %
nicht nachweisbar	24	42,11 %
nachweisbar	30	52,63 %
davon:		
B5	8	14,04 %
B7	3	5,26 %
B8	3	5,26 %
B12	3	5,26 %
B16	2	3,51 %
B17	1	1,75 %
B18	1	1,75 %
B21	3	5,26 %
B22	1	1,75 %
B27	1	1,75 %
B35	4	7,02 %

Tabelle 9: Verteilung der fetusspezifischen HLA-B-Antikörper. Die dargestellte Tabelle zeigt die Frequenzen für antifetale HLA-B-Antikörper in den mütterlichen Seren.

Von den 54 im LCT untersuchten Müttern waren 24 Mütter positiv für fetusspezifische Anti-HLA-A-Antikörper. 30 Mütter hatten antifetale Anti-HLA-B-Antikörper im Serum. Insgesamt hatten 41 Mütter entweder fetusspezifische Anti-HLA-A-Antikörper oder fetusspezifische Anti-HLA-B-Antikörper oder eine Kombination aus beiden im Serum. Diese 41 Mütter bildeten nun die neue Verumgruppe (nachfolgend als *Verumgruppe** bezeichnet), mit der weitere Analysen durchgeführt wurden. Die Unterteilung der Verumgruppe ist in Abbildung 16 grafisch dargestellt.

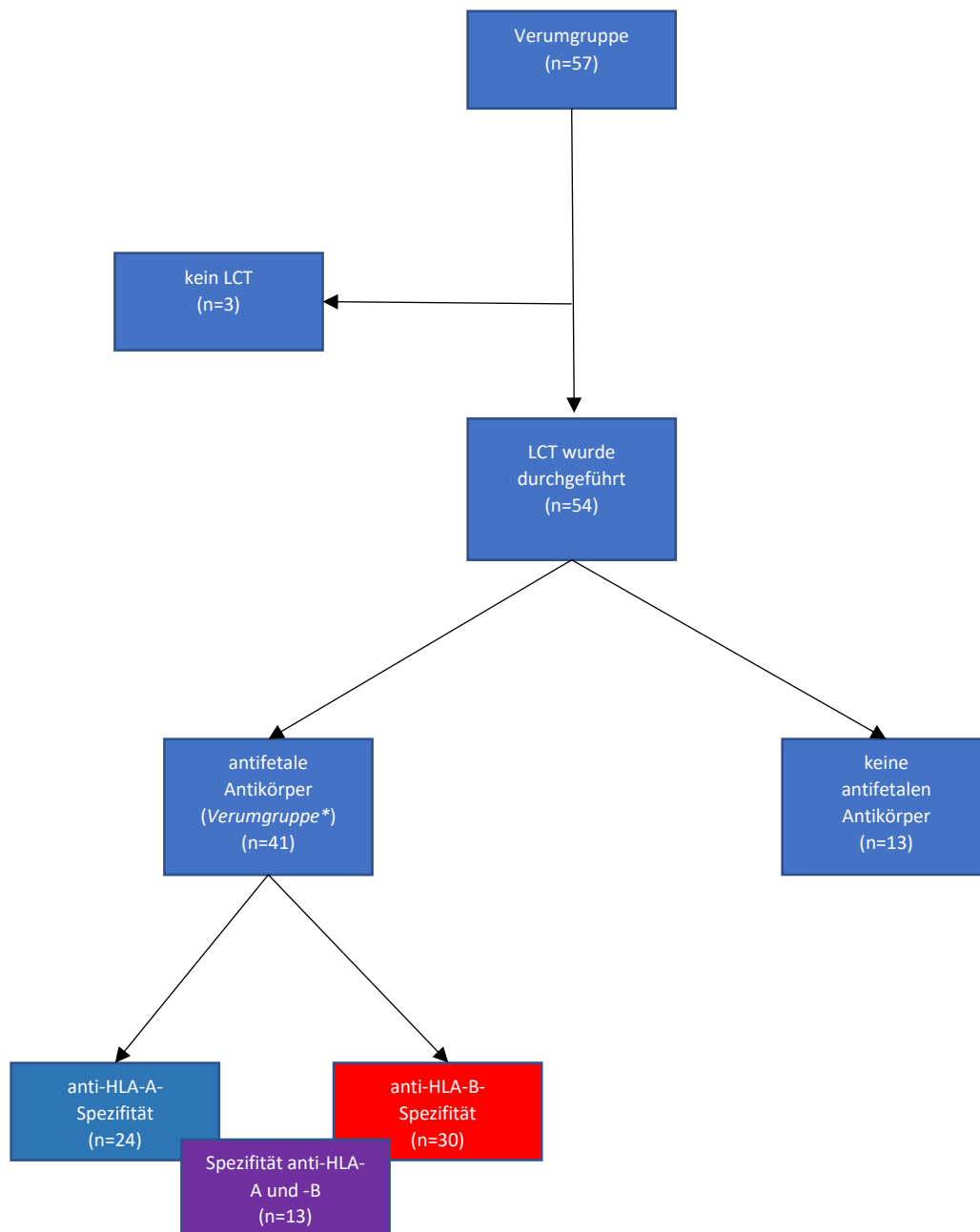


Abbildung 16: Unterteilung der Verumgruppe. Die gesamte Gruppe besteht aus 57 Mutter-Kind-Paaren. Bei drei Müttern konnte kein LCT durchgeführt werden. Von den 54 getesteten Müttern konnten bei 41 Müttern Anti-HLA-Antikörper mit antifetaler Spezifität im LCT nachgewiesen werden (*Verumgruppe**). Bei 13 Müttern waren die Antikörper gegen nicht-fetale Antigene gerichtet. Von den 41 Müttern der *Verumgruppe** konnten bei 24 Müttern antifetale Anti-HLA-A-Antikörper gefunden werden. Bei 30 Müttern wurden antifetale Anti-HLA-B-Antikörper gefunden. 13 Mütter hatten sowohl antifetale Anti-HLA-A- als auch antifetale Anti-HLA-B-Antikörper im Serum.

3.6 Verteilung der paternal vererbten HLA-Klasse-I-Merkmale der Kinder in der *Verumgruppe**

Es wurde erneut die Verteilung der fetalen HLA-Klasse-I-Merkmale analysiert. Diesmal wurden aber nur die Kinder, bei deren Müttern antifetale Anti-HLA-Antikörper im LCT nachweisbar waren (*Verumgruppe**), mit der Kontrollgruppe verglichen. Es wurden außerdem nur die eindeutig paternal vererbten Allele miteinander verglichen. Konnte in der Kontrollgruppe ein Allel nicht eindeutig dem Vater zugeordnet werden, wurde dieses Mutter-Kind-Paar bei der Analyse für den jeweiligen Genort nicht berücksichtigt. Dies war beispielsweise der Fall, wenn das Kind für das betreffende Allel homozygot war oder, wenn Mutter und Kind zufälligerweise die gleichen Allele hatten. In beiden Fällen trägt das Kind keine für die Mutter fremden Antigene und eine Alloimmunisierung ist daher ausgeschlossen.

Beispiel:

Die Mutter trägt die folgenden HLA-Klasse-I-Allele:

A1, A3, B7, B27

Der Fetus trägt die HLA-Klasse-I-Allele:

A3, A3, B7, B40

*In diesem Fall wurde das Mutter-Kind-Paar für die Frequenzanalyse von HLA-A aus der *Verumgruppe** ausgeschlossen, da eine Alloimmunisierung der Mutter gegen fetales HLA-A nicht möglich ist (das Kind ist homozygot für HLA-A3 und die Mutter ist daher auch selbst Trägerin des Allels). Für die Frequenzanalyse für HLA-B wurde das paternal vererbte HLA-B40 jedoch miteingeschlossen, da es sich aus mütterlicher Sicht um ein Alloantigen handelt. HLA-B7 wurde in diesem Fall nicht berücksichtigt, da das Kind dieses Allel von der Mutter vererbt bekommen hat und es sich daher aus ihrer Sicht um ein Selbstantigen handelt.*

In der *Verumgruppe** konnten 24 eindeutig paternal vererbte HLA-A-Allele identifiziert werden. Für HLA-B waren es 30. In der Kontrollgruppe wurden 25 HLA-A-Allele und 28 HLA-B-Allele berücksichtigt. Weder für HLA-A noch für HLA-B konnte ein statistisch signifikanter Unterschied in der Allelfrequenz gefunden werden. Die Verteilung der eindeutig paternal vererbten HLA-A-Allele ist in Abbildung 17 zu sehen. Die eindeutig paternal vererbten HLA-B-Allele sind in Abbildung 18 gezeigt.

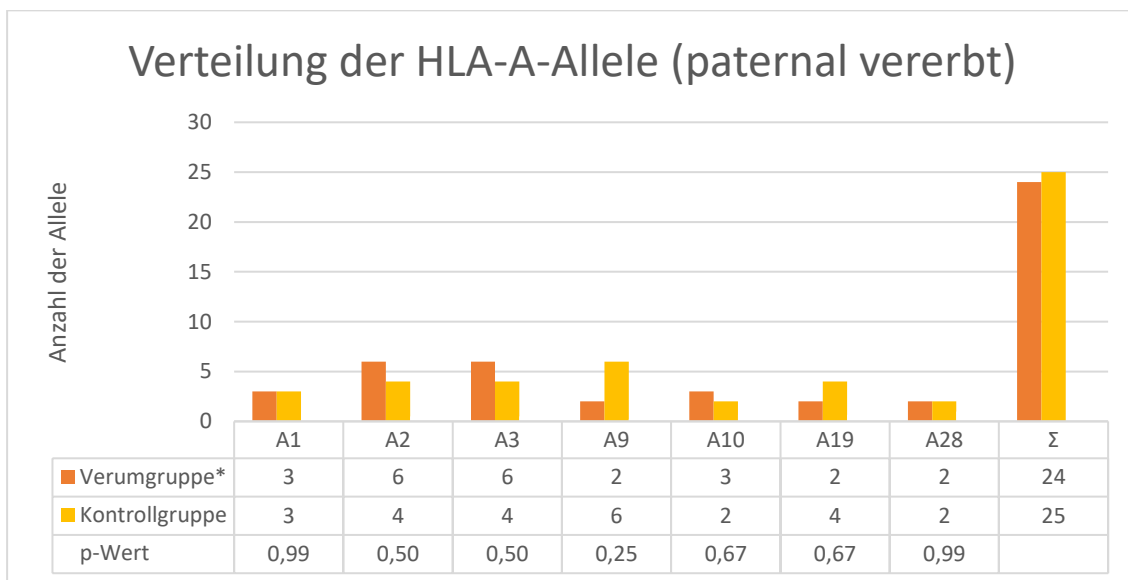


Abbildung 17: Verteilung der HLA-A-Allele (paternal vererbt). Die Grafik zeigt die Verteilung der eindeutig paternal vererbten HLA-A-Allele. Zusätzlich sind die mithilfe des exakten Fishertests berechneten p-Werte angegeben. Werte über 0,05 gelten als statistisch nicht signifikant.

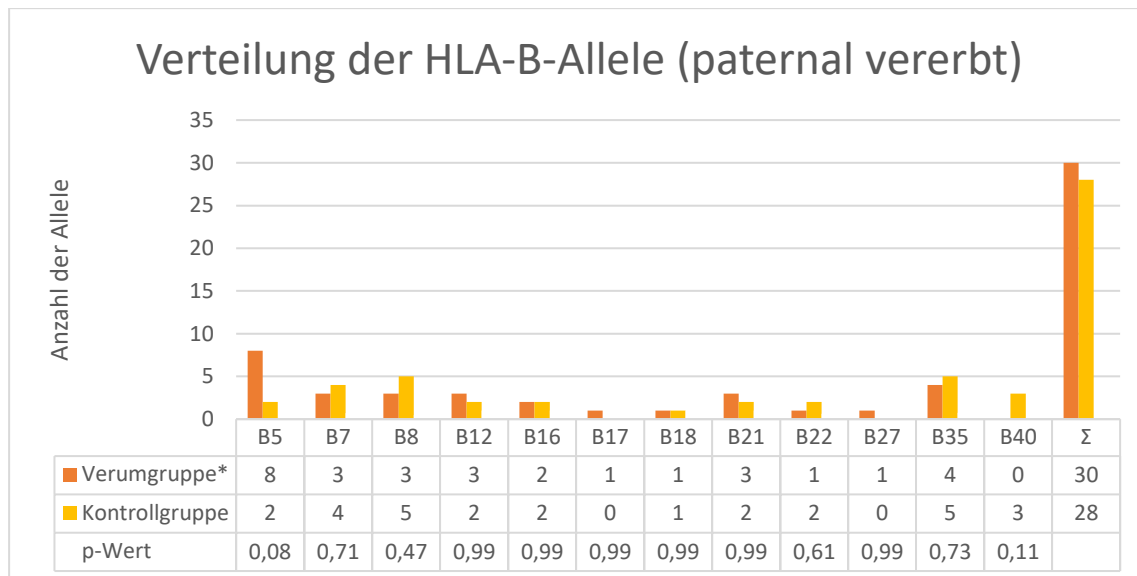


Abbildung 18: Verteilung der HLA-B-Allele (paternal vererbt). Die Grafik zeigt die Verteilung der eindeutig paternal vererbten HLA-B-Allele. Zusätzlich sind die mithilfe des exakten Fishertests berechneten p-Werte angegeben. Werte über 0,05 gelten als statistisch nicht signifikant.

3.7 Verteilung der HLA-Klasse-II-Merkmale der Mütter in der *Verumgruppe**

Wie bereits in 3.2. beschrieben, spielen HLA-Klasse-II-Moleküle eine wichtige Rolle bei der Immunantwort auf ein Alloantigen. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte beim Vergleich zwischen Verum- und Kontrollgruppe jedoch zunächst nicht gefunden werden. Daher wurden im nächsten Schritt die Frequenzen der *Verumgruppe** mit denen der Kontrollgruppe verglichen. Diesmal wurden also nur diejenigen Frauen in der Verumgruppe berücksichtigt, die tatsächlich antifetale Anti-HLA-Antikörper ausgebildet hatten. Es wurden 41 Mütter in der *Verumgruppe** und alle 38 Mütter aus der Kontrollgruppe miteinander verglichen. Während sich für die Verteilung von HLA-DRB (Abbildung 19) und HLA-DQA (Abbildung 20) keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen zeigten, konnte für die Allelfrequenz von HLA-DQB2 (Abbildung 21) ein p-Wert von 0,047 berechnet werden. Dieser Wert liegt unter dem Signifikanzniveau von 0,05 und gilt somit als statistisch signifikant.

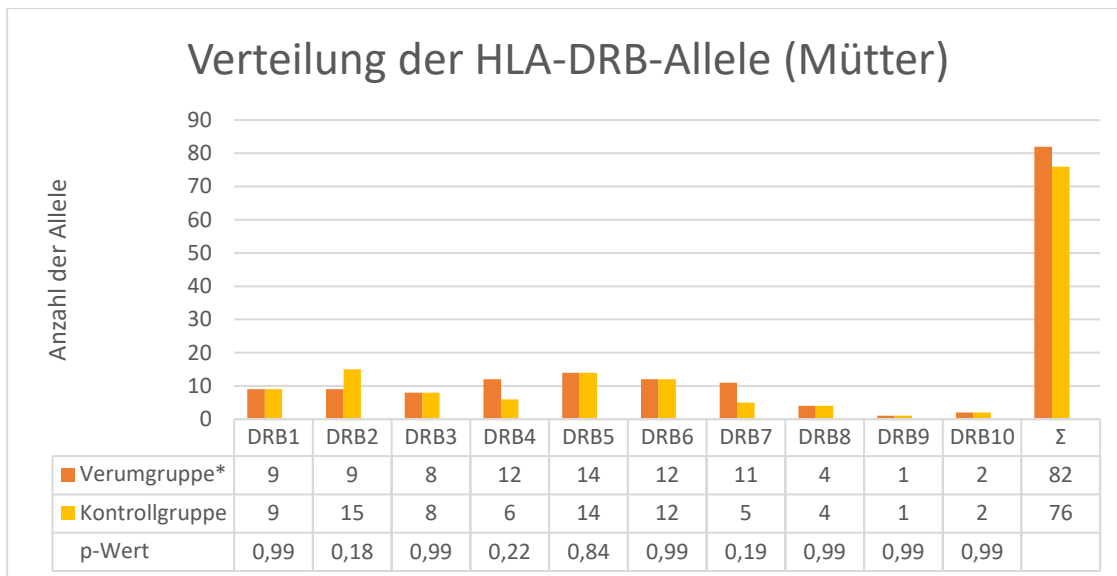


Abbildung 19: Verteilung der HLA-DRB-Allele (Mütter). Die Grafik zeigt die Verteilung der HLA-DRB-Allele der untersuchten Mütter. Zusätzlich sind die mithilfe des exakten Fishertests berechneten p-Werte angegeben. Werte über 0,05 gelten als statistisch nicht signifikant.

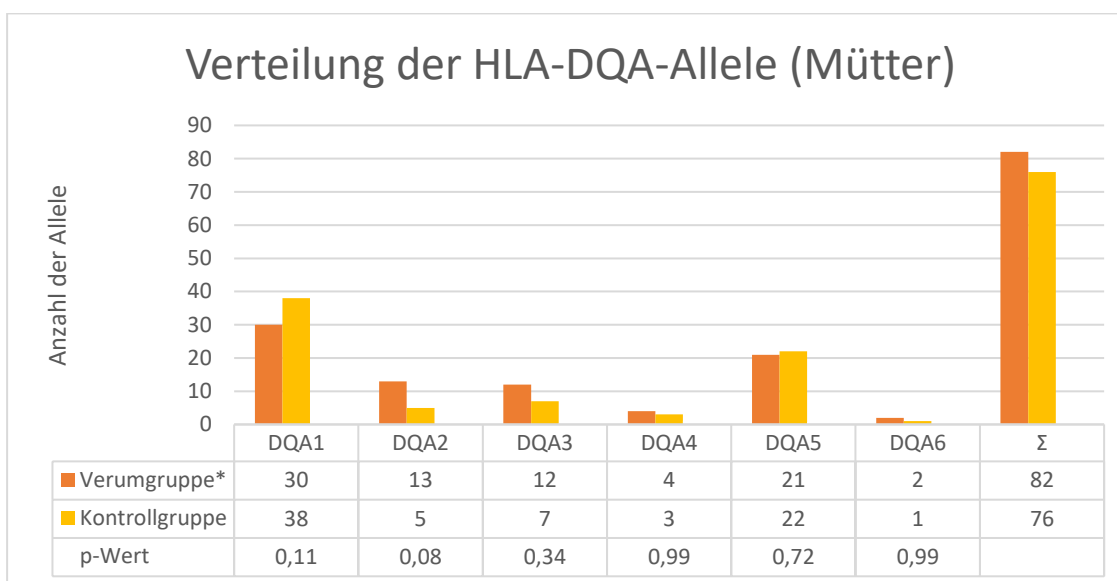


Abbildung 20: Verteilung der HLA-DQA-Allele (Mütter). Die Grafik zeigt die Verteilung der HLA-DQA-Allele der untersuchten Mütter. Zusätzlich sind die mithilfe des exakten Fishertests berechneten p-Werte angegeben. Werte über 0,05 gelten als statistisch nicht signifikant.

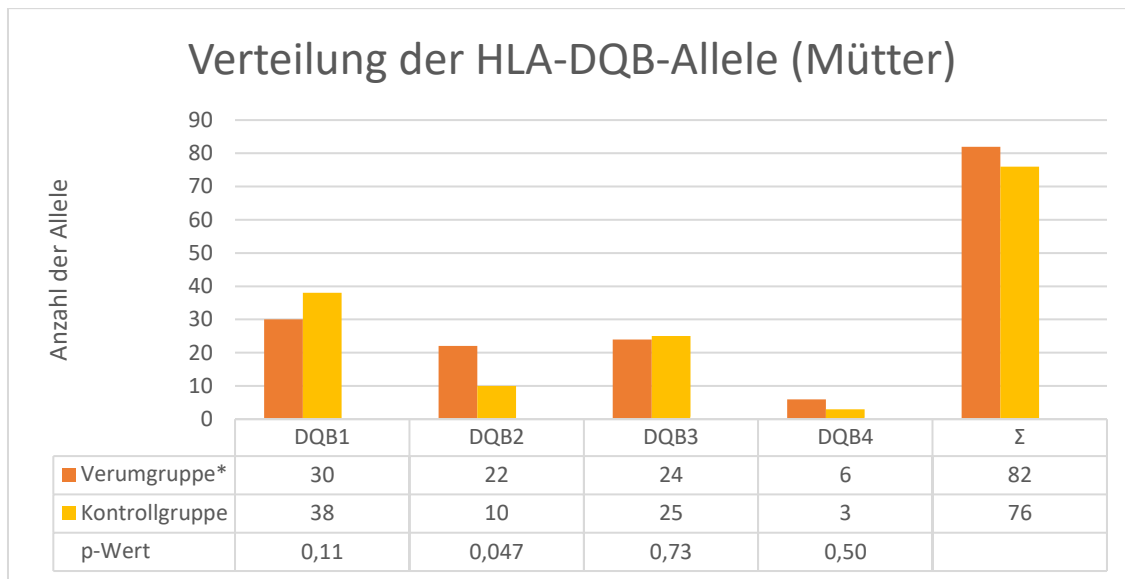


Abbildung 21: Verteilung der HLA-DQB-Allele (Mütter). Die Grafik zeigt die Verteilung der HLA-DQB-Allele der untersuchten Mütter. Zusätzlich sind die mithilfe des exakten Fishertests berechneten p-Werte angegeben. Werte über 0,05 gelten als statistisch nicht signifikant. Der p-Wert für HLA-DQB2 lag mit 0,047 knapp unter dem Signifikanzniveau und gilt damit als statistisch signifikant. Das bedeutet, dass in der untersuchten Stichprobe das Allel HLA-DQB2 in der *Verumgruppe** signifikant häufiger aufgetreten ist als in der Kontrollgruppe.

3.8 Erneute Unterteilung der Gruppen

Um den möglichen Zusammenhang zwischen dem Allel HLA-DQB2 und dem Krankheitsbild der FNAIT weiter zu untersuchen, wurden die beiden Gruppen im nächsten Schritt noch einmal unterteilt. Diesmal wurden aus der Verumgruppe und aus der Kontrollgruppe diejenigen Mutter-Kind-Paare ausgewählt, bei denen die Mutter Trägerin des Allels HLA-DQB2 ist und dann miteinander verglichen. Die HLA-DQB2-positive Verumgruppe (im Folgenden als Verumgruppe[DQB2+] bezeichnet) bestand aus 21 Mutter-Kind-Paaren (20 heterozygote Mütter und eine homozygote Mutter, entsprechend 22 maternalen HLA-DQB2 Allelen; vgl. Abbildung 21). Die HLA-DQB2-positive Kontrollgruppe (im Folgenden als Kontrollgruppe[DQB2+] bezeichnet) bestand aus 9 Mutter-Kind-Paaren (8 heterozygote und eine homozygote Mutter, entsprechend 10 maternalen HLA-DQB2-Allelen; vgl. Abb. 21).

Nun wurden abermals die eindeutig paternal vererbten HLA-Klasse-I-Allele der Kinder miteinander verglichen (vgl. Kapitel 3.6), um zu untersuchen, ob ein bestimmtes HLA-Klasse-I-Allel bei gleichzeitigem Vorliegen von mütterlichem HLA-DQB2 in einer der beiden Gruppen gehäuft auftritt. Für HLA-A (Abbildung 22) und HLA-B (Abbildung 23) konnte kein statistisch signifikanter Unterschied der kindlichen Allelfrequenzen gezeigt werden.

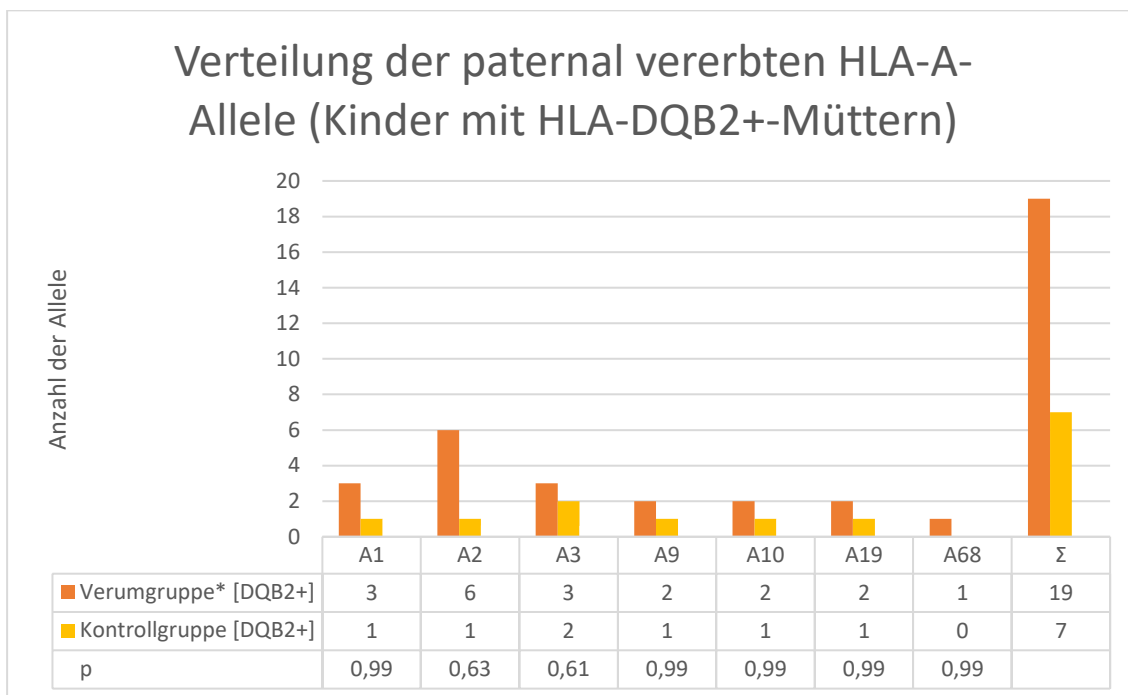


Abbildung 22: Verteilung der paternal vererbten HLA-A-Allele (Kinder mit HLA-DQB2+- Müttern). Die Grafik zeigt die Verteilung der paternal vererbten HLA-A-Allele der untersuchten Kinder mit HLA-DQB2-positiven Müttern. Zusätzlich sind die mithilfe des exakten Fishertests berechneten p-Werte angegeben. Werte über 0,05 gelten als statistisch nicht signifikant.

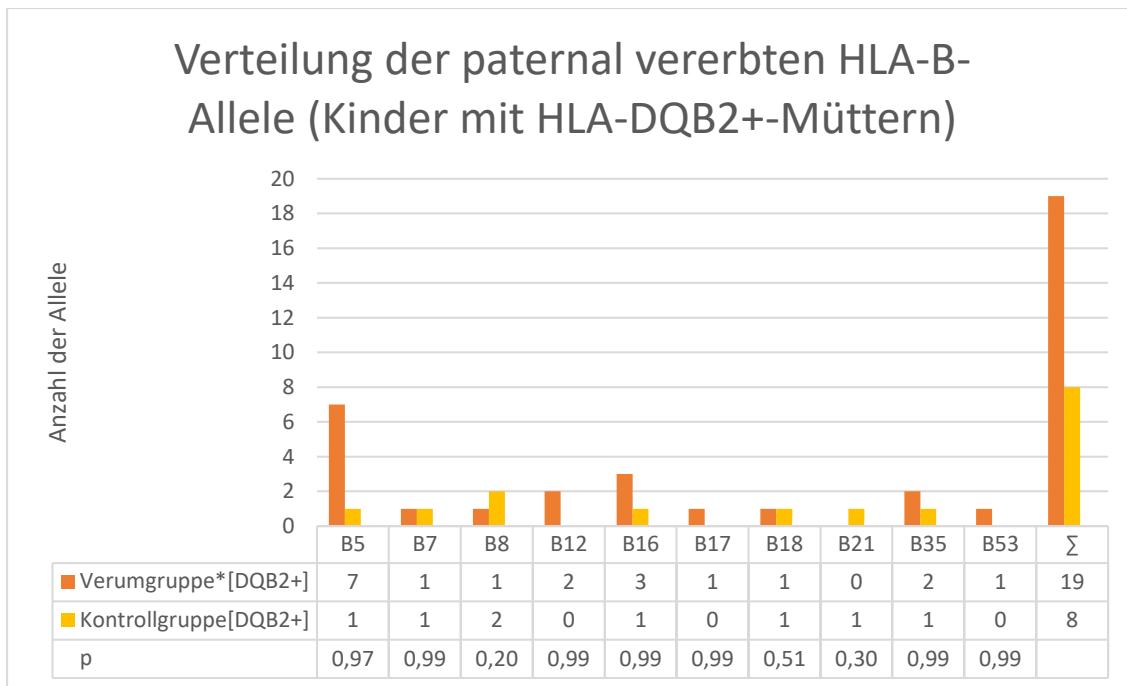


Abbildung 23: Verteilung der paternal vererbten HLA-B-Allele (Kinder mit HLA-DQB2+-Müttern). Die Grafik zeigt die Verteilung der paternal vererbten HLA-B-Allele der untersuchten Kinder mit HLA-DQB2-positiven Müttern. Zusätzlich sind die mithilfe des exakten Fishertests berechneten p-Werte angegeben. Werte über 0,05 gelten als statistisch nicht signifikant.

3.9 Bonferroni-Korrektur

Beim multiplen Testen mit demselben Datensatz kann es schnell zu einer sogenannten α -Fehler-Kumulierung kommen. Dies bedeutet, dass man irgendwann vermeintlich statistisch signifikante Ergebnisse mit einem p-Wert unter dem Signifikanzniveau bekommen wird, wenn man nur oft genug testet. Um solche Fehler zu vermeiden und nicht fälschlicherweise eine eigentlich korrekte Nullhypothese zu verwerfen, gibt es mehrere Möglichkeiten, zur Anpassung des Signifikanzniveaus. Eine beliebte Möglichkeit hierfür ist die Bonferroni-Korrektur, bei der das Signifikanzniveau durch die Anzahl der durchgeführten Tests geteilt wird, um so ein neues Signifikanzniveau p^* zu bestimmen. Bei einem ursprünglichen Signifikanzniveau von 0,05 und 154 mit dem Datensatz durchgeführten exakten Fishertests ergibt sich für das neue Signifikanzniveau p^*

$$p^* = \frac{0,05}{154} \approx 0,000325$$

Wenn man nun diesen korrigierten p-Wert p^* als Maßstab nimmt, bedeutet dies, dass für keines der untersuchten Merkmale ein statistisch signifikanter Unterschied in der Verteilung festgestellt werden konnte.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Diskussion der Probandenauswahl

Alle Probanden waren zwischen 2002 und 2016 Patienten am UKGM. Da die kindliche Thrombozytenzahl bei Geburt jedoch nicht routinemäßig bestimmt wird, liegt es nahe, dass die Untersuchung der Plättchenzahl bei den Kindern deshalb durchgeführt wurde, weil sie in irgendeiner Form (z.B. durch Petechien oder Ekchymosen) klinisch auffällig waren. Somit ist davon auszugehen, dass nur klinisch auffällige Neugeborene in die Studie eingeschlossen wurden. Da mildere, subklinische Verläufe einer Neugeborenthrombozytopenie häufig unentdeckt bleiben, ist bei der Auswahl der Probanden eine Stichprobenverzerrung anzunehmen (Gunnink et al. 2014). Diese Stichprobenverzerrung spiegelt sich auch in der Zahl der ausgeschlossenen Patienten wider, da beinahe die Hälfte der ursprünglich identifizierten Patienten aufgrund von schwerwiegenden Komplikationen in oder nach der Schwangerschaft ausgeschlossen werden musste. Diese Art der Stichprobenverzerrung ist ein häufiges Problem bei retrospektiven Studien. Ein rückblickendes Studiendesign ist jedoch aufgrund der Seltenheit des Krankheitsbilds der FNAIT beinahe unumgänglich.

Von den ursprünglich 95 für die Verumgruppe identifizierten Patienten wurden 38 (40,0 %) ausgeschlossen. Bei der Kontrollgruppe wurden 35 von 73 (47,9 %) ausgeschlossen. Da die FNAIT ein seltenes Krankheitsbild darstellt und viele der identifizierten Patienten aus der Studie ausgeschlossen wurden, ist die untersuchte Stichprobe nicht sehr groß. Kleine Fallzahlen können valide statistische Analysen erschweren und schränken die Aussagekraft vieler Untersuchungen ein. Mit 57 Mutter-Kind-Paaren in der Verumgruppe und 40 Mutter-Kind-Paaren in der Kontrollgruppe ist das untersuchte Kollektiv aber ähnlich groß wie das einer vergleichbaren Arbeit von Dahl et al. aus dem Jahr 2017 (Dahl et al. 2017). Dahl et al. haben jedoch von 62 identifizierten Patienten nur 12 (19,3 %) ausgeschlossen. Mögliche Ursachen für diese Diskrepanz könnten Unterschiede im Ausgangskollektiv oder eine unterschiedlich strenge Anwendung der Ausschlusskriterien sein.

Ein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Arbeiten liegt im Aufbau der Kontrollgruppe. In dieser Arbeit bestand die Kontrollgruppe aus Mutter-Kind-Paaren, für die die gleichen Ein- und Ausschlusskriterien galten wie für die Verumgruppe. Einziger Unterschied zwischen Verum- und Kontrollgruppe war der positive bzw. negative Nachweis von Anti-HLA-Antikörpern im Crossmatch. Dies spricht für eine gute Vergleichbarkeit beider Gruppen. Im Unterschied dazu haben Dahl et al. ihre Kontrollgruppe aus gesunden Müttern mit Anti-HLA-Antikörpern gebildet, bei denen die Kinder *nicht* thrombozytopen waren. Der Grund für die verschiedenen aufgebauten Kontrollgruppen liegt in der unterschiedlichen Fragestellung beider Arbeiten. Während Dahl et al. versucht haben, einen Zusammenhang zwischen Anti-HLA-Antikörpern bei bereits immunisierten Müttern und dem Auftreten einer fetalen Thrombozytopenie aufzuzeigen, war es Aufgabe dieser Studie, die Ursachen der Immunisierung zu untersuchen. Zur Beantwortung dieser Fragestellung ist also der Vergleich mit nicht-immunisierten Müttern notwendig.

Die Einschlussgrenze für die Studie lag bei einer Thrombozytenzahl von ≤ 100 G/L. Die Grenze für eine Thrombozytopenie bei Neugeborenen liegt, genau wie bei Erwachsenen, bei Werten <150 G Thrombozyten/L (Gadner 2006; Alarcon et al. 2012). Somit waren alle untersuchten Kinder deutlich thrombozytopen. Beide Gruppen hatten beim Thrombozytennadir sehr ähnliche Mittelwerte und Standardabweichungen ($47,6 \pm 27,1$ G/L in der Verumgruppe versus $42,8 \pm 20,8$ G/L in der Kontrollgruppe), was für eine gute Vergleichbarkeit der beiden Gruppen spricht.

4.1.2 Diskussion der Kreuzprobe zur Unterscheidung der Gruppen

Für die Zuordnung der Probanden zur Verum- oder Kontrollgruppe war das Ergebnis der Kreuzprobe entscheidend. Dabei wurde mütterliches Serum mit väterlichen Thrombozyten inkubiert, um eventuell vorhandene Antikörper nachzuweisen. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass bei dieser Art der Kreuzprobe nur plättchenreaktive Antikörper nachgewiesen werden können. Die Untersuchung ist also nicht so sensitiv wie beispielsweise durchflusszytometrische Verfahren mittels Luminex®-Technologie. Theoretisch wäre es also denkbar, dass falsch negative Ergebnisse bei der Kreuzprobe fälschlicherweise zu einer Zuordnung in die Kontrollgruppe geführt haben könnten.

Jedoch ist es fraglich, ob ein Antikörper, der im Crossmatch überhaupt nicht nachweisbar ist, eine klinisch relevante Thrombozytopenie beim Fetus verursachen kann.

4.1.3 Diskussion der HLA-Typisierung

Die HLA-Typisierung mittels SSO-Methode stellt eine seit über 30 Jahren etablierte Methode dar, die in vielen Labors routinemäßig zum Einsatz kommt (Dunckley 2012). Obwohl heute mit dem *Next Generation Sequencing* (NGS) eine Methode zur HLA-Typisierung existiert, die noch höhere Auflösungen bietet, stellt die SSO-Methode ein immer noch häufig angewandtes Verfahren dar, da sie ein ausgewogenes Verhältnis aus Kosten, Aufwand und Auflösung mit sehr akkuraten Ergebnissen liefert (Smith et al. 2019; Wienzek-Lischka et al. 2020). Aufgrund des sehr guten Kosten-Nutzen-Verhältnisses und weil die Allele nur in niedriger Auflösung miteinander verglichen wurden, sind alle HLA-Typisierungen mittels reverser SSO-Methode durchgeführt worden.

Mit NGS wäre zwar eine deutlich höhere Auflösung der Allele möglich gewesen, ein Vergleich der Frequenzen dieser hochaufgelösten Allele wäre bei dem kleinen Stichprobenumfang jedoch nicht sinnvoll gewesen. Eine höhere Auflösung hätte unter bestimmten Umständen interessant sein können, wie etwa beim Nachweis eines vermeintlichen Auto-Antikörpers im LCT. So wäre es beispielsweise denkbar, dass sich eine Patientin, die Trägerin des Allels HLA-A*01:02 ist, gegen HLA-A*01:01 immunisiert. In der niedrigen Auflösung würde diese Konstellation so aussehen, als hätte die Patientin Auto-HLA-A1-Antikörper. Da jedoch in keinem der Seren Autoantikörper nachgewiesen werden konnten, erübrigt sich die Notwendigkeit einer höheren Auflösung, zumal in vielen solcher Fälle auch die Auflösung der SSO-Methode ausreichend wäre.

Weiterhin muss bedacht werden, dass sich die durchschnittlichen Frequenzen bestimmter HLA-Allele in der Bevölkerung je nach geographischer Region mitunter deutlich unterscheiden. So wird beispielsweise die Prävalenz von HLA-B27 in Europa mit etwa 8 % angegeben, während sie in Japan bei weniger als 0,5 % liegt (Mehra et al. 2010). Da die ethnische Herkunft der untersuchten Probanden nicht bekannt ist, könnte so etwa eine Überrepräsentierung von Japanern in einer der beiden Gruppen zu einer Verzerrung für das Allel HLA-B27 führen.

4.1.4 Diskussion des Lymphozytoxischen Tests

Zur Differenzierung der Anti-HLA-Antikörper im mütterlichen Serum kam der LCT zum Einsatz. Obwohl der LCT als sehr zeitaufwändig gilt und eine vergleichsweise niedrige Sensitivität aufweist, bietet er im Vergleich zu anderen Verfahren einen entscheidenden Vorteil: Während die klinische Signifikanz von Anti-HLA-Antikörpern, die mittels ELISA oder Luminex® nachgewiesen wurden, oft unklar bleibt, weist der LCT nur klinisch relevante Antikörper nach, da hier eine komplementabhängige Zellschädigung direkt visualisiert werden kann (Bontadini 2012). Der LCT gilt daher als Goldstandard, wenn es um die Detektion donorspezifischer Anti-HLA-Antikörper im Rahmen einer Transplantation geht (Saito et al. 2014; Ozdemir et al. 2004; Gebel et al. 2003; Patel und Terasaki 1969; Harmer et al. 1997).

Die sichere klinische Relevanz der nachgewiesenen Antikörper gilt als wichtigster Vorteil des LCTs gegenüber anderen Nachweisverfahren. Trotzdem stellt sich die Frage, ob die Relevanz der Ergebnisse aus dem LCT eins zu eins auf Plättchen übertragen werden kann, da im LCT keine Thrombozyten, sondern Lymphozyten zum Einsatz kommen. Lymphozyten tragen mit ca. 250.000 HLA-Molekülen pro Zelle mehr als doppelt so viele HLA-Klasse-I-Moleküle wie Thrombozyten auf ihrer Oberfläche und zeigen im Gegensatz zu Thrombozyten keine interindividuellen Schwankungen in der Expressionsdichte (Parham et al. 1979; Lansdorp et al. 1982). Um eine komplementvermittelte Zytolyse auszulösen, wird eine Mindestdichte von gebundenem IgG auf der Zelloberfläche benötigt, damit der erste Faktor des Komplementsystems C1 daran binden kann und so die klassische Komplementkaskade einleitet (Weinstock und Schnaidt 2019). Es wäre also denkbar, dass im LCT grenzwertig positive Antikörper aufgrund der unterschiedlichen Expressionsdichte der beiden Zelltypen eventuell nicht dazu in der Lage wären, Thrombozyten zu zerstören. In diesem Fall wäre der LCT „zu sensitiv“ und es würden, ähnlich wie bei durchflusszytometrischen Verfahren, auch Antikörper ohne oder mit fraglicher Relevanz für die Fragestellung nachgewiesen. Allerdings sei an dieser Stelle anzumerken, dass die komplementvermittelte Zytolyse nicht der einzige Mechanismus ist, über den IgG-Antikörper Thrombozyten zerstören können. Die Opsonierung und anschließende Phagozytose durch Makrophagen spielt ebenfalls eine wichtige Rolle (Karparkin 1980; Zdravic et al. 2016).

Weiterhin wäre es möglich, dass die Konzentrationen einiger *relevanter* Antikörper unter der Nachweisschwelle für den LCT liegen, der LCT aufgrund seiner geringen Sensitivität also falsch negative Ergebnisse liefert. Hier müssen auch die stark schwankenden IgG-Spiegel im fetalen Serum während der Schwangerschaft bedacht werden. Während die fetale IgG-Konzentration zu Beginn der Schwangerschaft bei nur etwa 8 % der mütterlichen IgG-Konzentration liegt, steigt sie im Verlauf der Schwangerschaft immer weiter an und übersteigt die mütterliche Konzentration am Ende der Schwangerschaft sogar um ca. 30 % (Saji et al. 1999). Somit wäre es vorstellbar, dass ein Alloantikörper, der in geringen Konzentrationen keine klinisch relevante Komplementaktivierung induziert und im LCT nicht nachgewiesen werden kann, in hohen Konzentrationen beim Fetus gegen Ende der Schwangerschaft schließlich doch eine relevante Zytolyse verursacht. Gegen diese Hypothese spricht jedoch, dass Kinder mit FNAIT häufig schon in der 24. SSW und in manchen Fällen sogar schon vor der 20. SSW deutlich thrombozytopen sind (Bussel et al. 1997; Sachs 2013). Zu diesem Zeitpunkt beträgt die IgG-Konzentration des Feten erst etwa 10-20 % der Konzentration eines Erwachsenen (Saji et al. 1999).

Dahl et al. haben 2017 in einer Studie untersucht, ob feto-maternale HLA-Klasse-I-Mismatches eine FNAIT auslösen können. Dabei wurden die Anti-HLA-Antikörper nicht im LCT, sondern mittels Durchflusszytometrie am Luminex® nachgewiesen (Dahl et al. 2017). Da bei dieser Arbeit sehr viele Antikörper gefunden wurden, standen die Untersucher dieser Studie vor der großen Herausforderung, einen klinisch signifikanten Zusammenhang in den großen Datenmengen zu finden.

Die Entscheidung, bei dieser Studie den Antikörpernachweis mittels LCT durchzuführen, hatte neben den bereits erwähnten Vorteilen also auch den Zweck, nicht „den Blick fürs Wesentliche“ zu verlieren.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Diskussion der Statistischen Analyse

Aufgrund der kleinen Gruppengrößen mit $n=57$ bzw. $n=38$ kam bei allen statistischen Analysen der exakte Test nach Fisher zum Einsatz. Im Gegensatz zum χ^2 -Test bietet der exakte Fisher-Test den Vorteil, dass er auch bei kleinen Stichprobengrößen zuverlässige Ergebnisse liefert. Allerdings besitzt er eine niedrige Güte. Dies bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit einen Fehler zweiter Art zu begehen, also die Nullhypothese fälschlicherweise beizubehalten, größer ist, als beim χ^2 -Test (Falk et al. 2014).

Eine mögliche α -Fehler-Kumulierung, die durch multiples Testen entstehen kann, wurde nachträglich berücksichtigt, indem das Signifikanzniveau α mittels Bonferroni-Korrektur von ursprünglich 0,05 auf 0,000325 abgesenkt wurde. Allerdings gilt diese Methode ebenfalls als sehr konservativ, sodass Fehler zweiter Art auch hier entstehen können (Victor et al. 2010). Alle errechneten Ergebnisse waren jedoch sehr deutlich vom neuen Signifikanzniveau entfernt. Der niedrigste p-Wert ergab sich bei der Verteilung von maternalem HLA-DQB2 und lag bei 0,047. Dieser Wert ist um den Faktor 144 von dem durch die Bonferroni-Korrektur geforderten Signifikanzniveau entfernt. Daher erscheint ein fälschliches Beibehalten der Nullhypothese unwahrscheinlich.

4.2.2 Antikörperanalyse versus Epitopenanalyse

Antikörper sind nur gegen einen bestimmten Teil eines Antigens gerichtet. Diese Teile werden Epitope genannt und bestehen in der Regel aus vier bis zwölf Aminosäuren (Buus et al. 2012). Unterschiedliche Antigene können sehr ähnliche oder sogar identische Epitope aufweisen und dadurch Kreuzreaktionen auslösen. Solche Kreuzreaktionen sind unter anderem bei Anti-HLA-Antikörpern beschrieben (Rodey und Fuller 1987). Dies kann dazu führen, dass Patienten sich gegen Antigene immunisieren können, zu denen sie niemals Kontakt hatten. Dieses Phänomen muss bedacht werden, wenn Antikörper im mütterlichen Serum in antipaternal (bzw. antifetal) und nicht-antipaternal eingeteilt werden. Ein nachgewiesener Antikörper kann somit trotz vermeintlich nicht-antipaternaler Spezifität mit paternalen Antigenen kreuzreagieren.

Um Antikörper mit antipaternaler Spezifität besser identifizieren zu können, haben Dahl et al. in ihrer Arbeit nicht die eigentlichen Antikörper miteinander verglichen, sondern eine Epitopenanalyse mithilfe großer Onlinedatenbanken durchgeführt (Dahl et al. 2020). Dieses Vorgehen ist jedoch nicht unkritisch zu sehen, da es aufgrund der Vielzahl von Epitopen in einem einzigen HLA-Molekül sehr leicht ist die Übersicht zu verlieren. Dahl schreibt, dass „die meisten, wenn nicht alle“ nachgewiesenen Antikörper eine antipaternale Spezifität in der Epitopenanalyse aufweisen würden (Dahl, Jesper 2017). Diese Schlussfolgerung erscheint jedoch zumindest deshalb zweifelhaft, da es in dem vom Autor untersuchten Kollektiv mit hoher Wahrscheinlichkeit auch Frauen gab, die vor dieser Schwangerschaft bereits ein anderes Immunisierungsereignis hatten, wie beispielsweise eine Vorschwangerschaft oder eine Transfusion. Damit hätten zumindest diese Frauen die Möglichkeit gehabt sich auch gegen andere (nicht-paternale) Antigene zu immunisieren. Die Behauptung, dass *alle* nachgewiesenen Antikörper eine antipaternale Spezifität aufweisen, würde somit indirekt implizieren, dass das gesamte Studienkollektiv aus erstgebärenden, nicht-vortransfundierten und nicht-transplantierten Müttern bestand. Da dies aber mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht der Fall war, muss an dieser Stelle die Aussagekraft der Epitopenanalyse hinterfragt werden.

In unserer Untersuchung kam deshalb anstelle der Epitopenanalyse ein klassischer Vergleich der im LCT identifizierten Antikörper zum Einsatz. Da der LCT einen *funktionellen* Nachweis von Antikörpern erlaubt, indem er die komplementvermittelte Zytolyse optisch sichtbar macht, ist er auch in der Lage Kreuzreaktionen darzustellen. Ein Antikörper, der gegen ein bestimmtes HLA-Molekül gerichtet ist und mit einem anderen Antigen kreuzreagiert, würde im LCT mit allen Zellen, die das spezifische Epitop auf ihrer Oberfläche tragen, positive Reaktionen verursachen, sofern die Bindung stark genug ist, um eine Komplementaktivierung zu vermitteln. Damit ist der LCT zwar nicht in der Lage, zuverlässig zwischen der „ursprünglichen“ Spezifität und der Kreuzspezifität eines Antikörpers zu unterscheiden, dies ist jedoch für die Unterscheidung zwischen paternaler und nicht-paternaler Spezifität gar nicht notwendig. Die Antikörperbestimmung im LCT ist sehr gut geeignet um zu erkennen, ob im maternalen Serum Anti-HLA-Antikörper vorkommen, die dazu in der Lage sind an fetale HL-Antigene zu binden.

4.2.3 Verteilung der Geschlechter

Bei der Verteilung der Geschlechter zeigte sich, dass Jungen etwas häufiger von einer FNAIT betroffen sind als Mädchen. Obwohl in dieser Arbeit keine statistische Signifikanz gezeigt werden konnte ($p=0,67$), deckt sich diese Beobachtung mit Untersuchungen von Tiller et al., die zeigen konnten, dass männliche Neugeborene häufiger und durchschnittlich schwerer von einer FNAIT betroffen sind (Tiller et al. 2013; Tiller et al. 2012).

4.2.4 Verteilung der HLA-Allele

In der Verteilung der HLA-Allele konnte zunächst kein signifikanter Unterschied zwischen Verum- und Kontrollgruppe gezeigt werden. Dies gilt sowohl für den Vergleich kindlicher HLA-Klasse-I-Allele als auch für den Vergleich mütterlicher HLA-Klasse-II-Allele.

Auch nach der Verkleinerung der Verumgruppe, bei der alle Mutter-Kind-Paare ausgeschlossen wurden, bei denen im LCT kein Anti-HLA-Antikörper mit antifetaler Spezifität im Serum nachgewiesen werden konnte, zeigte sich kein signifikanter Unterschied beim Vergleich von fetalem HLA-Klasse-I. Es konnte jedoch ein knapp signifikantes Ergebnis für das maternale Allel HLA-DQB2 gezeigt werden, welches bei Müttern in der Verumgruppe häufiger vorkam als in der Kontrollgruppe ($p=0,047$). Dieses Ergebnis gilt nach Anwendung der Bonferroni-Korrektur jedoch nicht mehr als signifikant.

Um trotzdem keine Korrelationen zu übersehen, wurden im nächsten Schritt nur die eindeutig fetalen HLA-Klasse-I-Allele der HLA-DQB2-positiven Mütter in der Verum- und Kontrollgruppe miteinander verglichen. Falls nämlich HLA-DQB2 ein Risikofaktor für die Immunisierung gegen fetales HLA-Klasse-I wäre, sollte mit dieser Analyse untersucht werden, ob das Immunisierungsrisiko gegen bestimmte fetale Allele höher ist als gegen andere. So konnten zum Beispiel Wienzek-Lischka et al. zeigen, dass maternales HLA-DRB3*01:01 das Immunisierungsrisiko gegen fetales HPA-1a erhöht (Wienzek-Lischka et al. 2017). Analog wäre es also denkbar, dass HLA-DQB2 das Immunisierungsrisiko gegen ein bestimmtes fetales HLA-Klasse-I-Allel erhöht. Bei unserer Analyse konnte jedoch kein derartiges Phänomen gezeigt werden. An dieser

Stelle sei jedoch darauf hingewiesen, dass die untersuchte Stichprobengröße der HLA-DQB2-positiven Mütter mit 21 Müttern in der Verumgruppe und 9 Müttern in der Kontrollgruppe sehr klein war. Außerdem ist diese vermeintliche Häufung von HLA-DQB2 nach Bereinigung der α -Fehler-Kumulierung ohnehin nicht mehr signifikant, sodass von einem statistischen Phänomen ausgegangen werden kann.

4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse und Vergleich mit anderen Arbeiten

Im Rahmen dieser Studie konnten keine klinisch relevanten Ergebnisse in Bezug auf die Immunisierungswahrscheinlichkeit gegen fetale HLA-Klasse-I-Antigene bei FNAIT-Verdachtsfällen nachgewiesen werden. Ebenso konnten keine klinisch relevanten Zusammenhänge für das Immunisierungsrisiko beim Vorliegen bestimmter maternaler HLA-Klasse-II-Allele nachgewiesen werden. Somit konnte sowohl die Frage nach der Immunogenität bestimmter HLA-Klasse-I-Allele in der Schwangerschaft bei thrombozytopen Kindern als auch die Frage nach der Immunisierungswahrscheinlichkeit gegen HLA-Klasse-I bei Vorliegen von bestimmten maternalen HLA-Klasse-II-Allelen nicht geklärt werden.

Diese Ergebnisse decken sich mit der Arbeit von Dahl et. al. (Dahl et al. 2017). Auch dort konnte kein Epitop mit einer erhöhten Immunisierungswahrscheinlichkeit bei FNAIT-Verdachtsfällen gefunden werden (Dahl et al. 2017).

Refsum et al. haben untersucht, dass Anti-HLA-Antikörper bei Frauen mit thrombozytopen Kindern häufiger vorkommen als bei Frauen mit gesunden Kindern, konnten hierfür jedoch ebenfalls keine statistische Signifikanz zeigen (Refsum et al. 2017). Sie konnten aber beim Vergleich mit nicht schwangeren Blutspenderinnen eine signifikante Häufung von Anti-HLA-Antikörpern in der FNAIT-Verdachtsgruppe zeigen. Dieses Ergebnis beweist jedoch in erster Linie, dass schwangere Frauen häufiger Anti-HLA-Antikörper bilden als nicht-schwangere Frauen (in diesem Fall Blutspenderinnen) und muss nicht zwingend im Zusammenhang mit einer FNAIT stehen. Die von den Autoren nachgewiesenen Anti-HLA-Antikörper zeigten eine große Bandbreite an Spezifitäten und es konnten keine spezifischen Anti-HLA-Antikörper als Auslöser einer FNAIT identifiziert werden.

4.4 Ausblick

Obwohl in dieser Arbeit keine Risikoallele für die Bildung von Anti-HLA-Antikörpern bei FNAIT-Verdachtsfällen gefunden werden konnten und sich diese Ergebnisse mit anderen Arbeiten zu dem Thema decken, bleibt die Rolle von Anti-HLA-Antikörpern bei der Pathogenese der FNAIT unklar. Dies liegt vor allem an den vielen Fallberichten von Kindern mit FNAIT, bei denen im mütterlichen Serum nur Anti-HLA-Antikörper nachgewiesen werden konnten (Chow et al. 1992; Hutchinson et al. 2015; Sternbach et al. 1986; del Rosario et al. 1998; Sasaki et al. 2001; Gramatges et al. 2009; Starcevic et al. 2010; Meler et al. 2017; Moncharmont et al. 2004; Thude et al. 2006; Saito et al. 2003). Diese vielen Einzelfallberichte müssen jedoch nicht zwingend ein Hinweis auf eine Kausalität sein, sondern lassen sich eventuell damit erklären, dass bis zu 54,1 % aller Frauen während der Schwangerschaft Anti-HLA-Antikörper ausbilden (Masson et al. 2013; King et al. 1996; Morin-Papunen et al. 1984; Regan et al. 1991). Wenn Anti-HLA-Antikörper also in der Gesamtpopulation häufig sind, erscheint es nur logisch, dass diese Antikörper auch bei Frauen, deren Kinder eine FNAIT entwickeln, häufig vorkommen.

Nach aktuellem Kenntnisstand gelten nur Anti-HPA-1a-Antikörper als sicherer Auslöser für FNAIT. Auch die klinische Signifikanz von Anti-HPA-5b-Antikörpern, die in etwa 15 % aller FNAIT-Fälle im mütterlichen Serum nachgewiesen werden können und deshalb teilweise als zweithäufigster Auslöser der FNAIT beschrieben werden, wird kontrovers diskutiert (Vos et al. 2021; Curtis 2021; Regan et al. 2019). Alm et al. konnten in einer Metaanalyse zeigen, dass der Zusammenhang von Anti-HPA-5b-Antikörpern und dem Auftreten einer FNAIT womöglich eher auf zufälliger Korrelation, als auf Kausalität beruht (Alm et al. 2022).

Um die Frage nach der Rolle von Anti-HLA-Antikörpern bei der Entstehung der FNAIT endgültig zu klären, wäre eine groß angelegte prospektive Studie hilfreich. Für eine solche Studie wäre es notwendig, dass mütterliches Serum während der Schwangerschaft auf Anti-HLA-Antikörper untersucht wird und nach der Geburt eine HLA-Klasse-I-Genotypisierung des Kindes stattfindet. Eine Bestimmung des Antikörpertiters, sowie der fetalen Thrombozytenzahl wäre ebenfalls interessant, um mögliche Korrelationen zwischen Titer und Plättchenzahlen festzustellen.

5 Zusammenfassung

Die fetale/neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT) ist eine seltene Krankheit, bei der die Mutter IgG-Antikörper gegen kindliche Thrombozyten bildet. Ausgelöst wird die FNAIT hauptsächlich durch die Immunisierung der Mutter gegen väterliche Humane Plättchenantigene (HPA). In etwa 5 % der Fälle können jedoch keine Antikörper gegen HPA im mütterlichen Serum nachgewiesen werden. Obwohl es vereinzelte Fallberichte von FNAIT-Patienten gibt, bei denen serologisch nur Anti-HLA-Antikörper nachgewiesen werden konnten, wird ihre Rolle bei der Entstehung einer FNAIT kontrovers diskutiert.

Es wurden Reste klinischer Proben von FNAIT-Verdachtsfällen aus den Jahren 2002 bis 2016 untersucht, bei denen das Neugeborene bei Geburt weniger als 100 G/L Thrombozyten hatte. Das Vorliegen von Anti-HPA-Antikörpern wurde im indirekten MAIPA ausgeschlossen. Zusätzlich wurde auf das Vorhandensein von Anti-HLA-Antikörpern getestet. Anhand des Ergebnisses erfolgte die Zuordnung zu den jeweiligen Gruppen. Es wurden 57 Mutter-Kind-Paare in der Verumgruppe und 38 Mutter-Kind-Paare in der Kontrollgruppe untersucht. Im Labor wurden die Kinder beider Gruppen mittels SSO-Methode für HLA-Klasse-I und die Mütter für HLA-Klasse-I und II typisiert. Zusätzlich wurden die Spezifitäten der mütterlichen Anti-HLA-Antikörper der Verumgruppe im LCT untersucht.

Anschließend wurden die Häufigkeiten der jeweiligen HLA-Allele von Müttern und Kindern beider Gruppen miteinander verglichen. Dabei zeigten sich keine statistisch signifikanten Auffälligkeiten. Danach wurde die Verumgruppe in zwei Untergruppen unterteilt, je nachdem ob die im LCT nachgewiesenen Antikörper gegen fetales HLA gerichtet waren (41 Mütter) oder nicht (13 Mütter; bei drei Müttern konnte kein LCT durchgeführt werden). Beim Vergleich der antifetal-positiven Gruppe mit der Kontrollgruppe zeigte sich, dass HLA-DQB2 in der ersten Gruppe signifikant häufiger auftrat ($p = 0,0467$). Daher wurden erneute Untergruppen gebildet, bestehend aus den Mutter-Kind-Paaren mit HLA-DQB2-positiven Müttern. Diese Gruppen umfassten jeweils 21 bzw. 9 Mutter-Kind-Paare. Die Gruppen wurden nun ebenfalls gegeneinander getestet und auf Unterschiede bei der Häufigkeit von paternal vererbtem HLA-Klasse-I untersucht. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der statistischen Analyse weitestgehend nicht signifikant waren.

Somit ließ sich bei der untersuchten Stichprobe kein Zusammenhang zwischen HLA-Antikörpern und der neonatalen Alloimmunthrombozytopenie nachweisen.

6 Summary

Neonatal alloimmune thrombocytopenia (FNAIT) is a rare disease in which the mother forms IgG antibodies against the fetus' platelets. FNAIT is primarily triggered by the mother's immunization against paternal human platelet antigens (HPA). In around 5% of cases, however, no antibodies against HPA can be found in the mother's serum. Although there are occasional case reports of FNAIT patients in whom only anti-HLA antibodies could be detected serologically, their role in causing FNAIT is discussed controversially.

For this study residues from clinical samples of suspected FNAIT cases from 2002 to 2016 were analyzed, in which the newborn had less than 100 G/L platelets at birth and no anti-HPA antibodies could be detected in the indirect MAIPA. In addition, the presence of anti-HLA antibodies was tested. The results were used to assign the patients to the respective groups. A total of 57 mother-child pairs in the verum group and 38 mother-child pairs in the control group were identified. In the laboratory, the children of both groups were typed for HLA class I using sequence-specific oligonucleotides (SSO). Afterwards, the mothers of both groups were typed for HLA class I and II using SSOs. In addition, the sera of the mothers from the verum group were analyzed for the presence of anti-HLA antibodies in the lymphocytotoxic test (LCT).

After that, the frequencies of the respective HLA alleles of mothers and children were compared between the two groups. No statistically significant abnormalities were found. The verum group was then divided into two subgroups, depending on whether the antibodies detected in the LCT were directed against fetal HLA (41 mothers) or not (13 mothers). A comparison of the antipaternal-positive group with the control group showed that HLA-DQB2 occurred significantly more frequently in the first group ($p = 0.0467$). To investigate this in more detail, new subgroups were formed, consisting of the mother-child pairs with HLA-DQB2 positive mothers. These groups comprised 21 and 9 mother-child pairs respectively. The groups were also tested against each other and examined for differences in the frequency of paternally inherited HLA class I. No significant differences were found between the two groups. In summary, it can be said that the results of the statistical analysis were largely non-significant.

Thus, no correlation between HLA antibodies and neonatal alloimmune thrombocytopenia could be found in the examined sample.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
ASHI	American Society for Histocompatibility and Immunogenetics
CD	Cluster of Differentiation
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleic acid
DTT	Dithiotretiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay
engl.	englisch
et al.	et alii
Fc	fragment crystallisable
FcRn	neonataler Fc-Rezeptor
FNAIT	Fetale/Neonatale Alloimmunthrombozytopenie
G	Giga (10 ⁹)
HDFN	hemolytic disease of the fetus and newborn
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HPA	Humanes Plättchen-Antigen
ICH	intracranial hemorrhage (Intrakranielle Blutung)
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IVIG	intravenöse Immunglobuline
L	Liter
LCT	Lymphocytotoxic test
LIS	Laborinformationssystem
MAIPA	monoklonale antikörperspezifische Immobilisierung von Plättchenantigenen
max.	maximal
MHC	Major Histocompatibility Complex
MHN	Morbus Haemolyticus Neonatorum
min	Minuten
ml	Milliliter
NAN	Neonatale Alloimmunneutropenie
ng	Nanogramm
NGS	Next Generation Sequenzing
NIPD	nicht-invasive Pränataldiagnostik
p.a.	pro analysi
PCR	Polymerase chain reaction

RhD	Rhesus D
rpm	revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (<i>Zellkulturmedium</i>)
s	Sekunden
SAPE	Streptavidin-konjugiertes R-Phycoerythrin
sog.	sogenannt
SSO	Sequenzspezifische Oligonukleotide
SSW	Schwangerschaftswoche
Taq-Polymerase	thermostabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium <i>Thermus aquaticus</i>
UKGM	Uniklinikum Gießen und Marburg
V.a.	Verdacht auf
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pyramidenmodell der FNAIT	4
Abbildung 2: Entscheidungsbaum zur antenatalen Behandlung der FNAIT	6
Abbildung 3: Entscheidungsbaum zur postnatalen Behandlung der FNAIT	8
Abbildung 4: Schematische Darstellung einer hybridisierten Mikrosphäre	26
Abbildung 5: Reaktionsbild unter dem Fluoreszenzmikroskop	29
Abbildung 6: Geschlechterverteilung in der Verum- und Kontrollgruppe	32
Abbildung 7: Thrombozytenzahlen in der Verumgruppe	32
Abbildung 8: Thrombozytenzahlen in der Kontrollgruppe	33
Abbildung 9: Verteilung der HLA-A-Allele (Kinder)	34
Abbildung 10: Verteilung der HLA-B-Allele (Kinder)	35
Abbildung 11: Verteilung der HLA-A-Allele (Mütter)	36
Abbildung 12: Verteilung der HLA-B-Allele (Mütter)	36
Abbildung 13: Verteilung der HLA-DRB-Allele (Mütter)	37
Abbildung 14: Verteilung der HLA-DQA-Allele (Mütter)	38
Abbildung 15: Verteilung der HLA-DQB-Allele (Mütter)	38
Abbildung 16: Unterteilung der Verumgruppe	41
Abbildung 17: Verteilung der HLA-A-Allele (paternal vererbt)	43
Abbildung 18: Verteilung der HLA-B-Allele (paternal vererbt)	44
Abbildung 19: Verteilung der HLA-DRB-Allele (Mütter)	45
Abbildung 20: Verteilung der HLA-DQA-Allele (Mütter)	45
Abbildung 21: Verteilung der HLA-DQB-Allele (Mütter)	46
Abbildung 22: Verteilung der paternal vererbten HLA-A-Allele (Kinder mit HLA-DQB2+ Müttern)	47
Abbildung 23: Verteilung der paternal vererbten HLA-B-Allele (Kinder mit HLA-DQB2+ Müttern)	48

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ausschlusskriterien	14
Tabelle 2: verwendete Reagenzien und Materialien	16
Tabelle 3: verwendete Geräte	18
Tabelle 4: PCR-Ansatz zur HLA-Typisierung	21
Tabelle 5: PCR-Programm	22
Tabelle 6: Auswertung des lymphozytotoxischen Tests	30
Tabelle 7: Zusammenfassung der Geschlechterverteilung und Thrombozytenwerte	33
Tabelle 8: Verteilung der fetusspezifischen HLA-A-Antikörper	39
Tabelle 9: Verteilung der fetusspezifischen HLA-B-Antikörper	40

10 Literaturverzeichnis

- ACOG practice bulletin Thrombocytopenia in pregnancy (1999). In: *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 67 (2), S. 117–128.
- Alarcon, Pedro de; Werner, Eric; Christensen, Robert D. (Hg.) (2012): Neonatal Hematology. Cambridge: Cambridge University Press.
- Allen, David; Verjee, Salim; Rees, Sarah; Murphy, Michael F.; Roberts, David J. (2007): Platelet transfusion in neonatal alloimmune thrombocytopenia. In: *Blood* 109 (1), S. 388–389. DOI: 10.1182/blood-2006-05-026419.
- 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.
- Arnold, Donald M.; Smith, James W.; Kelton, John G. (2008): Diagnosis and management of neonatal alloimmune thrombocytopenia. In: *Transfusion medicine reviews* 22 (4), S. 255–267. DOI: 10.1016/j.tmr.2008.05.003.
- Bianchi, Diana W. (2007): Robert E. Gross Lecture. Fetomaternal cell trafficking: a story that begins with prenatal diagnosis and may end with stem cell therapy. In: *Journal of pediatric surgery* 42 (1), S. 12–18. DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2006.09.047.
- Bonstein, Lilach; Atweh, Nardeen; Haddad, Nuhad; Fruchtman, Yariv (2015): Anti-HLA Antibodies in Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia - Is There Any Clinical Significance? In: *Blood* 126 (23), S. 4647. DOI: 10.1182/blood.V126.23.4647.4647.
- Bontadini, Andrea (2012): HLA techniques: typing and antibody detection in the laboratory of immunogenetics. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 56 (4), S. 471–476. DOI: 10.1016/j.ymeth.2012.03.025.
- Bussel, J. B.; Zabusky, M. R.; Berkowitz, R. L.; McFarland, J. G. (1997): Fetal alloimmune thrombocytopenia. In: *The New England journal of medicine* 337 (1), S. 22–26. DOI: 10.1056/NEJM199707033370104.
- Bussel, James B.; Berkowitz, Richard L.; Lynch, Lauren; Lesser, Martin L.; Paidas, Michael J.; Huang, Carol L.; McFarland, Janice G. (1996): Antenatal management of alloimmune thrombocytopenia with intravenous γ -globulin: A randomized trial of the addition of low-dose steroid to intravenous γ -globulin. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 174 (5), S. 1414–1423. DOI: 10.1016/s0002-9378(96)70582-3.
- Bussel, James B.; Javed, M. Jawad (2012): Fetal and neonatal immune thrombocytopenia. In: Pedro de Alarcon, Eric Werner und Robert D. Christensen (Hg.): Neonatal Hematology. Cambridge: Cambridge University Press, S. 141–156.
- Bussel, James B.; McFarland, Janice G.; Berkowitz, Richard L. (1990): Antenatal Management of Fetal Alloimmune and Autoimmune Thrombocytopenia. In: *Transfusion medicine reviews* 4 (2), S. 149–162. DOI: 10.1016/s0887-7963(90)70260-x.

- Bussel, James B.; Vander Haar, Emilie L.; Berkowitz, Richard L. (2021): New developments in fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 225 (2), S. 120–127. DOI: 10.1016/j.ajog.2021.04.211.
- Buus, Søren; Rockberg, Johan; Forsström, Björn; Nilsson, Peter; Uhlen, Mathias; Schafer-Nielsen, Claus (2012): High-resolution mapping of linear antibody epitopes using ultrahigh-density peptide microarrays. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP* 11 (12), S. 1790–1800. DOI: 10.1074/mcp.M112.020800.
- Chen, Pingguo; Li, Conglei; Lang, Sean; Zhu, Guangheng; Reheman, Adili; Spring, Christopher M. et al. (2010): Animal model of fetal and neonatal immune thrombocytopenia: role of neonatal Fc receptor in the pathogenesis and therapy. In: *Blood* 116 (18), S. 3660–3668. DOI: 10.1182/blood-2010-05-284919.
- Chow, M. P.; Sun, K. J.; Yung, C. H.; Hu, H. Y.; Tzeng, J. L.; Lee, T. D. (1992): Neonatal alloimmune thrombocytopenia due to HLA-A2 antibody. In: *Acta haematologica* 87 (3), S. 153–155. DOI: 10.1159/000204744.
- Cid, Joan; Magnano, Laura; Acosta, Maria; Alba, Cristina; Esteve, Jordi; Lozano, Miguel (2015): Rituximab, plasma exchange and intravenous immunoglobulins as a new treatment strategy for severe HLA alloimmune platelet refractoriness. In: *Platelets* 26 (2), S. 190–194. DOI: 10.3109/09537104.2014.895922.
- Colombani, J.; D'Amaro, J.; Gabb, B.; Smith, G.; Svejgaard, A. (1971): International agreement on a microtechnique of platelet complement fixation (Pl. C fix.). In: *Transplantation proceedings* 3 (1), S. 121–126.
- Curtis, Brian R. (2021): Are HPA-5b antibodies a significant cause of FNAIT and associated bleeding or merely an incidental finding? In: *British journal of haematology* 195 (4), S. 485–486. DOI: 10.1111/bjh.17763.
- Dahl, Jesper (2017): Maternal Anti-HLA Class I Antibodies in Connection with Pregnancy and Neonatal Thrombocytopenia – A Cause for Concern? Clinical Characteristics and Antibody Analysis of Retrospective and Prospective Populations.
- Dahl, Jesper; Refsum, Erle; Ahlen, Maria Therese; Egeland, Torstein; Jensen, Tore; Viken, Marte K. et al. (2017): Unraveling the role of maternal anti-HLA class I antibodies in fetal and neonatal thrombocytopenia-Antibody specificity analysis using epitope data. In: *Journal of Reproductive Immunology* 122, S. 1–9. DOI: 10.1016/j.jri.2017.06.003.
- Dahl, Jesper; Skogen, Bjørn; Kjaer, Mette; Husebekk, Anne; Kjeldsen-Kragh, Jens; Tiller, Heidi (2020): A combined effect of anti-HPA-1a and anti-HLA Class I in pregnancy? In: *Transfusion* 60 (9), S. 2121–2129. DOI: 10.1111/trf.15944.
- Datema, G.; Stein, S.; Eijssink, C.; Mulder, A.; Claas, F. H.; Doxiadis, I. I. (2000): HLA-C expression on platelets: studies with an HLA-Cw1-specific human monoclonal antibody. In: *Vox sanguinis* 79 (2), S. 108–111. DOI: 10.1159/000031221.
- Davoren, Anne; Curtis, Brian R.; Aster, Richard H.; McFarland, Janice G. (2004): Human platelet antigen-specific alloantibodies implicated in 1162 cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia. In: *Transfusion* 44 (8), S. 1220–1225. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2004.04026.x.

- Davoren, Anne; McParland, Peter; Crowley, John; Barnes, Anthony; Kelly, Gabrielle; Murphy, William G. (2003): Antenatal screening for human platelet antigen-1a: results of a prospective study at a large maternity hospital in Ireland. In: *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 110 (5), S. 492–496.
- del Rosario, M. L.; Fox, E. R.; Kickler, T. S.; Kao, K. J. (1998): Neonatal alloimmune thrombocytopenia associated with maternal anti-HLA antibody: a case report. In: *Journal of pediatric hematology/oncology* 20 (3), S. 252–256. DOI: 10.1097/00043426-199805000-00012.
- Dunckley, Heather (2012): HLA typing by SSO and SSP methods. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 882, S. 9–25. DOI: 10.1007/978-1-61779-842-9_2.
- Duquesnoy, R. J.; Filip, D. J.; Tomasulo, P. A.; Aster, R. H. (1977): Role of HLA-C matching in histocompatible platelet transfusion therapy of alloimmunized thrombocytopenic patients. In: *Transplantation proceedings* 9 (4), S. 1827–1828.
- EMBL-EBI (2024): IPD-IMGT/HLA Database. Online verfügbar unter <https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/about/statistics/>, zuletzt geprüft am 06.02.2024.
- Espinoza, J. P.; Caradeux, J.; Norwitz, Errol R.; Illanes, S. E. (2013): Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. In: *Reviews in obstetrics & gynecology* 6 (1), e15-21.
- Falk, Michael.; Hain, Johannes.; Marohn, Frank.; Fischer, Hans.; Michel, René. (2014): Statistik in Theorie und Praxis. Mit Anwendungen in R. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; Imprint; Springer Spektrum (Mathematik für das Lehramt).
- Flajnik, Martin F.; Kasahara, Masanori (2001): Comparative Genomics of the MHC. In: *Immunity* 15 (3), S. 351–362. DOI: 10.1016/S1074-7613(01)00198-4.
- Gadner, Helmut (Hg.) (2006): Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. Heidelberg: Springer Medizin (SpringerLink Bücher).
- Gebel, Howard M.; Bray, Robert A.; Nickerson, Peter (2003): Pre-transplant assessment of donor-reactive, HLA-specific antibodies in renal transplantation: contraindication vs. risk. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 3 (12), S. 1488–1500. DOI: 10.1046/j.1600-6135.2003.00273.x.
- Ghevaert, Cedric; Campbell, Kate; Walton, Jill; Smith, Graham A.; Allen, Dave; Williamson, Lorna M. et al. (2007): Management and outcome of 200 cases of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia. In: *Transfusion* 47 (5), S. 901–910. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2007.01208.x.
- Gorer, Peter Alfred; Lyman, S.; Snell, G. D.; Haldane, John Burdon Sanderson (1948): Studies on the genetic and antigenic basis of tumour transplantation Linkage between a histocompatibility gene and 'fused' in mice. In: *Proc. R. Soc. B.* 135 (881), S. 499–505. DOI: 10.1098/rspb.1948.0026.
- Gramatges, M. Monica; Fani, Pauline; Nadeau, Kari; Pereira, Shalini; Jeng, Michael R. (2009): Neonatal alloimmune thrombocytopenia and neutropenia associated with maternal human leukocyte antigen antibodies. In: *Pediatric blood & cancer* 53 (1), S. 97–99. DOI: 10.1002/pbc.21979.

- Guleria, Indira; Sayegh, Mohamed H. (2007): Maternal acceptance of the fetus: true human tolerance. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 178 (6), S. 3345–3351. DOI: 10.4049/jimmunol.178.6.3345.
- Gunnink, Suzanne F.; Vlug, Roos; Fijnvandraat, Karin; van der Bom, Johanna G.; Stanworth, Simon J.; Lopriore, Enrico (2014): Neonatal thrombocytopenia: etiology, management and outcome. In: *Expert review of hematology* 7 (3), S. 387–395. DOI: 10.1586/17474086.2014.902301.
- Harmer, A. W.; Heads, A. J.; Vaughn, R. W. (1997): Detection of HLA class I- and class II-specific antibodies by flow cytometry and PRA-STAT screening in renal transplant recipients. In: *Transplantation* 63 (12), S. 1828–1832. DOI: 10.1097/00007890-199706270-00021.
- Hutchinson, Anna L.; Dennington, Peta M.; Holdsworth, Rhonda; Downe, Lyn (2015): Recurrent HLA-B56 mediated neonatal alloimmune thrombocytopenia with fatal outcomes. In: *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis* 52 (3), S. 311–313. DOI: 10.1016/j.transci.2015.01.007.
- Janeway, Charles; Murphy K.; Travers P.; Walport M. (2008): *Janeway's Immunobiology*. Seventh Edition, London and New York: Garland Science.
- Janson, Marleen; McFarland, Janice G.; Aster, Richard H. (1986): Quantitative determination of platelet surface alloantigens using a monoclonal probe. In: *Human immunology* 15 (3), S. 251–262. DOI: 10.1016/0198-8859(86)90001-7.
- Kamphuis, Marije M.; Paridaans, N.; Porcelijn, Leendert; Haas, Masja de; van der Schoot, C. Ellen; Brand, A. et al. (2010): Screening in pregnancy for fetal or neonatal alloimmune thrombocytopenia: systematic review. In: *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 117 (11), S. 1335–1343. DOI: 10.1111/j.1471-0528.2010.02657.x.
- Kao, K. J.; Cook, D. J.; Scornik, J. C. (1986): Quantitative analysis of platelet surface HLA by W6/32 anti-HLA monoclonal antibody. In: *Blood* 68 (3), S. 627–632.
- Kaplan, Cécile (2001): Immune thrombocytopenia in the foetus and the newborn: diagnosis and therapy. In: *Transfusion Clinique et Biologique* 8 (3), S. 311–314. DOI: 10.1016/S1246-7820(01)00114-8.
- Kaplan, Cécile (2006): Foetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. In: *Orphanet journal of rare diseases* 1, S. 39. DOI: 10.1186/1750-1172-1-39.
- Kaplan, Cécile; Daffos, F.; Forestier, F.; Morel-Kopp, M. C.; Tchernia, G. (1994): Management of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. In: *Vox sanguinis* 67 Suppl 3, S. 85–88. DOI: 10.1111/j.1423-0410.1994.tb04550.x.
- Karpatkin, S. (1980): Autoimmune thrombocytopenic purpura. In: *Blood* 56 (3), S. 329–343.
- Kazatchkine, M. D.; Kaveri, S. V. (2001): Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin. In: *The New England journal of medicine* 345 (10), S. 747–755. DOI: 10.1056/NEJMra993360.

- Kiefel, Volker; Bassler, Dirk; Kroll, Hartmut; Paes, Bosco; Giers, Günter; Ditomasso, Juliana et al. (2006): Antigen-positive platelet transfusion in neonatal alloimmune thrombocytopenia (NAIT). In: *Blood* 107 (9), S. 3761–3763. DOI: 10.1182/blood-2005-06-2235.
- King, K. E.; Kao, K. J.; Bray, P. F.; Casella, J. F.; Blakemore, K.; Callan, N. A. et al. (1996): The role of HLA antibodies in neonatal thrombocytopenia: a prospective study. In: *Tissue antigens* 47 (3), S. 206–211. DOI: 10.1111/j.1399-0039.1996.tb02542.x.
- Kjeldsen-Kragh, Jens; Killie, Mette Kjaer; Tomter, Geir; Golebiowska, Elzbieta; Randen, Ingrid; Hauge, Reidun et al. (2007): A screening and intervention program aimed to reduce mortality and serious morbidity associated with severe neonatal alloimmune thrombocytopenia. In: *Blood* 110 (3), S. 833–839. DOI: 10.1182/blood-2006-08-040121.
- Kroll, Hartmut; Bein, Gregor (1999): Neonatale Autoimmunthrombozytopenie. In: *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)* 124 (47), S. 1435–1436.
- Lansdorp, P. M.; Oosterhof, F.; Astaldi, G. C.; Zeijlemaker, W. P. (1982): Detection of HLA antigens on blood platelets and lymphocytes by means of monoclonal antibodies in an ELISA technique. In: *Tissue antigens* 19 (1), S. 11–19. DOI: 10.1111/j.1399-0039.1982.tb01411.x.
- Lieberman, Lani; Greinacher, Andreas; Murphy, Michael F.; Bussel, James B.; Bakchoul, Tamam; Corke, Stacy et al. (2019): Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia: recommendations for evidence-based practice, an international approach. In: *British journal of haematology* 185 (3), S. 549–562. DOI: 10.1111/bjh.15813.
- Lynch, Lauren; Bussel, James B.; McFarland, Janice G.; Chitkara, U.; Berkowitz, R. L. (1992): Antenatal treatment of alloimmune thrombocytopenia. In: *Obstetrics and gynecology* 80 (1), S. 67–71.
- Masson, Emeline; Vidal, Chrystelle; Deschamps, Marina; Bongain, Severine; Thevenin, Chantal; Dupont, Isabelle et al. (2013): Incidence and risk factors of anti-HLA immunization after pregnancy. In: *Human immunology* 74 (8), S. 946–951. DOI: 10.1016/j.humimm.2013.04.025.
- Mehra, Narinder K.; Kaur, Gurvinder; McCluskey, James; Christiansen, Frank T.; Claas, F. H. J. (2010): The HLA complex in biology and medicine. A resource book. 1st ed. New Delhi: Jaypee Bros. Medical Publishers.
- Meler, Eva; Porta, Roser; Canals, Carme; Serra, Bernat; Lozano, Miguel (2017): Fatal alloimmune thrombocytopenia due to anti-HLA alloimmunization in a twin pregnancy: A very infrequent complication of assisted reproduction. In: *Transfusion and apheresis science : official journal of the World Apheresis Association : official journal of the European Society for Haemapheresis* 56 (2), S. 165–167. DOI: 10.1016/j.transci.2016.10.021.
- Monchamont, P.; Dubois, V.; Obegi, C.; Vignal, M.; Mérieux, Y.; Gebuhrer, L.; Rigal, D. (2004): HLA antibodies and neonatal alloimmune thrombocytopenia. In: *Acta haematologica* 111 (4), S. 215–220. DOI: 10.1159/000077569.

- Morin-Papunen, L.; Tiilikainen, A.; Hartikainen-Sorri, A. L. (1984): Maternal HLA immunization during pregnancy: presence of anti HLA antibodies in half of multigravidous women. In: *Medical biology* 62 (6), S. 323–325.
- Mueller-Eckhardt, Christian (1988): Alloantigene von Thrombozyten. In: Christian Mueller-Eckhardt (Hg.): *Transfusionsmedizin*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 163–172.
- Mueller-Eckhardt, Christian; Grubert, Alfons; Weisheit, Marianne; Mueller-Eckhardt, Gertrud; Kiefel, Volker; Kroll, Hartmut et al. (1989a): 348 CASES OF SUSPECTED NEONATAL ALLOIMMUNE THROMBOCYTOPENIA. In: *The Lancet* 333 (8634), S. 363–366. DOI: 10.1016/s0140-6736(89)91733-9.
- Mueller-Eckhardt, Christian; Kiefel, Volker; Grubert, A. (1989b): High-dose IgG treatment for neonatal alloimmune thrombocytopenia. In: *Blut* 59 (1), S. 145–146. DOI: 10.1007/BF00320268.
- Mueller-Eckhardt, Christian; Mueller-Eckhardt, Gertrud; Willen-Ohff, H.; Horz, A.; Küenzlen, E.; O'Neill, G. J.; Schendel, D. J. (1985): Immunogenicity of and immune response to the human platelet antigen Zwa is strongly associated with HLA-B8 and DR3. In: *Tissue antigens* 26 (1), S. 71–76. DOI: 10.1111/j.1399-0039.1985.tb00936.x.
- Mueller-Eckhardt, Gertrud; Hauck, Margit; Kayser, Winfried; Mueller-Eckhardt, Christian (1980): HLA-C Antigens on Platelets¹. In: *Tissue antigens* 16 (1), S. 91–94. DOI: 10.1111/j.1399-0039.1980.tb00291.x.
- Muller, J. Y.; Reznikoff-Etievant, M. F.; Patereau, C.; Dangu, C.; Chesnel, N. (1985): Thrombopénies néo-natales allo-immunes. Etude clinique et biologique de 84 cas. In: *Presse medicale (Paris, France : 1983)* 14 (2), S. 83–86.
- Murphy, Michael F.; Verjee, Salim; Greaves, M. (1999): Inadequacies in the postnatal management of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia (FMAIT). In: *British journal of haematology* 105 (1), S. 123–126.
- Murphy, Michael F.; Waters, A. H.; Doughty, H. A.; Hambley, H.; Mibashan, R. S.; Nicolaides, K.; Rodeck, C. H. (1994): Antenatal management of fetomaternal alloimmune thrombocytopenia--report of 15 affected pregnancies. In: *Transfusion medicine (Oxford, England)* 4 (4), S. 281–292. DOI: 10.1111/j.1365-3148.1994.tb00265.x.
- Omwandho, Charles O. A.; Gruessner, Susanne E. M.; Roberts, Timothy K.; Tinneberg, Hans Rudolf (2004): Intravenous immunoglobulin (IVIG): modes of action in the clinical management of recurrent pregnancy loss (RPL) and selected autoimmune disorders. In: *Clinical chemistry and laboratory medicine* 42 (4), S. 359–370. DOI: 10.1515/CCLM.2004.065.
- Ouwehand, Willem H.; Smith, G.; Ranasinghe, E. (2000): Management of severe alloimmune thrombocytopenia in the newborn. In: *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition* 82 (3), F173-5. DOI: 10.1136/fn.82.3.F173.

- Overton, Timothy G.; Duncan, Keith R.; Jolly, Matthew; Letsky, Elizabeth; Fisk, Nicholas M. (2002): Serial aggressive platelet transfusion for fetal alloimmune thrombocytopenia: platelet dynamics and perinatal outcome. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 186 (4), S. 826–831. DOI: 10.1067/mob.2002.122140.
- Ozdemir, Fatma Nurhan; Sezer, Siren; Akcay, Ali; Arat, Zubeyde; Turan, Munire; Gulmus, Sale et al. (2004): Panel reactive antibody positivity and associated HLA antibodies in Turkish renal transplant candidates. In: *Transplant immunology* 12 (2), S. 185–188. DOI: 10.1016/j.trim.2003.11.003.
- Paidas, Michael J.; Berkowitz, Richard L.; Lynch, Lauren; Lockwood, Charles J.; Lapinski, Robert; McFarland, Janice G.; Bussel, James B. (1995): Alloimmune thrombocytopenia: Fetal and neonatal losses related to cordocentesis. In: *American journal of obstetrics and gynecology* 172 (2), S. 475–479. DOI: 10.1016/0002-9378(95)90559-6.
- Parham, Peter (2009): *The Immune System*. Third Edition, London and New York: Garland Science.
- Parham, Peter; Barnstable, C. J.; Bodmer, W. F. (1979): Use of a monoclonal antibody (W6/32) in structural studies of HLA-A,B,C, antigens. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 123 (1), S. 342–349.
- Patel, R.; Terasaki, P. I. (1969): Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. In: *The New England journal of medicine* 280 (14), S. 735–739. DOI: 10.1056/NEJM196904032801401.
- Refsum, E.; Mörtberg, A.; Dahl, J.; Meinke, S.; Auvinen, M-K; Westgren, M. et al. (2017): Characterisation of maternal human leukocyte antigen class I antibodies in suspected foetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. In: *Transfusion medicine (Oxford, England)* 27 (1), S. 43–51. DOI: 10.1111/tme.12375.
- Regan, F.; Lees, C. C.; Jones, B.; Nicolaides, K. H.; Wimalasundera, R. C.; Mijovic, A. (2019): Prenatal Management of Pregnancies at Risk of Fetal Neonatal Alloimmune Thrombocytopenia (FNAIT): Scientific Impact Paper No. 61. In: *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology* 126 (10), e173-e185. DOI: 10.1111/1471-0528.15642.
- Regan, L.; Braude, P. R.; Hill, D. P. (1991): A prospective study of the incidence, time of appearance and significance of anti-paternal lymphocytotoxic antibodies in human pregnancy. In: *Human reproduction (Oxford, England)* 6 (2), S. 294–298. DOI: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a137325.
- Roberts, Irene; Stanworth, Simon; Murray, Neil A. (2008): Thrombocytopenia in the neonate. In: *Blood reviews* 22 (4), S. 173–186. DOI: 10.1016/j.blre.2008.03.004.
- Rodey, G. E.; Fuller, T. C. (1987): Public epitopes and the antigenic structure of the HLA molecules. In: *Critical reviews in immunology* 7 (3), S. 229–267.
- Sachs, Ulrich J. (2013): Fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia. In: *Thrombosis Research* 131, S42-S46. DOI: 10.1016/S0049-3848(13)70020-3.

Sachs, Ulrich J.; Wienzek-Lischka, Sandra; Duong, Yalin; Qiu, Dan; Hinrichs, Wilko; Cooper, Nina et al. (2020): Maternal antibodies against paternal class I human leukocyte antigens are not associated with foetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. In: *British journal of haematology* 189 (4), S. 751–759. DOI: 10.1111/bjh.16419.

Saito, Patrícia Keiko; Yamakawa, Roger Haruki; Da Pereira, Lucieni Christina Marques Silva; Da Silva, Waldir Veríssimo; Borelli, Sueli Donizete (2014): Complement-dependent cytotoxicity (CDC) to detect Anti-HLA antibodies: old but gold. In: *Journal of clinical laboratory analysis* 28 (4), S. 275–280. DOI: 10.1002/jcla.21678.

Saito, Satoshi; Ota, Masao; Komatsu, Yumi; Ota, Satoshi; Aoki, Shigeru; Koike, Kenichi et al. (2003): Serologic analysis of three cases of neonatal alloimmune thrombocytopenia associated with HLA antibodies. In: *Transfusion* 43 (7), S. 908–917. DOI: 10.1046/j.1537-2995.2003.00429.x.

Saji, F.; Samejima, Y.; Kamiura, S.; Koyama, M. (1999): Dynamics of immunoglobulins at the feto-maternal interface. In: *Reviews of reproduction* 4 (2), S. 81–89. DOI: 10.1530/ror.0.0040081.

Santoso S, Mueller-Eckhardt G, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. HLA antigens on platelet membranes. In vitro and in vivo studies. *Vox Sang.* 1986;51(4):327-33. doi: 10.1111/j.1423-0410.1986.tb01979.x. DOI: 10.1111/j.1423-0410.1986.tb01979.x

Sasaki, M.; Yagihashi, A.; Kobayashi, D.; Watanabe, N.; Fujikawa, T.; Chiba, S. et al. (2001): Neonatal alloimmune thrombocytopenia due to anti-human leukocyte antigen antibody: a case report. In: *Pediatric hematology and oncology* 18 (8), S. 519–524. DOI: 10.1080/088800101753328484.

Sidiropoulos, D.; Straume, B. (1984): The treatment of neonatal isoimmune thrombocytopenia with intravenous immunoglobulin (IgG i.v.). In: *Blut* 48 (6), S. 383–386. DOI: 10.1007/BF00319967.

Simister, Neil E.; Story, Craig M. (1997): Human placental Fc receptors and the transmission of antibodies from mother to fetus. In: *Journal of Reproductive Immunology* 37 (1), S. 1–23. DOI: 10.1016/s0165-0378(97)00068-5.

Skupski, D. W.; Bussel, James B. (1999): Alloimmune thrombocytopenia. In: *Clinical obstetrics and gynecology* 42 (2), S. 335–348. DOI: 10.1097/00003081-199906000-00018.

Smith, Anajane G.; Pereira, Shalini; Jaramillo, Andrés; Stoll, Scott T.; Khan, Faisal M.; Berka, Nouredine et al. (2019): Comparison of sequence-specific oligonucleotide probe vs next generation sequencing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3/B4/B5, DQA1, DQB1, DPA1, and DPB1 typing: Toward single-pass high-resolution HLA typing in support of solid organ and hematopoietic cell transplant programs. In: *HLA* 94 (3), S. 296–306. DOI: 10.1111/tan.13619.

Spencer, J. A.; Burrows, R. F. (2001): Feto-maternal alloimmune thrombocytopenia: a literature review and statistical analysis. In: *The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology* 41 (1), S. 45–55. DOI: 10.1111/j.1479-828x.2001.tb01293.x.

Starcevic, M.; Tomicic, M.; Malenica, M.; Zah-Matakovic, V. (2010): Neonatal alloimmune thrombocytopenia caused by anti-HLA-A24 alloantibodies. In: *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)* 99 (4), S. 630–632. DOI: 10.1111/j.1651-2227.2009.01599.x.

Sternbach, M. S.; Malette, M.; Nadon, F.; Guévin, R. M. (1986): Severe alloimmune neonatal thrombocytopenia due to specific HLA antibodies. In: *Current studies in hematology and blood transfusion* (52), S. 97–103. DOI: 10.1159/000412269.

Taaning, E.; Antonsen, H.; Petersen, S.; Svejgaard, A.; Thomsen, M. (1983): HLA antigens and maternal antibodies in allo-immune neonatal thrombocytopenia. In: *Tissue antigens* 21 (5), S. 351–359. DOI: 10.1111/j.1399-0039.1983.tb00184.x.

Tar, Michael W. de; Klohe, Ellen; Grosset, Alan; Rau, Thomas (2002): Neonatal alloimmune thrombocytopenia with HLA alloimmunization: case report with immunohematologic and placental findings. In: *Pediatric and developmental pathology : the official journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society* 5 (2), S. 200–205. DOI: 10.1007/s10024001-0095-1.

Thude, H.; Schorner, U.; Helfricht, C.; Loth, M.; Maak, B.; Barz, D. (2006): Neonatal alloimmune thrombocytopenia caused by human leucocyte antigen-B27 antibody. In: *Transfusion medicine (Oxford, England)* 16 (2), S. 143–149. DOI: 10.1111/j.1365-3148.2006.00634.x.

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.

Tiller, Heidi; Killie, Mette Kjaer; Husebekk, Anne; Skogen, Bjørn; Ni, Heyu; Kjeldsen-Kragh, Jens; Øian, Pål (2012): Platelet antibodies and fetal growth: maternal antibodies against fetal platelet antigen 1a are strongly associated with reduced birthweight in boys. In: *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica* 91 (1), S. 79–86. DOI: 10.1111/j.1600-0412.2011.01269.x.

van Loghem, J.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.

Victor, Anja; Elsässer, Amelie; Hommel, Gerhard; Blettner, Maria (2010): Judging a plethora of p-values: how to contend with the problem of multiple testing--part 10 of a series on evaluation of scientific publications. In: *Deutsches Arzteblatt international* 107 (4), S. 50–56. DOI: 10.3238/arztebl.2010.0050.

Vos, Thijs W. de; Porcelijn, Leendert; Hofstede-van Egmond, Suzanne; Pajkrt, Eva; Oepkes, Dick; Lopriore, Enrico et al. (2021): Clinical characteristics of human platelet antigen (HPA)-1a and HPA-5b alloimmunised pregnancies and the association between platelet HPA-5b antibodies and symptomatic fetal neonatal alloimmune thrombocytopenia. In: *British journal of haematology* 195 (4), S. 595–603. DOI: 10.1111/bjh.17731.

Vos, Thijs W. de; Winkelhorst, Dian; Haas, Masja de; Lopriore, Enrico; Oepkes, Dick (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.

Waßmuth, Ralf (2005): Einführung in das HLA-System. 2., aktualisierte und erw. Aufl. Landsberg/Lech: Ecomed.

Weinstock, Christof; Schnaidt, Martina (2019): Human Leucocyte Antigen Sensitisation and Its Impact on Transfusion Practice. In: *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* 46 (5), S. 356–369. DOI: 10.1159/000502158.

Wienzek-Lischka, Sandra; Bachmann, Sandy; Froehner, Vanessa; Bein, Gregor (2020): Potential of Next-Generation Sequencing in Noninvasive Fetal Molecular Blood Group Genotyping. In: *Transfusion medicine and hemotherapy : offizielles Organ der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* 47 (1), S. 14–22. DOI: 10.1159/000505161.

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.

Yu, Z.; Lennon, V. A. (1999): Mechanism of intravenous immune globulin therapy in antibody-mediated autoimmune diseases. In: *The New England journal of medicine* 340 (3), S. 227–228. DOI: 10.1056/NEJM199901213400311.

Zdravic, Darko; Yougbare, Issaka; Vadasz, Brian; Li, Conglei; Marshall, Alexandra H.; Chen, Pingguo et al. (2016): Fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia. In: *Seminars in fetal & neonatal medicine* 21 (1), S. 19–27. DOI: 10.1016/j.siny.2015.12.004.

11 Publikationsverzeichnis

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits als Poster auf einer Konferenz vorgestellt.

Posterbeitrag **“Maternal human leukocyte antigen (HLA) class II genotype is not a predictor of immunization against HLA class I in neonates with suspected fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia (FNAIT)”** auf der 55. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI), 2022, Mannheim

12 Ehrenwörtliche Erklärung

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

Ort/Datum

Unterschrift

13 Danksagung

Viele Menschen haben zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken möchte.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ulrich Sachs für die freundliche Überlassung des Themas, für die großartige Unterstützung bei meinen wissenschaftlichen Tätigkeiten, für viele interessante Einblicke und Anregungen und dafür, dass ich diese Dissertation bei ihm anfertigen durfte. Auch Frau Dr. Sandra Wienzek-Lischka hat mich die ganze Zeit über hervorragend betreut und mich stets mit ihrer wissenschaftlichen Erfahrung unterstützt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Nina Cooper, die mir bei meiner Arbeit immer mit Rat und Tat zur Seite stand und an die ich mich jederzeit mit theoretischen oder praktischen Fragen wenden konnte.

Des Weiteren möchte ich mich bei den vielen MTLAs des Zentrums für Transfusionsmedizin und Hämotherapie bedanken, die an dieser Arbeit mitgewirkt haben. Astrid Giptner-Rieger, Marica Müller und Claudia Zwingel möchte ich für die tolle Vorarbeit danken. Ohne die im Thrombozytenlabor durchgeführten MAIPAs und Crossmatches, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Außerdem haben sie mich bei der Sichtung der Patientenakten und Auswahl des Patientenkollektivs tatkräftig unterstützt. Bei den Mitarbeiterinnen des HLA-Labors, insbesondere bei Katja Müller, Christina Lang, Kristina Hau und Angelika Nockher möchte ich mich für die exzellente Einarbeitung sowie die immense Unterstützung bei der Durchführung der Genotypisierungen sowie der Durchführung und Auswertung der LCTs bedanken.

Zum Schluss gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern und meiner wunderbaren Frau Maike, die mich auf diesem Weg immer unterstützt, motiviert und an mich geglaubt haben. Sie alle haben auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.