

---

Aktivierung spezifischer T-Zellen von HIT-Patienten  
durch Heparin/Plättchenfaktor4-Antigenkomplexe

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

vorgelegt durch  
Sabine Tschischka  
aus Köln

Gießen 2009

---

Aus dem Zentrum für Innere Medizin  
Medizinische Klinik IV/V  
Leiter: Prof. Dr. med. F. Grimminger  
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH  
Standort Gießen

Gutachter: PD Dr. med. U. Sachs

Gutachter: PD Dr. med. G-A. Banat

Tag der Disputation: 14.01.2010

**I            Inhaltsverzeichnis**

I	Inhaltsverzeichnis .....	3
II	Abkürzungsverzeichnis.....	7
III	Einleitung.....	9
1	DAS IMMUNSYSTEM.....	9
1.1	Allgemeines .....	9
1.2	Das unspezifische Immunsystem .....	9
1.3	Das spezifische Immunsystem .....	9
2	OBERFLÄCHENMOLEKÜLE, „CLUSTER OF DIFFERENTIATION“.....	13
3	BLUTGERINNUNG.....	14
3.1	Allgemeines .....	14
3.2	Thrombozyten.....	14
3.3	Plasmatische Gerinnung.....	14
3.4	Fibrinolyse .....	15
3.5	Hemmung der Gerinnung in vivo .....	16
4	HEPARIN INDUZIERTE THROMBOZYTOPENIE (HIT II).....	18
4.1	Allgemeines .....	18
4.2	Definition.....	18
4.3	Pathogenese.....	18
4.4	Klinik .....	19
4.5	Diagnose .....	20
4.6	Therapie .....	20
IV	Fragestellung.....	21
V	Material.....	22
1	LABORGERÄTE .....	22
1.1	Brutschrank.....	22
1.2	Durchflusszytometer .....	22
1.3	Mikroskop .....	22
1.4	Sterile Arbeitsbank.....	22
1.5	Vortex .....	22
1.6	Wasserbad.....	22
1.7	Zentrifuge.....	22

2	WEITERE MATERIALIEN.....	22
2.1	Blutentnahmesysteme .....	22
2.2	Gewebekulturplatten.....	22
2.3	Pipetten .....	22
2.4	Pipettierhilfe.....	23
2.5	Pipettenspitzen .....	23
2.6	Röhrchen .....	23
3	MEDIEN.....	23
3.1	Kulturmedium.....	23
3.2	Waschmedium .....	23
3.3	IL-2-Medium.....	23
4	PUFFER UND REAGENZIEN.....	24
4.1	Ficoll, Trennlösung zur Dichtegradientenzentrifugation.....	24
4.2	Fixationslösung für Durchflusszytometrie .....	24
4.3	Färbe- und Waschpuffer für Durchflusszytometrie.....	24
4.4	PBS .....	24
4.5	PF4 .....	24
4.6	Heparin .....	24
4.7	Propidiumjodid.....	24
4.8	Trypanblau-Lösung.....	24
5	ZYTOKINE.....	25
5.1	Interleukin 2 .....	25
6	ANTIKÖRPER.....	25
7	IMMUNASSAYS .....	26
7.1	Heparin/PF4-ELISA .....	26
8	ZELLEN .....	26
8.1	K562 .....	26
8.2	Patientenzellen .....	26
8.3	Spenderzellen.....	26
9	SOFTWARE .....	26
VI	Methoden .....	27
1	ZELLSEPARATION .....	27
1.1	Isolierung mononukleärer Zellen (PBMC) aus peripherem Blut.....	27
1.2	Plasma-Entnahme .....	27

1.3	Thrombozyten-Isolation .....	27
1.4	Zellzahl und Zellvitalität .....	27
1.5	Trennung von lebenden und toten Zellen .....	28
2	ZELLKULTUREN .....	28
2.1	Tumorzelllinien (K562).....	28
2.2	Stimulationsversuch: Kultur mit Hep/PF4-Komplex .....	28
2.3	Blockversuch .....	29
2.4	Entnahme von Zellüberständen.....	29
3	DURCHFLUSSZYTOMETRIE .....	30
3.1	Prinzip.....	30
3.2	Antikörper-Markierung der Zellen .....	30
3.3	Herstellung von Standardzellen.....	30
3.4	Bestimmung der Proliferationsraten.....	31
4	ELISA (ENZYME LINKED IMMUNOASSAY).....	31
4.1	Prinzip.....	31
4.2	Auswertung.....	31
5	STATISTIK.....	32
VII	Ergebnisse .....	33
1	STIMULATIONSVERSUCH.....	33
1.1	Kinetik Patienten.....	33
1.2	Kinetik Spender .....	34
1.3	Kontrollen.....	36
2	VERGLEICHENDE ANALYSE DER OBERFLÄCHENMOLEKÜLE .....	37
3	BLOCKVERSUCH .....	39
4	ELISA.....	40
VIII	Diskussion .....	41
1	STIMULATIONSVERSUCH, VERGLEICHENDE ANALYSE DER OBERFLÄCHENMOLEKÜLE, BLOCKVERSUCH .....	41
1.1	Proliferation von Patienten-PBMC bei Reexposition in vitro .....	41
1.2	Abhängigkeit der Proliferation vom Antigenkomplex.....	41
1.3	T-Zell-Aktivierung und vorrangige Beteiligung von T-Helferzellen .....	42
1.4	Einfluss von PF4 auf die T-Zell-Proliferation.....	43
1.5	Interaktion der beteiligten Zellen.....	43

1.6	Hemmung der Reaktion durch einen anti-CD154-Antikörper.....	44
2	ELISA.....	45
IX	Zusammenfassung.....	47
X	Summary.....	49
XI	Literaturverzeichnis.....	51
XII	Danksagung.....	61

## II Abkürzungsverzeichnis

### Allgemeine Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AT	Antithrombin
autol.	autolog
Bez.	Bezeichnung
Blockv.	Blockversuch
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	cluster of differentiation
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CPDA	citrate-phosphate-dextrose-adenine
d.h.	das heißt
E. coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Fc	Fragment cristalline
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FS	Forward scatter
ggf.	gegebenenfalls
Hep/PF4	Heparin/Plättchenfaktor 4
HIPA	Heparin induzierter Plättchenaktivierungs Assay
HIT	Heparin induzierte thrombotische Thrombopenie
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
ITP	Idiopathische Thrombozytopenische Purpura
MHC	major histocompatibility complex
n.n.	nicht nachweisbar

---

NK	natural killer, natürliche Killer(zellen)
PBS	Phosphat-buffered Saline
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell, periphere mononukleäre Zellen
PE	Phycoerythrin
PF4	Plättchenfaktor 4
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidium-Iodide (Propidiumjodid)
PNPP	p-Nitrophenylphosphat
Rez.	Rezeptor
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
s	Standardabweichung
SS	side scatter
TCR	T-Zell-Rezeptor
TH	T-Helferzelle
Thr.	Thrombozyten
t-PA	tissue-type plasminogen-activator
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
zytotox.	zytotoxische

#### Dimensionen

g	Gramm oder Erdbeschleunigung ( $g=9,81 \text{ m/s}^2$ )
l	Liter
min	Minuten
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
s	Sekunde
U	Units

### **III Einleitung**

#### **1 DAS IMMUNSYSTEM**

##### **1.1 Allgemeines**

Das Immunsystem des Menschen ist ein komplexes funktionelles System. Es dient zur Erhaltung der Individualstruktur durch Abwehr pathogener körperfremder Substanzen und kontinuierliche Elimination anormaler (unter anderem maligne entarteter) Körperzellen bei gleichzeitiger Toleranz gegenüber Selbst-Antigenen.

Man unterscheidet eine unspezifische (angeborene) und eine spezifische (erworbene) Immunantwort. Die unspezifische Immunantwort erfolgt dabei im Gegensatz zur spezifischen unabhängig von der Art des Antigens. In beiden Fällen sind sowohl humorale als auch zelluläre Faktoren beteiligt.

##### **1.2 Das unspezifische Immunsystem**

An der unspezifischen Immunantwort sind natürliche Barrieren wie die intakte Haut und Schleimhaut, zelluläre Abwehrmechanismen wie das Monozyten-Makrophagen-System, natürliche Killerzellen, Granulozyten und das Komplementsystem beteiligt.

##### **1.3 Das spezifische Immunsystem**

Die fremden Substanzen, die eine spezifische Immunität induzieren, nennt man Antigene. Sie werden von Antigen-präsentierenden Zellen in Milz, Lymphknoten und Mukosa-assoziiertem lymphatischem Gewebe (sekundären Lymphorganen) den T-Lymphozyten präsentiert. Es kommt zu einer klonalen Expansion antigen-spezifischer T- und B-Lymphozyten, den sogenannten Effektorzellen. Diesen stehen die Gedächtniszellen gegenüber, die bei erneuter Exposition mit dem gleichen Antigen eine effizientere Reaktion des Immunsystems induzieren.

###### **1.3.1 Antigen-präsentierende-Zellen**

Zu den Antigen-präsentierenden Zellen zählen zirkulierende Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und B-Lymphozyten, die über Major-Histocompatibility-Complex-Moleküle (MHC) Antigene auf ihrer Zelloberfläche präsentieren.

T-Zellen können Antigene nur in Assoziation mit MHC-Molekülen erkennen. Hierfür müssen diese zunächst zu Peptidfragmenten verdaut werden, um an die Peptid-bindende Grube der MHC-Moleküle (HLA-Antigene) binden zu können.

Dabei werden zwei Gruppen von MHC-Molekülen unterschieden: MHC Klasse I und MHC Klasse II.

Endogene, d.h. innerhalb der Zelle synthetisierte Antigene (unter anderem Tumorantigene) oder virale Proteine werden durch große Proteasomen zu kleinen Peptiden verdaut und dann ins Endoplasmatische Retikulum transportiert. Hier treffen sie auf MHC-Klasse-I-Moleküle. Falls die Peptide in die antigenbindende Region des MHC-Moleküls hineinpassen (MHC-abhängige Restriktion), werden die MHC-Peptid-Komplexe über den Golgi-Apparat bis auf die Zelloberfläche transportiert.

Exogene Antigene können entweder über Oberflächenrezeptoren oder endosomale Vesikel eingeschleust und durch Proteasen zu Peptiden verdaut werden. Die Endosomen verschmelzen dann mit Vesikeln, die MHC-Klasse-II-Moleküle enthalten. Ähnlich wie bei den MHC-Klasse-I-Molekülen, interagieren die antigenen Peptide mit der antigenbindenden Region der MHC-Moleküle und werden als MHC-Peptid-Komplexe auf die Zellmembran transportiert (Burmester und Pezzuto, 1998).

### 1.3.2 T-Lymphozyten

Bis zu 75% der mononukleären Zellen im Blut sind T-Lymphozyten. Die T-Lymphozyten entstehen aus den pluripotenten Stammzellen im Knochenmark. Dort erfolgt eine weitgehend antigenunabhängige erste Proliferationswelle unreifer Vorläuferzellen. Diese wandern dann vom Knochenmark in den Thymus. Hier durchläuft die unreife Vorläuferzelle drei Reifungsstadien. Im Stadium I der T-Zell-Differenzierung kommt es unter dem Einfluss von IL-2 zur Umlagerung des T-Zell-Rezeptors (TCR). Da diese Zellen weder das CD4- noch das CD8-Oberflächenantigen tragen, werden sie als doppelt negativ bezeichnet. In der nächsten Reifungsstufe erscheinen Moleküle des CD3-Antigenrezeptorkomplexes auf der Zelloberfläche. Zudem besitzen diese Zellen nun die Oberflächenantigene CD4 und CD8 (doppelt positiv). Im Stadium III der T-Zell-Differenzierung folgt ein entscheidender Schritt zur Reifung der eigentlichen T-Zelle. Als Folge der Interaktion mit dem MHC (major histocompatibility complex) der Thymuszellen findet eine Aufspaltung in zwei Populationen statt, die entweder das CD4- oder das CD8-Antigen tragen (einfach positiv). Da der T-Zell-Rezeptor Fremdanigen nur im Zusammenhang mit dem körpereigenen MHC erkennen und binden kann, durchlaufen die naiven T-Zellen zum Schluss einen strengen Selektionsprozess. T-Zellen mit zu hoher oder völlig fehlender Affinität zu MHC werden eliminiert. Dadurch werden im Thymus

sowohl autoreaktive als auch funktionsuntüchtige T-Zellen beseitigt (Burmester und Pezzuto, 1998).

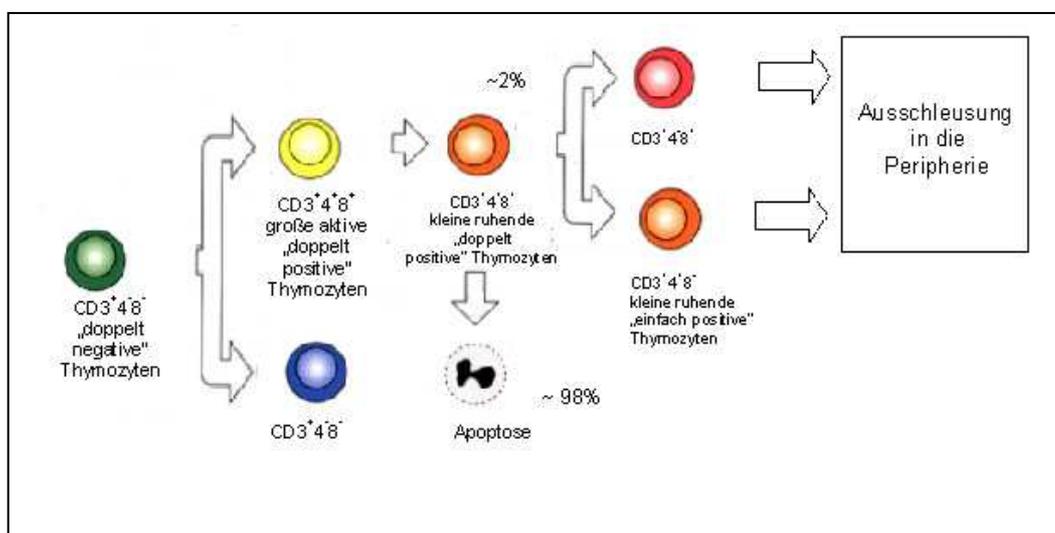


Abb.1: T-Zell-Differenzierung

Nur 2% aller T-Zellen werden schließlich als naive T-Zellen in das periphere Blut ausgeschleust und zirkulieren bis zu einem eventuellen Antigenkontakt.

Dieser erfolgt über die MHC-Moleküle, wobei CD4-Zellen mit MHC-Klasse-II-Molekülen kommunizieren, während CD8-Zellen lediglich Antigene erkennen, die auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden.

Das erste Signal, das durch den Kontakt von T-Zellrezeptoren mit den MHC-Peptid-Komplexen ausgelöst wird, ist zwar essentiell, alleine allerdings nicht ausreichend für eine T-Zell-Aktivierung. Zur Aktivierung von naiven T-Zellen wird gleichzeitig ein zweites Signal benötigt. Dieses zweite Signal wird über kostimulatorische Moleküle der B7-Familie, CD80 (B7.1) oder CD86 (B7.2), die nur von professionellen antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden, und ihrem Liganden CD28 vermittelt (Bernhard et al., 1999).

Aktivierte T-Zellen erfüllen verschiedene Funktionen, die zum einen in der Beseitigung unerwünschter Zellen, zum anderen in der Regulation der humoralen Immunantwort bestehen.

Nach Aktivierung können CD8<sup>+</sup> T-Zellen über die Sekretion von lytischen Enzymen (Perforin, Granzyme, u.a.) peptidexprimierende Zellen lysieren oder regulieren als Suppressorzellen immunologische Prozesse.

Aus naiven T-Helfer-Zellen (CD4<sup>+</sup>) entstehen je nach Zytokinemilieu bei Aktivierung entweder TH1- oder TH2-Zellen. Während TH1-Zellen vorwiegend Zytokine

produzieren, die über Makrophagenaktivierung das Abtöten intrazellulärer Erreger ermöglichen, führt das Zytokinmuster der TH2-Zellen zur B-Zell-Aktivierung, Ausreifung in Plasmazellen und spezifischer Antikörperproduktion. Nach Antigenkontakt entstehen T-Gedächtniszellen, die bei Reexposition rasch wieder expandieren und eine Immunantwort initiieren (Dutton et al., 1998).

Für die Entwicklung, Differenzierung bzw. Aktivierung und Antigenerkennung der T-Zellen sind neben dem T-Zell-Rezeptor zahlreiche Hilfsmoleküle erforderlich. Letztere sind besonders an der Bindung zwischen den T-Zellen und den antigenpräsentierenden Zellen beteiligt. Einige dieser Moleküle befinden sich ausschließlich auf den Zellen der T-Zelllinie, so z.B. die CD3-Antigene, während andere auch auf B-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen vorkommen (Burmester und Pezzuto, 1998).

### 1.3.3 B-Lymphozyten

B-Lymphozyten entstehen ebenfalls im Knochenmark aus pluripotenten Stammzellen. Sogenannte Progenitor-B-Zellen entwickeln sich zu Prä-B-Zellen, in deren Zytoplasma sich bereits Teile der IgM-Moleküle nachweisen lassen. In der nächsten Differenzierungsstufe exprimieren „Virgin“-B-Zellen bereits ganze IgM-Moleküle auf ihrer Oberfläche. Binden diese Immunglobuline nicht an von Stromazellen präsentierte Autoantigene, verlassen die Zellen in dieser Reifungsstufe das Knochenmark und wandern in die T-Zell-reichen Bezirke der lymphatischen Organe. Erhalten sie dort von T-Zellen ein Anti-Apoptose-Signal, beginnt der Weg als zirkulierende follikuläre B-Zellen, die sich bis zum Zusammentreffen mit einem passenden Antigen ständig zwischen Knochenmark und sekundären lymphatischen Organen bewegen (Burmester und Pezzuto, 1998).

Nach dem Antigenkontakt, der zumeist in T-Zell-reichen Zonen der Lymphknoten erfolgt, beginnt die Differenzierung zu IgM-produzierenden Plasmazellen. Durch das Zusammentreffen mit follikulären dendritischen Zellen im Rahmen der Keimzentrumsreaktion entwickeln die Plasmazellen die Fähigkeit, Immunglobuline der anderen Klassen zu produzieren (Cerutti et al., 1998).

### 1.3.1 Spezielle Interaktion von Lymphozyten

B-Zellen können als antigen-präsentierende Zellen dienen, über MHCII-Moleküle T-Zellen Antigene präsentieren und so eine spezifische Immunantwort induzieren. Durch den direkten interzellulären Kontakt zwischen CD40 auf B-Zellen und antigen-

präsentierenden Zellen und seinem Liganden CD154 auf T-Zellen kommt es zu einer Aktivierung der CD40-tragenden Zelle und zur CD4-T-Zell-Kostimulation (Grewal und Flavell, 1998). Diese Interaktion beschleunigt die B-Zell-Differenzierung in Plasma- und Gedächtnis-Zellen, führt zur Aktivierung von Makrophagen und dendritischen Zellen und fördert die Entstehung von NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen. Die CD40-CD154-Interaktion nimmt somit eine Sonderrolle als Vermittler sowohl einer humoralen als auch einer zellulären Immunantwort ein (Ferrant et al., 2004).

## **2 OBERFLÄCHENMOLEKÜLE, „CLUSTER OF DIFFERENTIATION“**

Blutzellen tragen auf ihrer Oberfläche unterschiedliche Membranproteine, die teils Rezeptorfunktionen haben, aber auch enzymatische Aktivität haben können. Mit spezifischen Antikörpern gegen diese Oberflächenmoleküle lassen sich die Zellen anhand ihres Antigenmusters unterscheiden. Das „Cluster of differentiation“ ist ein internationales System zur Kennzeichnung der Oberflächenmoleküle menschlicher Zellen, das durch die regelmäßigen „Human Leucocyte Differentiation Antigen Workshops“ ständig aktualisiert wird. Gruppen von Antigenen, die durch die gleichen Antikörper erkannt werden, werden als „cluster“ bezeichnet und erhalten eine Ziffer (Zola et al., 2005). Die bekanntesten Oberflächenmoleküle sind CD3 (T-Zell-Rezeptor), CD4 (T-Helferzellen) und CD20 (gesunde B-Zellen und verschiedene Non-Hodgkin-Lymphome).

### 3 BLUTGERINNUNG

#### 3.1 Allgemeines

Kommt es zu einer Gewebsverletzung, setzen verschiedene Reparaturmechanismen ein, die einerseits darauf zielen, den Blutverlust möglichst gering zu halten, andererseits die Integrität des Körpers rasch wiederherzustellen. Nach der Eröffnung kleiner Blutgefäße kommt die Blutung beim Gesunden innerhalb von 1-3 Minuten zum Stillstand. Dies wird als die primäre Hämostase bezeichnet. Sie kommt in erster Linie durch Vasokonstriktion und den mechanischen Verschluss durch einen Thrombozytenpfropf zustande. Der Prozess der sekundären Hämostase wird durch die plasmatische Gerinnung bestimmt, die zur Fibrinbildung führt. Dieses stabilisiert den Thrombus, der dann auch bei Nachlassen der Vasokonstriktion das Gefäß fest verschließt (Weiss und Jelkmann, 2000).

#### 3.2 Thrombozyten

Thrombozyten entstehen aus Megakaryozyten, die ihrerseits aus der myeloischen Stammzelle des Knochenmarks stammen. Megakaryozyten sind große, kernhaltige Zellen, von denen je bis zu 1000 der kleinen länglichen, kernlosen Thrombozyten abgeschnürt werden. Im peripheren Blut des Erwachsenen finden sich 150000 – 350000 Thrombozyten pro  $\mu\text{l}$ , ca.  $\frac{1}{3}$  wird in der Milz zwischengespeichert. Die mittlere Verweildauer im Blut beträgt etwa 8 Tage, anschließend werden sie von Milz, Lunge und Leber abgebaut.

Werden Thrombozyten im Rahmen der Adhäsion aktiviert, nehmen sie eine kugelige Form an und bilden Fortsätze, die die Adhäsion begünstigen.

#### 3.3 Plasmatische Gerinnung

Die plasmatische Gerinnung erfolgt über Kaskaden der verschiedenen Gerinnungsfaktoren, die schließlich zur Bildung von Fibrinpolymeren führen, die den roten Abscheidungsthrombus stabilisieren.

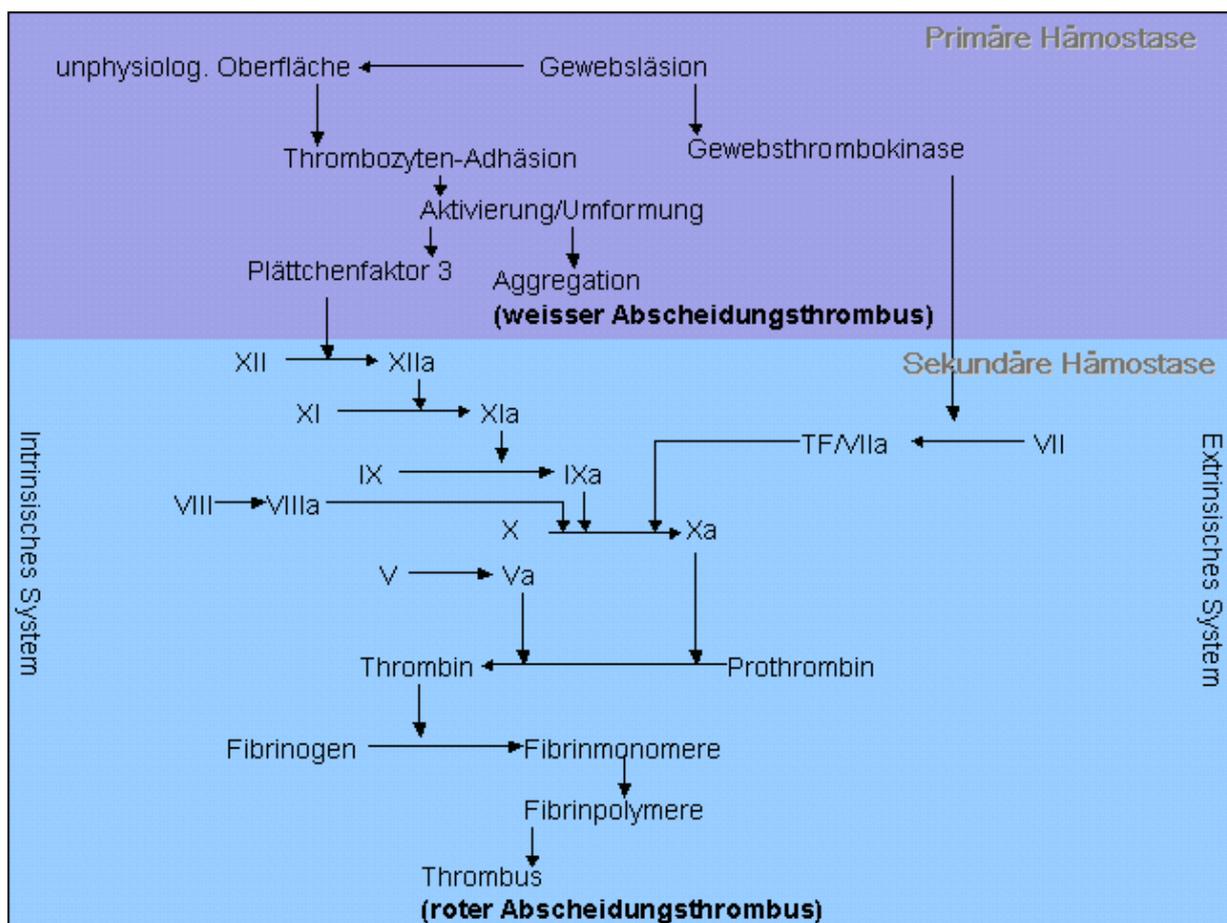


Abb. 2: plasmatische Gerinnung

### 3.4 Fibrinolyse

Die Auflösung der Fibrinpolymere durch die Serinprotease Plasmin bezeichnet man als Fibrinolyse. Im gesunden Organismus stehen fibrinbildende und fibrinolytische Prozesse im Gleichgewicht, erst bei zusätzlicher Aktivierung des Gerinnungssystems durch eine Verletzung überwiegt lokal zunächst die Fibrinbildung. Plasmin wird aus seiner Vorstufe, dem Plasminogen gebildet. Man unterscheidet direkte und indirekte Plasminogenaktivatoren. Direkte Plasminogenaktivatoren sind t-PA (tissue-type plasminogen-activator) und Urokinase. Die aus Blutzellen freigesetzten Blutaktivatoren benötigen sogenannte Lysokinasen als Proaktivatoren, z.B. Präkallikrein oder die von hämolysierenden Streptokokken gebildete Streptokinase (Hiller et al., 2002).

### 3.5 Hemmung der Gerinnung in vivo

Die Behandlung mit Antikoagulanzen ist indiziert bei thromboembolischen Erkrankungen, extrakorporaler Zirkulation, Verbrauchskoagulopathie, arterieller Verschlusskrankheit sowie zur Thromboseprophylaxe. Es stehen verschiedene Substanzgruppen zur Verfügung, die an unterschiedlichen Stellen in das Gerinnungssystem eingreifen:

#### 2.5.1 Heparine

Heparine werden in unfraktioniertes Heparin sowie niedermolekulare Heparine unterteilt. Unfraktioniertes Heparin wirkt hauptsächlich über die Bindung an den natürlichen Gerinnungsinhibitor AT III, der durch die resultierende Konformationsänderung beschleunigt insbesondere Faktor Xa und IIa, aber auch nahezu alle anderen Serinproteasen inhibiert. Niedermolekulare Heparine hemmen lediglich Faktor Xa; durch die fehlende Faktor IIa-Inhibition soll die Blutungsneigung unter Therapie vermindert sein (Hiller et al., 2002).

#### 2.5.2 Direkte Thrombin-Inhibitoren

Hirudin:

Ursprünglich stammt Hirudin aus dem Kopf des Blutegels (*Hirudo medicinalis*), heute wird es gentechnisch als rekombinantes Hirudin hergestellt. Hirudin ist ein direkter Thrombin-Inhibitor, und im Gegensatz zu Heparin kann es auch fibrin gebundenes Thrombin hemmen. Hirudin wird vorwiegend bei Heparin-Unverträglichkeit (z.B. HIT) eingesetzt.

Lepirudin:

Bei Lepirudin handelt es sich um ein rekombinantes, aus Hefezellen gewonnenes Hirudin, das als hochspezifischer direkter Thrombin-Inhibitor durch Bindung am Thrombin-Molekül die Thrombin-Wirkung hemmt.

Argatroban:

Der ebenfalls direkte Thrombin-Inhibitor Argatroban ist ein synthetisches L-Arginin-Derivat, das reversibel an Thrombin bindet und sowohl an frei zirkulierendem als auch an Fibrin-gebundenem Thrombin wirkt.

### 2.5.3 Vitamin-K-Antagonisten

Orale Antikoagulation erfolgt mithilfe von Derivaten von Coumarin oder Indandion, die über den Vitamin-K-Antagonismus eine Hemmung der hepatischen postribosomalen Gamma-carboxylierung bewirken und so zu funktionell weitgehend inaktiven Gerinnungsfaktoren II, VII, IX und X führen.

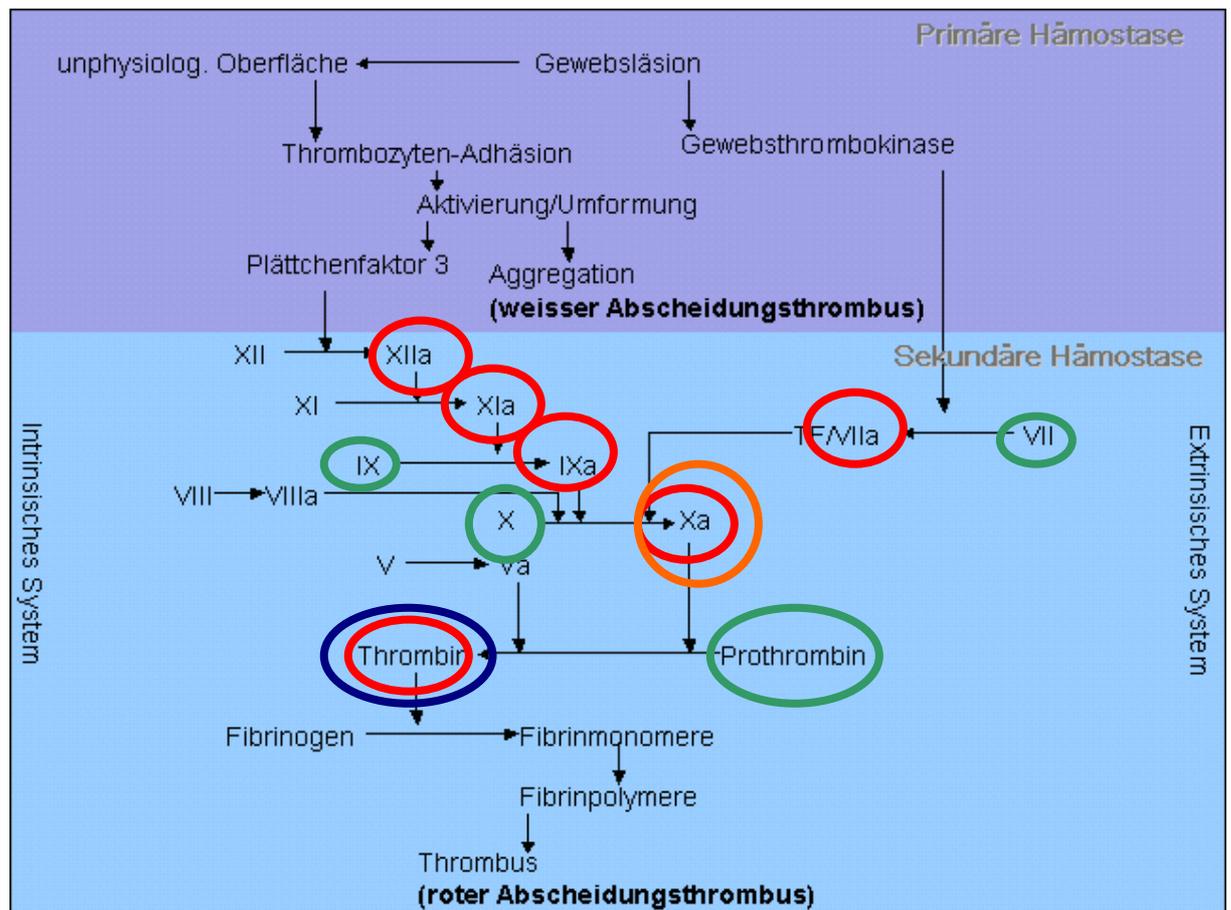


Abb.3: Inhibitoren des Gerinnungssystems (rot: unfractioniertes Heparin, orange: niedermolekulare Heparine, blau: direkte Thrombin-Inhibitoren, grün: Vitamin-K- Antagonisten)

## 4 HEPARIN INDUZIERTE THROMBOZYTOPENIE (HIT II)

### 4.1 Allgemeines

Seit Beginn der Heparintherapie beim Menschen in den dreißiger Jahren sind gelegentliche negative Effekte des Heparins auf die Thrombozytenzahlen bekannt. Häufig sind diese auf direkte Interaktion zwischen Heparin und den Thrombozyten zurückzuführen (HIT Typ I). Erst während der letzten zehn bis fünfzehn Jahre findet der zweite Typ der HIT, eine immunologisch verursachte Komplikation, größere klinische und wissenschaftliche Beachtung.

### 4.2 Definition

Man unterscheidet die nicht immunologische HIT (Typ I) von der immunologisch verursachten HIT (Typ II).

Die Heparin-induzierte Thrombozytopenie (Typ II) ist definiert als eine Komplikation der Therapie mit unfraktioniertem oder niedermolekularem Heparin, die sich als eklatanter Abfall der Thrombozyten im peripheren Blut mit oder ohne manifeste thrombotische Ereignisse äußert (Locke et al., 2005).

### 4.3 Pathogenese

Nach dem nach wie vor aktuellen Konzept (Greinacher und Kemkes-Matthes, 1999) entsteht die Erkrankung durch folgenden Mechanismus:

Heparin und körpereigener Plättchenfaktor 4 (PF4) lagern sich zu Komplexen zusammen. Diese Komplexe bilden ein Antigen, gegen welches nun Antikörper verschiedener Immunglobulinklassen (IgG, IgM und IgA) produziert werden (Ahmad et al., 2004), die zusätzlich an die Antigen-Komplexe binden. So entstehen zirkulierende Immunkomplexe. Da die Immunkomplexe Immunglobuline enthalten, können sie an die Fc-Rezeptoren der Thrombozyten gebunden werden und lösen so eine Thrombozytenaktivierung aus.

Durch die Aktivierung setzen Thrombozyten Granulaproteine (z.B. PF4, Thrombin) frei, die ihrerseits an Heparin binden und so die Zahl der Immunkomplexe erhöhen (Newman und Chong, 2000). Die verstärkte Bindung von Heparin an PF4 einerseits und die starke Thrombozytenaktivierung andererseits begünstigen die Bildung von Mikroaggregaten und Thromben.

Weiterhin kann das von aktivierten Thrombozyten freigesetzte PF4 an das Heparansulfat der Endothelzellen gebunden werden. Dies führt ebenfalls zu einer gesteigerten Thrombin-Freisetzung ins Plasma und erhöht so die Wahrscheinlichkeit der Thrombusbildung (Greinacher und Kemkes-Matthes, 1999).

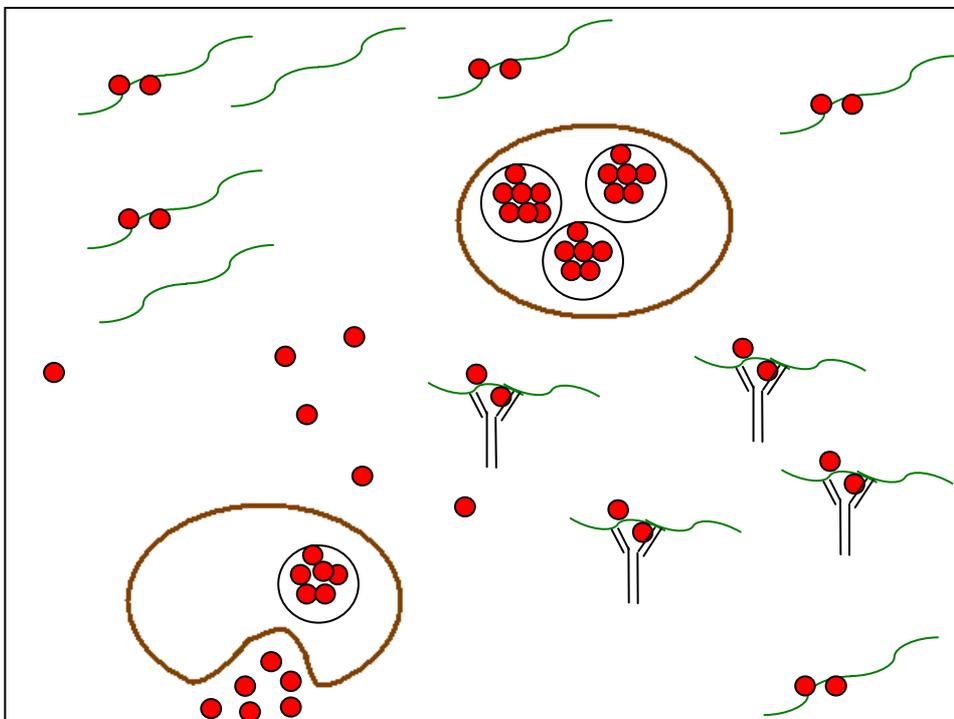


Abb. 4: HIT-Pathogenese: Körpereigener Plättchenfaktor 4 (rot), der von aktivierten Thrombozyten (braun) freigesetzt wird, bindet an Heparin-Moleküle (grün) und bildet mit ihnen den Antigenkomplex, gegen welchen Antikörper (schwarz) gebildet werden.

#### 4.4 Klinik

Die Klinik der HIT variiert von asymptomatischen thrombozytopenischen Episoden alleine bis hin zu fulminanten thrombembolischen Ereignissen. Typisch sind der Beginn ab dem 5. Tag der Heparin-gabe (bis zum 20. Tag) und der Abfall der Thrombozytenzahlen auf weniger als 50% des Ausgangswertes. Die häufigste Gefäßkomplikation besteht in einer tiefen Beinvenenthrombose. Trotz der niedrigen Thrombozytenzahlen kommt es nur selten zu hämorrhagischen Komplikationen (Castelli et al. 2007).

#### 4.5 Diagnose

Die Diagnose der Heparin-induzierten-Thrombozytopenie wird labortechnisch vorzugsweise durch einen funktionellen Test und einen Antigen-Test gesichert. Der Heparin-induzierte-Plättchen-Aktivierungstest (HIPA) ist der am häufigsten in der Routinediagnostik eingesetzte Funktionstest (Hinz et al., 2002). Ergänzt wird er z.B. durch den Heparin/PF4-ELISA. Zur endgültigen Diagnose der HIT gehört das Gesamtbild der Befunde: Ein alleiniger Nachweis von Antikörpern gegen den Heparin/PF4-Komplex ohne Thrombozytenabfall oder thrombembolische Ereignisse reicht nicht aus. Steigen allerdings bei negativer Labordiagnostik die Thrombozytenzahlen unter alternativer Antikoagulation wieder an, so ist die HIT sehr wahrscheinlich (Janssen et al., 2003).

#### 4.6 Therapie

Erste therapeutische Maßnahme bereits bei klinischem Verdacht auf eine HIT Typ II ist das Absetzen des Heparins (Greinacher und Kemkes-Matthes, 1999). Aufgrund der HIT-assoziierten Aktivierung des Gerinnungssystems ist allerdings auch eine alternative gerinnungshemmende Therapie vonnöten (Warkentin und Greinacher, 2004). Hierzu stehen insbesondere Danaparoid-Natrium, Argatroban, Lepirudin (Lubenow et al., 2004) und Bivalirudin (Warkentin und Greinacher, 2004) zur Verfügung. Die Transfusion von Thrombozytenkonzentraten sollte vermieden werden, da sie die thrombembolischen Ereignisse verschlimmern kann. Zudem kommt es bei der HIT Typ II trotz niedriger Plättchenzahlen nur in seltenen Fällen zu Blutungskomplikationen (Leo und Winteroll, 2003). Für die weitere prophylaktische Antikoagulation zur Vermeidung erneuter Thrombosen können orale Antikoagulanzen vom Cumarin-Typ über mindestens 2-3 Monate verwendet werden (Franchini, 2005).

#### **IV Fragestellung**

Der Einsatz von Heparin in der Prophylaxe und Therapie thrombembolischer Ereignisse gilt als erprobt, kostengünstig und effektiv. Die Heparin-induzierte Thrombopenie ist die gefährlichste der bekannten unerwünschten Wirkungen.

Sie unterscheidet sich wesentlich von anderen Arzneimittel-induzierten Thrombozytopenien. Während der größte Teil der verursachenden Medikamente über eine direkte Bindung an der Thrombozytenmembran im Sinne eines Haptens zu einem vermehrten Abbau der Plättchen führt, ist die Pathogenese der Heparin-induzierten Thrombozytopenie Typ II durch die Bildung spezifischer Antikörper gegen Komplexe aus Plättchenfaktor 4 und Heparin gekennzeichnet. Diese führen über eine Gerinnungs-Aktivierung zur Entstehung von Mikroaggregaten und damit einer relativen Thrombozytopenie.

Die daraus folgenden therapeutisch denkbaren Möglichkeiten machen die HIT Typ II zu einem interessanten Gegenstand der Forschung. Während die Wirkung der identifizierten Antikörper mittlerweile als gesichert gilt, scheint der Weg dorthin vergleichsweise wenig bekannt. Bacsi et alii widmeten sich 1999 der Frage der T-Zell-Beteiligung an der HIT-Pathogenese und wiesen identische Sequenzen des T-Zell-Rezeptors an zwei HIT-Patienten nach (Bacsi et al., 1999). Die molekularbiologischen Ergebnisse deuteten auf beteiligte T-Helferzellen hin.

In der vorgelegten Arbeit wurde folgenden Fragen nachgegangen:

1. Inwieweit lässt sich die immunologische Reaktion bei Reexposition in vitro nachvollziehen?
2. Welche Zellen des Immunsystems sind vorrangig beteiligt?
3. Kommt es zu einer T-Zell-Aktivierung?
4. Lassen sich Hinweise auf eine Zell-Interaktion finden?

## V Material

### 1 LABORGERÄTE

- 1.1 Brutschrank  
Function line BB16: Heraeus Instruments
- 1.2 Durchflusszytometer  
Epics XL: Beckman Coulter
- 1.3 Mikroskop  
DM IL: Leica
- 1.4 Sterile Arbeitsbank  
Hera safe HS18: Heraeus Instruments
- 1.5 Vortex  
REAX control: Heidolph
- 1.6 Wasserbad  
GFL 1083: GFL®
- 1.7 Zentrifuge  
Multifuge 3 S-R: Heraeus

### 2 WEITERE MATERIALIEN

- 2.1 Blutentnahmesysteme  
Butterfly 21G grün, mit Adapter: Kabe Labortechnik  
S-Monovette CPDA 8,5 ml: Sarstedt  
Multiadapter für S-Monovette: Sarstedt
- 2.2 Gewebekulturplatten  
Suspensionskulturplatte 96 well mit Abdeckplatte: Greiner  
NUNCLON™ Surface 96 well: NUNC™
- 2.3 Pipetten  
P 20, P 100, P 200, P 1000: Gilson  
Multipette® plus: Eppendorf

- |          |   |                         |
|----------|---|-------------------------|
|          | 8-Kanal-Pipettiergerät (25-200µl):  | Micronic Systems        |
|          | 12-Kanal-Pipettiergerät (25-200µl):   | Micronic Systems        |
| 2.4      | <u>Pipettierhilfe</u>   |                         |
|          | Pipettboy acu:  | IBS Integra Biosciences |
| 2.5      | <u>Pipettenspitzen</u>  |                         |
|          | Pipetten 10 ml, 25 ml, 50 ml:   | BD Falcon               |
|          | Combi-Tips plus 0,5 ml, 5 ml :  | Eppendorf               |
|          | Pipettenspitzen gelb, blau:   | Sarstedt                |
|          | Pasteur capillary pipettes:   | WU Mainz                |
| 2.6      | <u>Röhrchen</u>   |                         |
|          | konische Röhrchen mit Drehverschluss  |                         |
|          | 15 ml, 50 ml:   | BD Falcon               |
|          | Rundboden, PS, 12 x 75 mm, 5 ml:  | Greiner Labortechnik    |
|          | Nunc Cryo Tube™ Vials 1,8 ml:   | NUNC™                   |
| <b>3</b> | <b>MEDIEN</b>   |                         |
| 3.1      | <u>Kulturmedium</u>   |                         |
|          | Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 mit L-Glutamin (Gibco™) eingesetzt, das mit 10% fötalem Kälberserum (FCS, Gibco™, hitzeinaktiviert) und Penicillin-Streptomycin (entspricht 100 IE/ml; Gibco BRL) versetzt worden war.                                     |                         |
| 3.2      | <u>Waschmedium</u>  |                         |
|          | Als Waschmedium wurde obengenanntes Kulturmedium (siehe V.3.1) mit nur 5% FCS-Zugabe (Gibco™) verwendet.  |                         |
| 3.3      | <u>IL-2-Medium</u>  |                         |
|          | Um die Zellkulturen ausreichend mit dem Wachstumsfaktor IL-2 zu versorgen, wurde dem obengenannten Kulturmedium (siehe V.3.1) gentechnisch aus E. coli K12 gewonnenes Interleukin 2 (Proleukin; Chiron) in einer Endkonzentration von 20-50 U/ml zugesetzt. |                         |

## 4 PUFFER UND REAGENZIEN

### 4.1 Ficoll, Trennlösung zur Dichtegradientenzentrifugation

Für die Isolierung von PBMC aus Vollblut und der Trennung von toten und lebenden Zellen wurde Ficoll (Ficoll-Paque™ PLUS; Amersham Biosciences AB) mit einer Dichte von 1,077 g/ml verwendet.

### 4.2 Fixationslösung für Durchflusszytometrie

Zum Fixieren gefärbter Standardzellen wurden diese in PBS mit 5% Formaldehyd-Lösung (Fisher) versetzt.

### 4.3 Färbe- und Waschpuffer für Durchflusszytometrie

Zum Waschen antikörpermarkierter Zellen wurde PBS mit 5% und zum Färben mit 0,2% bovinem Serumalbumin (Albumin, Bovine; Sigma®) benutzt.

### 4.4 PBS

PBS-Dulbecco (Phosphate Buffered Saline (1x); pH 7,4; PAA) ohne Calcium und Magnesium.

### 4.5 PF4

Zur Herstellung des Stimulationskomplexes wurde PF4 (Calbiochem) in einer Endkonzentration von 5 µg/ml eingesetzt.

### 4.6 Heparin

Zur Herstellung des Stimulationskomplexes wurde Heparin-Natrium (Liquemin® N 25000; Roche) in PBS aufgenommen und in einer finalen Konzentration von 0,25 IE/ml eingesetzt.

### 4.7 Propidiumjodid

Propidiumjodid (Propidium Iodide staining solution; BD Biosciences) wurde zur Unterscheidung toter oder fixierter von lebenden Zellen am Durchflusszytometer verwendet.

### 4.8 Trypanblau-Lösung

Zur Bestimmung der Zellzahl und zur Unterscheidung toter von lebenden Zellen mit der Neubauer-Zählkammer am Mikroskop wurde im Verhältnis 1:1 mit Aqua ad iniectabilia verdünnte Trypanblau-Lösung (Trypan blue solution 0,4%; SIGMA) eingesetzt.

## 5 ZYTOKINE

### 5.1 Interleukin 2

Ursprung:

- aktivierte T-Zellen (überwiegend CD4<sup>+</sup> T-Zellen)

Biologische Wirkung:

- induziert Proliferation und Lymphokinproduktion von aktivierten T-Zellen und unreifen Thymozyten

Es wurde gentechnisch aus E. coli K12 hergestelltes Interleukin 2 (Proleukin<sup>®</sup>; Chiron) in der Endkonzentration von 20-50 U/ml verwendet.

## 6 ANTIKÖRPER

Die Antikörper-Stocklösung (BD Biosciences Pharmingen) wird 1:9 mit PBS (siehe V.4.4) verdünnt (Arbeitslösung).

CD-Bez.	Konjugat	Charakterisierung
CD 3	FITC	T-Zellen (assoz. mit TCR $\alpha\beta$ oder $\gamma\delta$ , Signaltransduktion)
CD 4	FITC	T-Helfer/Inducer-Zellen (Rez. für MHC II)
CD 8	FITC	zytotox./Supressor-T-Zellen (Rez. für MHC I), NK-Zellen, Thymozyten
CD 25	FITC	Aktivierte T- und B-Zellen, stimulierte Monozyten und Makrophagen
CD 40	FITC	B-Zellen (Differenzierung), Makrophagen (Zytokinproduktion), folliculäre dendritische Zellen, Endothelzellen, Thrombozyten
CD 56	FITC	NK-Zellen, T-Zellen
CD 154	FITC	Aktivierte CD4 <sup>+</sup> positive T-Zellen (CD40 Ligand); induziert B-Zell-Proliferation und -Aktivierung, Signal für Ig-Sekretion und Ig-Switch
IgG1	FITC/PE	unspezifische Bindung freier Ig

Tabelle 1: verwendete konjugierte Antikörper

## **7 IMMUNASSAYS**

### **7.1 Heparin/PF4-ELISA**

Zum Nachweis von Antikörpern gegen PF4-Komplexe wurde ein Festphasen-Enzymimmunoassay (GTI-PF4 ELISA; Diagast laboratoires) eingesetzt.

## **8 ZELLEN**

### **8.1 K562**

Zur Herstellung der Standardzellpopulation wurde K562 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen Braunschweig), eine humane Erythroleukämie-Zelllinie verwendet.

### **8.2 Patientenzellen**

Es wurden periphere mononukleäre Zellen sowie Thrombozyten von 10 HIT-Patienten, deren Erstdiagnose seit 1990 mittels HIPA und Heparin/PF4-ELISA gesichert worden war, und die zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine immunmodulierende Therapie erhielten, eingesetzt.

### **8.3 Spenderzellen**

Es wurden periphere mononukleäre Zellen sowie Thrombozyten von 5 freiwilligen Spendern, die im Heparin/PF4-ELISA keine Antikörper aufwiesen, und die ebenfalls zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine immunmodulierende Therapie erhielten, eingesetzt.

## **9 SOFTWARE**

Die Arbeit wurde mit Microsoft Word 2003 erstellt. Die Ergebnisauswertung erfolgte mit Microsoft Excel 9.0.

Als Software zur Auswertung der Durchflusszytometriedaten wurde Expo 32.0 verwendet.

## VI Methoden

### 1 ZELLSEPARATION

#### 1.1 Isolierung mononukleärer Zellen (PBMC) aus peripherem Blut

Ausgangspunkt jeder Zellseparation war Citrat-Vollblut in einer Menge von 40 ml. Dieses wurde dann 1:4 mit PBS verdünnt und 20 ml Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PLUS mit 20 ml dieser Suspension in 50 ml-Röhrchen überschichtet und 25 min bei 1200 g ohne Bremse zentrifugiert.

Die peripheren mononukleären Zellen wurden an der Interphase zwischen Plasma und Ficoll vorsichtig abgenommen, zweimal mit PBS gewaschen und in Kulturmedium aufgenommen.

#### 1.2 Plasma-Entnahme

Ein 15 ml-Röhrchen oder eine Monovette mit Vollblut wurden 10 min lang bei 1200 g zentrifugiert, bis sich eine deutliche Plasmaphase erkennen ließ. Aus dieser wurden vorsichtig 2-3 ml Plasma abpipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

#### 1.3 Thrombozyten-Isolation

Mit CPDA (citrate-phosphate-dextrose-adenine) zur Gerinnungshemmung versetztes Vollblut wurde in der Monovette 15 min bei 150 g und Raumtemperatur abzentrifugiert und 2-3 ml plättchenreiches Plasma aus der oberen Phase entnommen, in ein 15 ml-Röhrchen gegeben und auf 10 ml mit PBS aufgefüllt. Nach einem weiteren Waschvorgang wurden die Thrombozyten in RPMI-Medium aufgenommen.

#### 1.4 Zellzahl und Zellvitalität

Zellzahlen wurden mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zu diesem Zweck wurde Zellsuspension entnommen und 1:1 mit Trypanblau-Lösung verdünnt.

Dieser Farbstoff wird von toten Zellen aufgrund ihrer Membrandysfunktion aufgenommen, so dass sich diese im Mikroskop leicht von ungefärbten lebenden Zellen unterscheiden lassen.

Die Zellkonzentration in der Zellsuspension berechnet sich aus der Multiplikation der Zellzahl in einem Eckquadrat (entspricht  $\frac{1}{10}$   $\mu$ l) und dem Verdünnungsfaktor 2 (1:1 Verdünnung mit Trypanblau-Lösung). Durch Multiplikation mit dem Faktor  $1 \times 10^4$  erhält man die Zellzahl/ml Zellsuspension.

### 1.5 Trennung von lebenden und toten Zellen

Da eine zu große Anzahl toter Zellen die Kultur lebender Zellen ungünstig beeinflusst, wurden ggf. mit Hilfe von Ficoll-Trennlösung die toten von lebenden Zellen abgetrennt. Hierzu wurden 5 ml Ficoll in 10 ml Röhrchen vorgelegt und mit 5 ml Zellsuspension überschichtet und 25 min bei 1200 g ohne Bremse zentrifugiert. Lebende Zellen wurden an der Interphase zwischen Medium und Ficoll vorsichtig abgenommen, zweimal mit PBS gewaschen und wieder in Kulturmedium aufgenommen.

## 2 ZELLKULTUREN

### 2.1 Tumorzelllinien (K562)

Tumorzellen ( $1 \times 10^7$ ) wurden in eine 250 ml Kulturflasche mit 50 ml Kulturmedium gegeben. Diese Kulturflaschen wurden zur Inkubation liegend bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> Gasanteil bis zur weiteren Verwendung im Brutschrank aufbewahrt.

### 2.2 Stimulationsversuch: Kultur mit Hep/PF4-Komplex

Patienten und gesunden Spendern wurden 51 ml Blut periphervenös in 6 S-Monovetten CPDA (Sarstedt) entnommen. Aus dem Inhalt einer Monovette wurde zunächst Plasma (siehe VI.1.2), aus dem einer anderen Thrombozyten isoliert (siehe VI.1.3). Das verbliebene Blut wurde mit dem der anderen Monovetten vermischt und eine Isolation von PBMC (siehe VI.1.1) durchgeführt.

Diese PBMC wurden in Kulturmedium aufgenommen und in 96-Loch-Platten in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen/Loch 4 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

Pro Patient erfolgten 4 Ansätze in je 12 Löchern:

- 1) PMBC
- 2) PBMC + Heparin/PF4-Komplex
- 3) PBMC + autologe Thrombozyten ( $1 \times 10^4$ /Loch)
- 4) PBMC + autologe Thrombozyten ( $1 \times 10^4$ /Loch) + Heparin/PF4-Komplex

An Tag 2 erfolgte bei allen Ansätzen die Zugabe von 20 U IL-2/Loch.

An Tag 2 und 4 wurden alle Ansätze nach folgendem Protokoll mit fluoreszenzkonjugierten Antikörpern markiert und am Durchflusszytometer unter Zugabe von Standardzellen gemessen:

- 1) Autofluoreszenz
- 2) IgG1 FITC
- 3) CD 3 FITC / PI
- 4) CD 4 FITC / PI
- 5) CD 8 FITC / PI
- 6) CD 25 FITC / PI
- 7) CD 56 FITC / PI
- 8) CD 154 FITC / PI
- 9) CD 40 FITC / PI

### 2.3 Blockversuch

Der Blockversuch ergänzte den oben beschriebenen Stimulationsversuch um folgende Ansätze:

- 1) PMBC (geblockt)

- 2) PMBC (geblockt) + autologe Thrombozyten ( $1 \times 10^4$ /well) + Hep/PF4-Komplex

Im Blockversuch wurden die PMBC für 30 min bei 21 °C mit einem unkonjugierten Antikörper gegen CD154 in einer Konzentration von 10 µg/ml inkubiert, anschließend gewaschen und erst dann in Kultur genommen. Der übrige Versuchsaufbau sowie die Analyse der Zellen entsprach dem Stimulationsversuch (VI.2.2).

### 2.4 Entnahme von Zellüberständen

An Tag 2 und 4 wurden aus den Ansätzen 1 und 4 des Stimulationsversuches, sowie aus dem Blockversuch die Zellüberstände entnommen. Die Kulturplatten wurden bei 800 g 5 min lang abzentrifugiert und anschließend vorsichtig 100 µl Überstand entnommen. Dieser wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

### 3 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

#### 3.1 Prinzip

Mithilfe der Durchflusszytometrie lassen sich auf Einzelzellebene morphologische Eigenschaften von Zellen ebenso charakterisieren wie die Expression von Oberflächenmolekülen (Immunphäotypisierung).

Im Zytometer werden die Zellen einzeln am Messpunkt in einen Laserstrahl gelenkt. Durch Streuung des Laserlichtes werden sowohl die Zellgröße (forward scatter = FS), als auch die Zellstruktur (side scatter = SS) erfasst.

Zur Bestimmung von Oberflächenantigenen werden die Zellen mit farbstoffgekoppelten Antikörpern inkubiert, deren Fluoreszenzmoleküle durch das Laserlicht zur Lichtemission angeregt werden. Nach Verstärkung durch einen Photomultiplier wird das emittierte Licht durch spezifische Detektoren erfasst, die Messwerte digitalisiert und mittels einer speziellen Software (Expo 32.0) ausgewertet und jedes Ereignis als Punkt in einem Koordinatensystem (Dotplot) dargestellt.

Als Kontrolle dienen sowohl ungefärbte (Autofluoreszenz) als auch mit einem Zweitantikörper gefärbte Zellen (zur Erfassung von unspezifischer Bindung). Zum Nachweis der Koexpression mehrerer Oberflächenmoleküle werden die Zellen simultan mit bis zu vier unterschiedlich markierten Antikörpern inkubiert.

Zur Bestimmung der Quantität wird der Probe eine definierte Menge an Standardzellen zugegeben. Diese lassen sich durch ihre Färbung mit anti-CD3 und Propidiumjodid als homogene Population im Dotplot gut abgrenzen und erlauben so Rückschlüsse auf die Zellzahl der ursprünglichen Probe (siehe VI.3.4).

#### 3.2 Antikörper-Markierung der Zellen

Die Zellen wurden in einer 96-well-Platte (max.  $5 \times 10^5$ /well) bei 350 g 4 min abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 50  $\mu$ l Antikörper-Arbeitslösung resuspendiert und 30 min bei 4 °C inkubiert. Danach folgten zwei Waschvorgänge mit PBS + FCS 2%. Die gewaschenen Zellen wurden in 300  $\mu$ l PBS aufgenommen und in die für das Zytometer vorgesehenen Röhren pipettiert.

#### 3.3 Herstellung von Standardzellen

Zellen der Linie K562 wurden mit PE-konjugiertem anti-CD13, für den diese Zellen zu nahezu 100% positiv sind, in einer Konzentration von 10  $\mu$ l/ $1 \times 10^6$  Zellen 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in PFA 5% auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.

### 3.4 Bestimmung der Proliferationsraten

Zur Bestimmung der Proliferationsraten wurde an den Messtagen Tag 0, 2 und 4 des Stimulations- und Blockversuchs die vorgesehene Antikörper-Markierung unter Zugabe von Propidiumjodid, welches intrazellulär bindet und so avitale Zellen mit durchlässiger Membran kennzeichnet, durchgeführt und die Probe unter Zugabe der definierten Menge Standardzellen im Durchflusszytometer gemessen. Die Berechnung der Proliferationsraten erfolgte aus dem Vergleich der lebenden PBMC-Population im Verhältnis zur Menge der Standardzellen an Tag 0 mit jener an Tag 2 und Tag 4 nach folgender Formel:

$$\begin{aligned} & \text{Standardzellen Tag 0/PBMC Tag 0} \\ & \times \\ & \text{PBMC Tag 2 bzw. Tag 4/Standardzellen Tag 2 bzw. 4} \\ & = \text{Proliferationsrate} \end{aligned}$$

Proliferationsraten von 1,0 entsprechen keiner Änderung des Zellverhältnisses, Proliferationsraten > 1,0 einem entsprechenden Zuwachs an PBMC, Raten < 1,0 einem Absterben von PBMC.

## 4 **ELISA (ENZYME LINKED IMMUNOASSAY)**

### 4.1 Prinzip

Bei dem verwendeten GTI-PF4-ELISA handelt es sich um einen Festphasen-ELISA. Der Boden der Testplatte ist mit einem Komplex aus Plättchenfaktor 4 und Polyvinyl-Sulfanat beschichtet, so dass HIT-Antikörper, die sich in der Patientenprobe befinden, daran binden. Zum Entfernen aller nicht gebundenen Antikörper erfolgen mehrere Waschschrte, danach wird ein mit Alkalischer Phosphatase markiertes IgG/M/A-Konjugat zugefügt. Überschüssiges Konjugat wird wiederum durch Waschvorgänge entfernt, bevor das chromogene Substrat PNPP zugegeben wird. Es entsteht eine Farbreaktion, die nach Abstoppen photometrisch ausgewertet wird.

### 4.2 Auswertung

Es wurden alle entnommenen Zellüberstände der Stimulations- und Blockversuche sowie alle Spender- und Patientenplasmen auf HIT-Antikörper getestet.

## 5 STATISTIK

Es handelt sich um eine explorative Datenanalyse, die zur Generierung neuer Hypothesen dient.

Daher kann im Rahmen der Ergebnisdarstellung nicht von Signifikanzen, sondern lediglich von Tendenzen gesprochen werden. Bei symmetrischer Verteilung der Ergebnisse wurde der arithmetische Mittelwert der Stichprobe bestimmt.

Zur Orientierung dient die Standardabweichung im Intervall  $-2s$  bis  $+2s$ .

## VII Ergebnisse

### 1 STIMULATIONSVERSUCH

#### 1.1 Kinetik Patienten

Im Stimulationsversuch wurden die Oberflächenmarker der stimulierten Patienten-/Spenderzellen an Tag 2 und an Tag 4 analysiert und jeweils mit der unstimulierten Kontrolle verglichen. Bei symmetrischer Verteilung der Ergebnisse wurde der arithmetische Mittelwert der Stichprobe bestimmt. Zur Orientierung dient die Standardabweichung im Intervall  $-2s$  bis  $+2s$ . Der Einsatz anderer explorativer statistischer Testverfahren erschien angesichts des geringen Stichprobenumfangs nicht angemessen.

Für die Patientenzellen unter Zusatz des Stimulationskomplexes ergaben sich an Tag 2 folgende Proliferationsraten: CD3: 1,01, CD4: 1,02, CD8: 1,02, CD25: 0,9. Bei Zugabe des Stimulationskomplexes und autologer Thrombozyten zeigten sich für alle Marker außer CD8 bereits an Tag 2 höhere Werte: CD3: 1,1, CD4: 1,36, CD8: 0,91, CD25: 1,22.

An Tag 4 betragen die Proliferationsraten der mit Antigenkomplex stimulierten Patientenzellen für CD3: 1,43, CD4: 1,46, CD8: 0,94, CD25: 1,99, jene mit Antigenkomplex und autologen Thrombozyten stimulierten für CD3: 1,66, CD4: 1,67, CD8: 0,86, CD25: 2,09. Es ergibt sich somit, wie in den Abbildungen dargestellt, bis Tag 4 ein deutlicher Anstieg des Aktivierungsmarkers CD25 sowie eine Verschiebung des CD4/CD8-Verhältnisses zugunsten der CD4-Expression. Die Unterschiede zwischen den Ansätzen mit und ohne autologe Thrombozyten bestehen insbesondere in einer früheren Reaktion der CD25- sowie CD4-positiven Zellen, sowie in insgesamt höheren Proliferationsraten der CD3- und CD4-positiven Zellen in Anwesenheit der Thrombozyten.

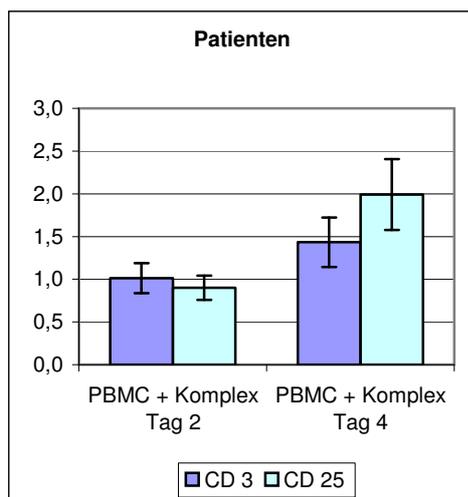


Abb. 5 a

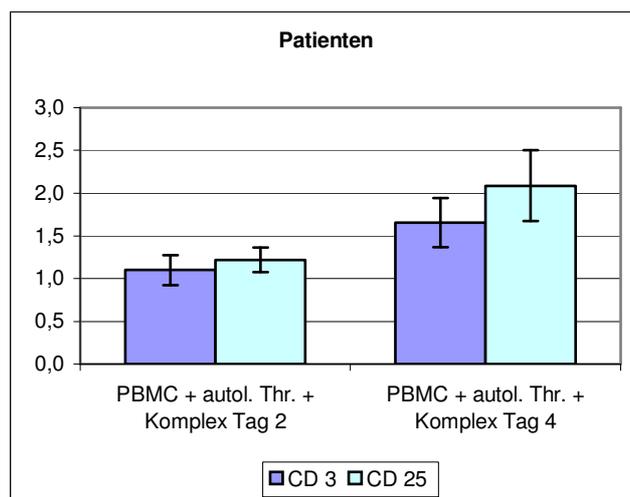


Abb. 5 b

Abb. 5: Proliferationsraten (Y-Achse) von Patientenzellen für CD3 und CD25 an Tag 2 und Tag 4

Abb. 5 a: unter Zusatz des Antigenkomplexes

Abb. 5 b: unter Zusatz des Antigenkomplexes und autologer Thrombozyten

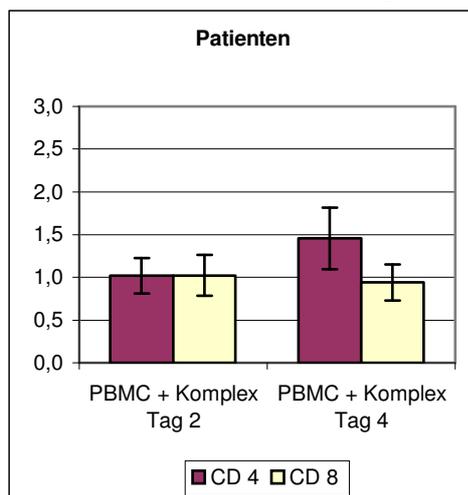


Abb. 6 a

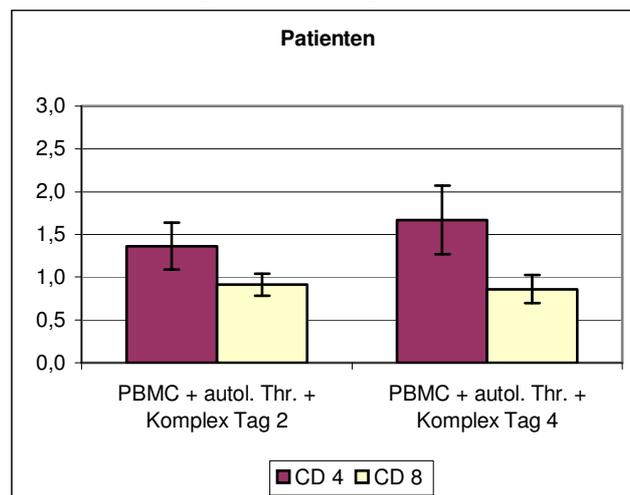


Abb. 6 b

Abb. 6: Proliferationsraten (Y-Achse) von Patientenzellen für CD4 und CD8 an Tag 2 und Tag 4

Abb. 6 a: unter Zusatz des Antigenkomplexes

Abb. 6 b: unter Zusatz des Antigenkomplexes und autologer Thrombozyten

## 1.2 Kinetik Spender

An Tag 2 des Stimulationsversuches ergaben sich für die nur mit Antigenkomplex stimulierten PBMC folgende Proliferationsraten: CD3: 0,63, CD4: 0,66, CD8: 0,69. CD25 war in diesem Ansatz nicht nachweisbar. Im Ansatz mit autologen Thrombozyten und Antigenkomplex zeigten sich für CD3: 0,85, CD4: 0,68, CD8: 0,79, CD25: 0,35. Auch an Tag 4 wurde in keinem Ansatz eine höhere Proliferationsrate als in der Mediumkontrolle erreicht. Nur mit Antigenkomplex stimulierte Spender-PBMC zeigten an Tag 4 für CD3: 0,82, CD4: 0,60, CD8: 0,51, CD25: 0,15. Bei Zugabe von autologen Thrombozyten zeigten sich folgende Ergebnisse: CD3: 0,77, CD4: 0,83, CD8: 0,75, CD25: 0,16.

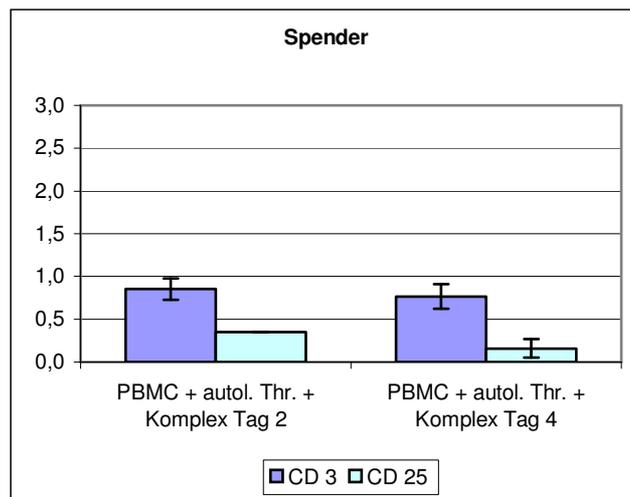
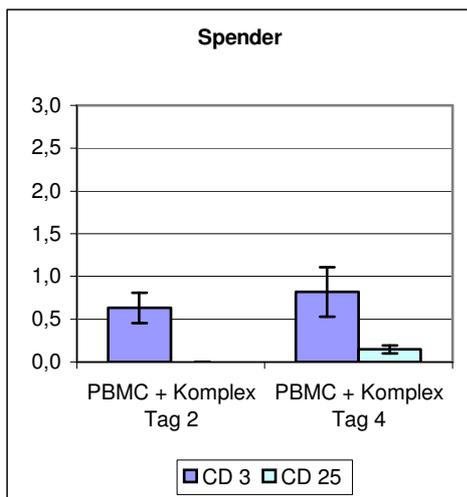


Abb. 7 a

Abb.7 b

Abb. 7: Proliferationsraten (Y-Achse) von Spenderzellen für CD3 und CD25 an Tag 2 und Tag 4

Abb. 7 a: unter Zusatz des Antigenkomplexes

Abb. 7 b: unter Zusatz des Antigenkomplexes und autologer Thrombozyten

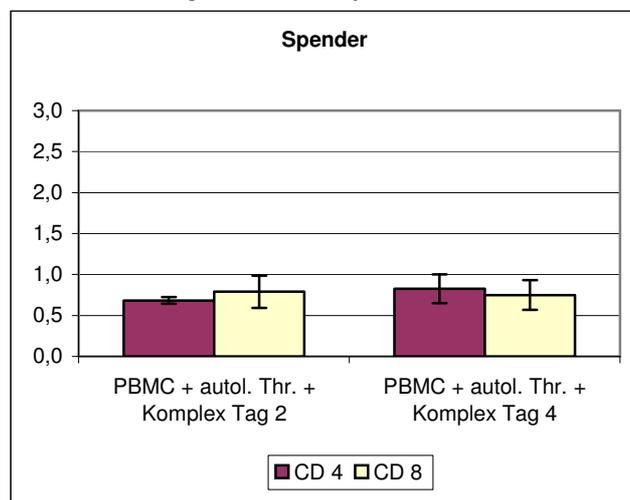
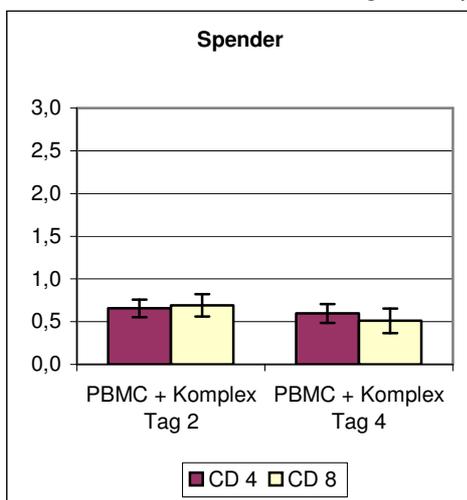


Abb. 8 a

Abb. 8 b

Abb. 8: Proliferationsraten (Y-Achse) von Spenderzellen für CD4 und CD8 an Tag 2 und Tag 4

Abb. 8 a: unter Zusatz des Antigenkomplexes

Abb. 8 b: unter Zusatz des Antigenkomplexes und autologer Thrombozyten

### 1.3 Kontrollen

In den zur Kontrolle durchgeführten Stimulationsansätzen mit autologen Thrombozyten alleine, Heparin alleine und Plättchenfaktor 4 alleine wurden bis auf wenige Ausnahmen die Proliferationsraten der unstimulierten Kontrolle nicht um mehr als 5% übertroffen, so dass die Ergebnisse hier lediglich tabellarisch dargestellt werden. (n.n. = nicht nachweisbar)

Ansatz und Oberflächenmoleküle		Tag 2	Tag 4
Patienten PBMC + autol. Thr.	CD3	0,69	0,79
	CD4	0,81	1,02
	CD8	0,84	0,86
	CD25	0,8	1,04
Patienten PBMC + Heparin	CD3	0,88	1,02
	CD4	0,88	1,06
	CD8	0,85	0,99
	CD25	0,99	1,06
Patienten PBMC + PF4	CD3	0,74	0,84
	CD4	0,77	0,86
	CD8	0,77	0,96
	CD25	1,01	1,02
Spender PBMC + autol. Thr.	CD3	0,58	0,92
	CD4	0,65	0,86
	CD8	0,78	0,80
	CD25	n.n.	0,85
Spender PBMC + Heparin	CD3	n.n.	0,82
	CD4	n.n.	0,99
	CD8	n.n.	0,98
	CD25	n.n.	0,75
Spender PBMC + PF4	CD3	n.n.	0,97
	CD4	n.n.	0,98
	CD8	n.n.	0,93
	CD25	n.n.	0,50

Tabelle 2: Kontrollen mit den Einzelkomponenten des Stimulationsversuchs

## 2 VERGLEICHENDE ANALYSE DER OBERFLÄCHENMOLEKÜLE

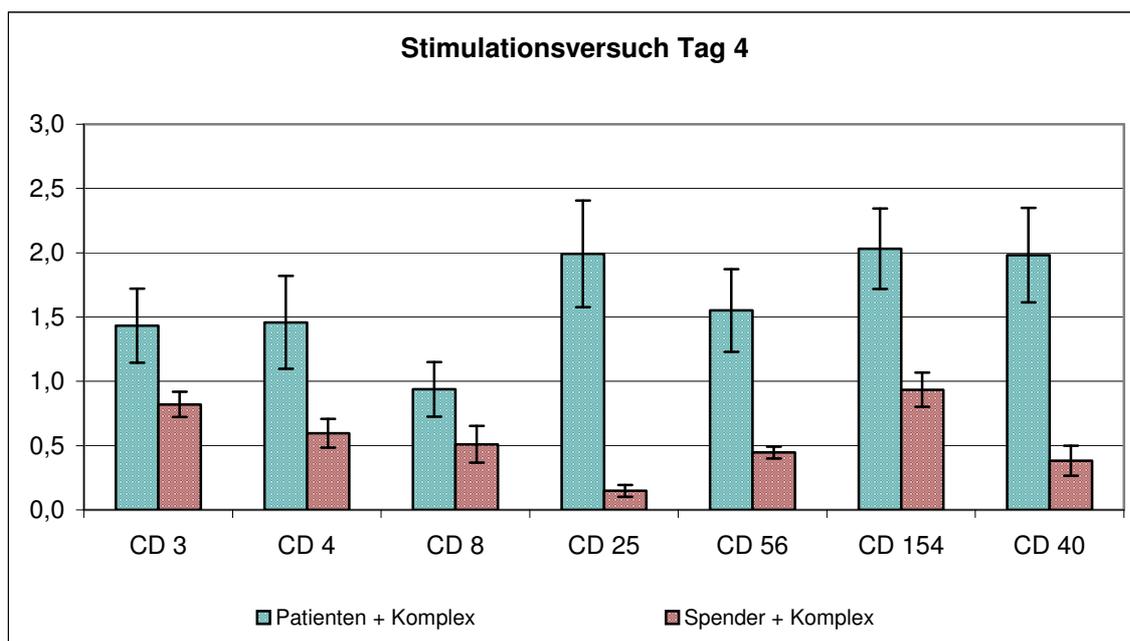


Abb. 9: (a) Proliferationsraten (Y-Achse) bei Stimulation mit Antigenkomplex im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Proliferationsrate 1,0)

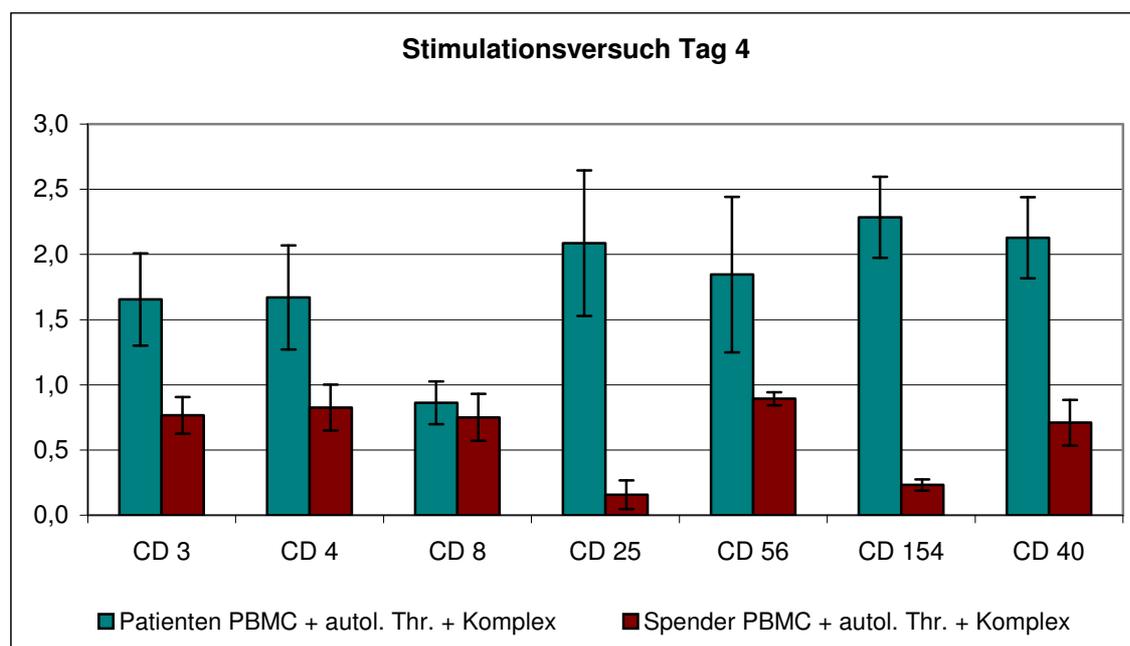


Abb. 9: (b) Proliferationsraten (Y-Achse) bei Stimulation mit Antigenkomplex und autologen Thrombozyten im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Proliferationsrate 1,0)

Die Immunphänotypisierung an Tag 4 zeigte, welche Oberflächenmoleküle nach vier Tagen Stimulation mit Antigenkomplex jeweils mit oder ohne Zugabe von autologen Thrombozyten von den eingesetzten peripheren mononukleären Zellen exprimiert wurden. Der Vergleich erfolgte zur unstimulierten Kontrolle und zwischen Patienten- und Spenderzellen.

Die Stimulation der Patientenzellen mit Heparin/PF4-Komplex alleine führte nach 4 Tagen zur deutlichen Vermehrung jener Zellen, die die Oberflächenmoleküle CD3, CD4, CD25, CD56, CD154 und CD40 trugen, nicht jedoch derer, die CD8 exprimierten. Bei den nur mit Heparin/PF4-Komplex stimulierten Zellen gesunder Spender ließ sich dagegen eine Verminderung aller für die bestimmten Oberflächenmoleküle positiven Zellen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle feststellen.

Ebenfalls ergab sich an Tag 4 für die mit autologen Thrombozyten und Antigenkomplex stimulierten Spenderzellen eine homogene Verminderung aller Gruppen. Bei den Patientenzellen in diesem Ansatz zeigte sich jedoch eine Population, die für alle bestimmten Oberflächenmarker bis auf CD8 eine deutlich höhere Proliferation als der Kontroll-Ansatz aufwies: CD3: 1,66 vs. 0,77, CD4: 1,67 vs. 0,83, CD8: 0,86 vs. 0,75, CD25: 2,09 vs. 0,16, CD56: 1,85 vs. 0,89, CD154: 2,29 vs. 0,23, CD40: 2,13 vs. 0,71.

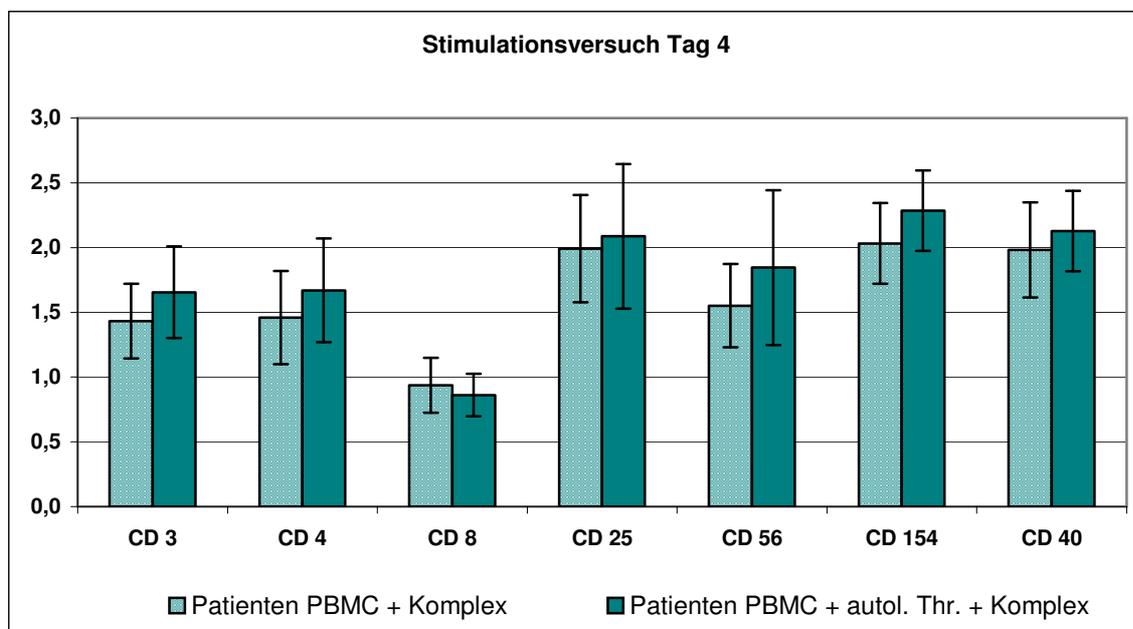


Abb. 10: Proliferationsraten (Y-Achse) bei Stimulation der Patienten PBMC mit Antigenkomplex alleine und Antigenkomplex und autologen Thrombozyten im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (Proliferationsrate 1,0).

Vergleicht man in Abb. 10 die Proliferationsraten der Patientenzellen in beiden Stimulationsansätzen, so wird eine geringe Tendenz zu höheren Proliferationsraten für CD3, CD4, CD25, CD56, CD154 und CD40 im Ansatz mit autologen Thrombozyten und Antigenkomplex erkennbar.

### 3 BLOCKVERSUCH

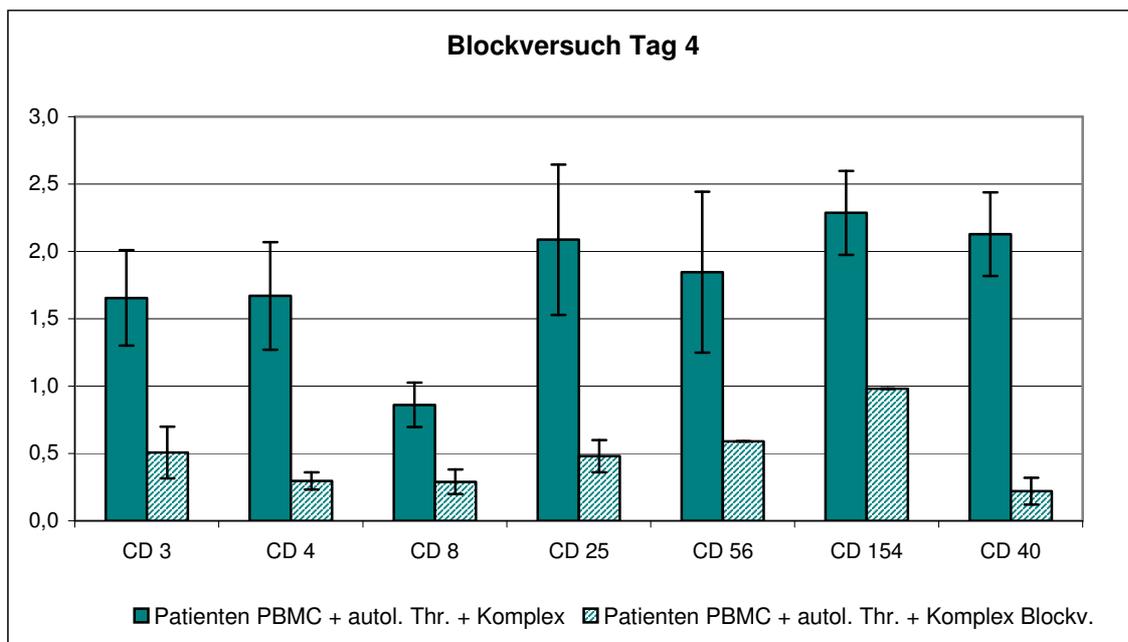


Abb. 11: Proliferation der mit autologen Thrombozyten und Antigenkomplex stimulierten Patientenzellen an Tag 4 ohne und mit Blockung mit anti-CD154

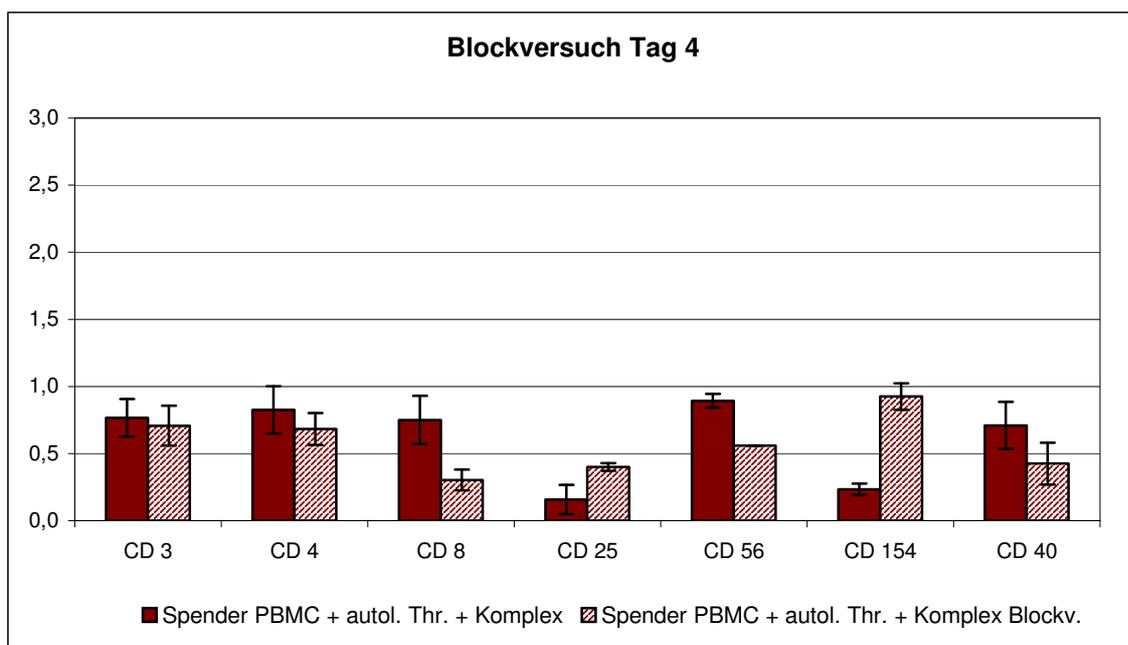


Abb. 12: Proliferation der mit autologen Thrombozyten und Antigenkomplex stimulierten Spenderzellen an Tag 4 ohne und mit Blockung mit anti-CD154

Im Blockversuch wurde der Stimulationsansatz mit autologen Thrombozyten und Antigenkomplex mit zuvor mit anti-CD154-Antikörpern inkubierten PBMC durchgeführt. An Tag 4 wurden wiederum die Proliferationsraten im Verhältnis zur unstimulierten Mediumkontrolle bestimmt.

Abbildung 11 zeigt den Vergleich der geblockten mit den nicht geblockten PBMC der HIT-Patienten. Es ergaben sich für CD3: 1,66 vs. 0,51, für CD4: 1,67 vs. 0,30, für CD8: 0,86 vs. 0,29, für CD25: 2,09 vs. 0,48, für CD56: 1,85 vs. 0,59, für CD154: 2,29 vs. 0,98 und für CD40: 2,13 vs. 0,22.

In Abbildung 12 sind die Proliferationsraten der Spenderzellen im Blockversuch dargestellt. Zwischen den Ansätzen mit geblockten und nicht geblockten Zellen zeigten sich geringere Unterschiede bei insgesamt fehlender Proliferation: CD3: 0,77 vs. 0,71, CD4: 0,83 vs. 0,68, CD8: 0,75 vs. 0,30, CD25: 0,16 vs. 0,40, CD56: 0,89 vs. 0,56, CD154: 0,23 vs. 0,93, CD40: 0,71 vs. 0,43.

#### 4 ELISA

	Plasma	Medium-Kontrolle	+ Komplex	+ Kompl. + autol. Thr.	Medium-Kontrolle	+ Komplex	+ Kompl. + autol. Thr.
		Tag 2	Tag 2	Tag 2	Tag 4	Tag 4	Tag 4
Patient 1	+	-	-	-	-	-	-
Patient 2	+	-	-	-	-	-	-
Patient 3	+	-	-	-	-	-	-
Patient 4	+	-	-	-	-	-	-
Patient 5	+	-	-	-	-	-	-
Patient 6	+	-	-	-	-	-	-
Patient 7	+	-	-	-	-	-	-
Patient 8	+	-	-	-	-	-	-
Patient 9	+	-	-	-	-	-	-
Patient 10	+	-	-	-	-	-	-
Spender 1	-	-	-	-	-	-	-
Spender 2	-	-	-	-	-	-	-
Spender 3	-	-	-	-	-	-	-
Spender 4	-	-	-	-	-	-	-
Spender 5	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 3: qualitative Auswertung des ELISA auf Antikörper gegen den Heparin/PF4-Komplex

Der ELISA auf Antikörper gegen den Heparin/PF4-Komplex wurde zunächst mit dem unbehandelten Plasma der Patienten und Spender durchgeführt; hierbei ergab sich, wie in Tabelle 3 dargestellt, ein positives Ergebnis für alle Patientenplasmen. In den Plasmen der gesunden Spender ließen sich dagegen keine Antikörper gegen den Antigenkomplex nachweisen. Ebenso ließen sich in keinem der an Tag 2 und Tag 4 entnommenen Zellüberstände der Kontroll- und Stimulationsansätze Antikörper im ELISA nachweisen.

## VIII Diskussion

### 1 **STIMULATIONSVERSUCH, VERGLEICHENDE ANALYSE DER OBERFLÄCHENMOLEKÜLE, BLOCKVERSUCH**

Mithilfe der vorstehend beschriebenen Resultate lassen sich folgende Punkte genauer betrachten:

- die Möglichkeit, periphere mononukleäre Zellen bekannter HIT-Patienten in vitro durch den Antigenkomplex zu stimulieren
- die Art der proliferierenden Zellen
- die mögliche Interaktion der proliferierenden Zellen
- die Rolle des zur Hemmung der Reaktion eingesetzten anti-CD154-Antikörpers

#### 1.1 Proliferation von Patienten-PBMC bei Reexposition in vitro

Um die in vivo Situation in vitro möglichst genau nachstellen zu können, wurden PBMC statt isolierter Lymphozyten verwendet. So konnte in den durchgeführten Experimenten gezeigt werden, dass sich PBMC von HIT-Patienten in vitro durch den Heparin/PF4-Komplex zur Proliferation stimulieren ließen, während dies mit Zellen gesunder Spender nicht gelang.

Bereits im Jahre 1999 demonstrierten Bacsı et alii eine solche Stimulation, als diese Gruppe an Lymphozyten zweier HIT-Patienten den T-Zell-Rezeptor untersuchte (Bacsı et al., 1999). Es wurde die gleiche Menge an Heparin und PF4 zur Herstellung des Antigenkomplexes verwendet, allerdings wurden die Zellen über einen Zeitraum von 14 Tagen inkubiert und ausschließlich isolierte T-Zellen verwendet.

Folglich scheint es sich bei der Pathogenese der HIT um eine Immunreaktion zu handeln, welche bei Wiedererkennen des Antigens erneut abgerufen werden und in vitro mit den Komponenten periphere mononukleäre Zellen, Heparin und Plättchenfaktor 4 nachgestellt werden kann.

#### 1.2 Abhängigkeit der Proliferation vom Antigenkomplex

Die Proliferation der zugefügten Zellen zeigte sich deutlich abhängig von der Anwesenheit des Antigenkomplexes; weder Heparin noch Plättchenfaktor 4 alleine lösten eine Proliferation aus. Dies deutet auf ein Wiedererkennen des bekannten Antigens durch spezifische Abwehrzellen hin.

Zwar bestand eine konsequente, jedoch geringe Tendenz zu höheren Proliferationsraten bei der Zugabe von Antigenkomplex und autologen Thrombozyten, allerdings erfolgte die Stimulation offensichtlich auch allein über den Heparin/PF4-Komplex. Dies ist insofern erklärlich, als dass die Immunreaktion als solche über ein Erkennen des Antigens abläuft, an welchem die Thrombozyten keinen Anteil haben. Allerdings dürfte die Anwesenheit der Thrombozyten die Reaktion insofern beschleunigen, als möglicherweise auch in vitro plättcheneigenes PF4 ausgeschüttet wird, was Gegenstand weiterer Untersuchungen sein sollte.

### 1.3 T-Zell-Aktivierung und vorrangige Beteiligung von T-Helferzellen

In der vergleichenden Analyse der Oberflächenmoleküle der stimulierten Patientenzellen an Tag 4 erkennt man, dass insbesondere CD3- und CD4-positive T-Zellen proliferierten. Das CD4/CD8-Verhältnis verschob sich deutlich zugunsten der CD4-positiven Zellen, wie es die Pathogenese der HIT Typ II vermuten lässt: Da es in vivo zur Antikörperproduktion kommt, wird dieser eine Interaktion der B-Zelle mit einer T-Helfer-Zelle vorausgehen. Das Ergebnis entspricht den Resultaten von Bacsi et alii (Bacsi et al., 1999), die ebenfalls nach Stimulation mit dem Antigenkomplex proliferierende Helferzellen beobachteten.

Desweiteren erhöhte sich die Expression des Oberflächenmoleküls CD25 (Aktivierungsmarker); dies lässt auf eine Aktivierung der T-Zellen und Hochregulation des IL-2-Rezeptors insbesondere an Tag 4 schließen. Dies ließ sich trotz der Zugabe von IL-2 zu allen Ansätzen lediglich in jenen mit zugefügten Patientenzellen nachweisen.

Liu, C.Y. et alii konnten 2005 in mehreren Stimulationsreihen zeigen, dass regulatorische T-Zellen (CD4+CD25+) sowohl von HIT-Patienten als auch von gesunden Spendern durch PF4 oder den Heparin/PF4-Komplex in gleicher Konzentration wie in unseren Versuchen zur Proliferation angeregt werden können. Leider findet sich in ihrer Beschreibung keine klare Angabe, ob ein Unterschied zwischen gesunden Spendern und HIT-Patienten auszumachen ist, so wie es in den hier vorgestellten Experimenten der Fall war (Liu, C.Y. et al., 2005). Suvarna et alii zeigten ebenfalls im Jahr 2005 in einem Mausmodell, dass die Produktion spezifischer Antikörper gegen Heparin/PF4-Komplexe grundsätzlich T-Zell-abhängig ist (Suvarna et al., 2005). In welchem Maß regulatorische T-Lymphozyten Einfluss auf die Pathogenese der Heparin-induzierten Thrombopenie nehmen und welche Form dieser Einfluss hat, wird Gegenstand weiterer Studien sein müssen, zumal sich die

Hinweise auf ihre Beteiligung auch bei anderen Autoimmunerkrankungen mehrten (Paust und Cantor, 2005).

#### 1.4 Einfluss von PF4 auf die T-Zell-Proliferation

Konsens herrscht in der aktuellen Literatur über den hemmenden Einfluss von PF4 auf die Proliferation CD3-positiver Zellen (Fleischer et al. 2002; Liu, C.Y. et al., 2005). In der hier vorgelegten Arbeit war dieser bei Verwendung des Heparin/PF4-Komplex nicht nachweisbar. Auch in den Kontrollen mit PF4 alleine zeigte sich weder bei Patienten- noch bei Spenderzellen eine deutliche Einschränkung der Proliferation. Allerdings wurden in den Untersuchungen von Fleischer und C.Y. Liu jeweils isolierte T-Zellen verwendet, die keine Möglichkeit zur Interaktion mit anderen peripheren mononukleären Zellen hatten, während dies in unseren Zellkulturen der Fall war.

#### 1.5 Interaktion der beteiligten Zellen

Die Zell-Interaktion lässt sich anhand der ausgeprägten Expression von CD154 und CD40 auf den an Tag 4 untersuchten PBMC der HIT-Patienten zwischen Helferzellen und B-Lymphozyten zeigen. Die Einflüsse des Ligandenpaars CD40 und CD154 sind Gegenstand vieler älterer und neuer Untersuchungen (Nonoyama et al., 1993, Cerruti et al., 1998, Grewal und Flavell, 1998, Fecteau und Néron, 2003, Meabed et al., 2007) und keineswegs in ihrer Komplexität gänzlich verstanden. Klare Hinweise finden sich aber für den Einfluss der Interaktion zwischen T-Lymphozyten und B-Lymphozyten auf B-Zell-Proliferation, die Produktion von Immunglobulinen (Nonoyama et al., 1993) und die Entstehung von Gedächtniszellen (Grewal und Flavell, 1998). Auch bei Reexposition gegenüber einem bekannten Antigen scheint das Ligandenpaar CD40-CD154 eine entscheidende Rolle bei der Reaktivierung von Gedächtniszellen zu spielen (Fecteau und Néron, 2003). Insofern halten wir die hohe Expression beider Oberflächenmoleküle an Tag 4 des Stimulationsversuches für einen Hinweis auf die bei der HIT zur Antikörperproduktion führende Zusammenarbeit zwischen T- und B-Lymphozyten oder anderen Antigen-präsentierenden Zellen.

Aufgrund nicht ausreichender Zellmengen konnte kein Nachweis über doppelt-positive Zellen geführt werden, so dass nicht mit letzter Sicherheit gesagt werden kann, dass sich das nachgewiesene CD154 tatsächlich auf den T-Lymphozyten und das CD40 auf den B-Lymphozyten befand. Es handelt sich jedoch um die zu postulierenden Zellgruppen nach Isolation und Antigen-Stimulation peripherer mononukleärer Zellen. CD154 wurde zwar zusätzlich auch auf Thrombozyten nachgewiesen (Grewal und Flavell, 1998), und bei Patienten mit chronisch

entzündlichen Darmerkrankungen konnten erhöhte Spiegel des allerdings löslichen CD154 auf die Ausschüttung durch aktivierte Thrombozyten zurückgeführt werden (Danese et al., 2003), aber da auch in den Ansätzen ohne Thrombozyten eine ähnliche Expression wie in jenen mit Plättchen gemessen wurden, scheiden Thrombozyten als hauptsächliche Träger des CD154-Moleküls in unseren Versuchen aus.

Neuere Untersuchungen zeigen bei HIT-Patienten im akuten Stadium ihrer Erkrankung sowohl hohe Werte des C-reaktiven-Proteins als auch des löslichen CD154 (Kannan et al., 2005), und obwohl das auslösende Antigen bei der HIT Typ II kein reines Autoantigen darstellt, besteht in der Pathogenese ab dem Zeitpunkt der Erkennung des Heparin/PF4-Komplexes als Antigen und der CD40-CD154-Interaktion offensichtlich eine Parallele zu verschiedenen Autoimmunerkrankungen, bei denen ebenfalls eine Überexpression von CD154 nachgewiesen werden konnte: Systemischer Lupus Erythematoses (Koshy et al., 1996), Rheumatoide Arthritis (Kyburz et al., 1999, Wang und Liu, M.F., 2003, Wagner et al., 2004), Multiple Sklerose (Filion et al., 2003), Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Liu, Z. et al., 1999, Danese et al., 2003, Polese et al., 2005), chronische Urtikaria (Toubi et al., 2000) und Abstoßungsreaktionen von allogenen Nierentransplantaten (Lederer et al., 2004, Quezada et al., 2005). Diese Resultate führten bereits zur Prüfung verschiedener monoklonaler Antikörper (Kim et al., 1998) gegen CD154 als therapeutische Option bei jenen Erkrankungen (Davis et al., 2001, Toubi und Shoenfeld, 2004). Die hohe Rate an thrombembolischen Ereignissen unter der Therapie machte jedoch den Abbruch dieser Studien notwendig (Buhler et al., 2001, Koyama et al., 2004).

Einen weiteren Hinweis auf eine CD40-CD154-Interaktion bei einer hämatologischen Autoimmunerkrankung erbrachten die aktuellen Untersuchungen von Meabed et al., die bei dreißig pädiatrischen Patienten mit einer akuten und dreißig erwachsenen Patienten mit einer chronischen Idiopathischen Thrombozytopenischen Purpura eine deutlich erhöhte Expression von CD154 auf CD4-positiven T-Zellen sowie CD40 auf CD19-positiven B-Zellen im peripheren Blut feststellten (Meabed et al., 2007).

#### 1.6 Hemmung der Reaktion durch einen anti-CD154-Antikörper

Der Blockversuch wurde aufgrund der begrenzten zur Verfügung stehenden Zellmengen lediglich im Ansatz mit autologen Thrombozyten und Antigenkomplex durchgeführt, da in jenem Ansatz, der der Situation in vivo am nächsten ist, die

Proliferationsraten am höchsten waren. Beim Versuch, die Proliferation CD4-positiver T-Zellen im in vitro-Modell der HIT Typ II durch anti-CD154 zu hemmen, zeigt sich tatsächlich durch die Vorbehandlung mit dem blockierenden monoklonalen Antikörper eine Einschränkung der Proliferation in etwa auf das Niveau der nicht stimulierten Kontrolle. Eine Reexposition gegenüber diesem den Patientenzellen bekannten Antigen scheint also unter Einwirkung von anti-CD154 ohne Aktivierung der im Stimulationsversuch nachgewiesenen T-Zellen zu bleiben. Das Ergebnis des Blockversuchs bestätigt somit die entscheidende Rolle der CD40-CD154-Interaktion für die in vitro Aktivierung und Reaktivierung spezifischer T-Helferzellen von HIT-Patienten. Bei den Zellen gesunder Spender zeigt sich im Blockversuch eine insgesamt reduzierte Proliferation, jedoch mit der Ausnahme einer gesteigerten Proliferation CD154-positiver Zellen. Aufgrund der insgesamt allerdings geringen Expression muss dieses Einzelergebnis zurückhaltend bewertet werden und entspricht am ehesten einer Kontamination. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Reaktion der Patientenzellen auf das stimulierende Antigen durch die Vorbehandlung mit anti-CD154 weitaus deutlicher eingeschränkt wird als jene der Spenderzellen, die ohnehin weder im Stimulationsversuch noch im Blockversuch eine Proliferationstendenz aufwiesen.

## **2 ELISA**

Der ELISA der Patienten- und Spenderplasmen diente in erster Linie zur Sicherung der korrekten Auswahl der Patienten und Spender und ergab wie erwartet bei allen Patienten vorhandene Antikörper gegen den Heparin/PF4-Komplex im Plasma, die Auswahl der Patienten war auch anhand eines positiven HIPA-Test und des positiven ELISAs zum Zeitpunkt der Diagnosestellung erfolgt. Die Plasmen der gesunden Spender, die anamnestisch nie Heparin erhalten hatten, waren negativ. Um zu überprüfen, inwieweit die in vivo Situation nachgestellt werden kann, erfolgte auch eine Untersuchung der Zellüberstände aller Stimulationsansätze.

Das negative Resultat in allen Zellüberständen auch des Stimulationsversuchs kann im Wesentlichen zwei verschiedene Gründe haben: Es besteht die Möglichkeit, dass in vitro trotz Aktivierung spezifischer Lymphozyten durch den Antigenkomplex tatsächlich keine Antikörperproduktion stattfand, da es möglicherweise durch die CD40-CD154-Interaktion zwar zur Aktivierung der spezifischen Lymphozyten, jedoch nicht zur Ausreifung zu Antikörper produzierenden Plasmazellen kam. Eine solche Ausreifung hätte neben den Zytokinen IL10 und IL6 auch die Stimulation der B-Zellen

über CD27-CD70 erfordert (Agematsu et al., 1998). Da der Stimulationsversuch ursprünglich nicht auf die Frage nach Plasmazellen angelegt war, aber auf festgelegten Zellmengen basierte, ließ sich in dieser Versuchsreihe diese Frage nicht beantworten, jedoch wird sie Gegenstand weiterer Experimente sein.

Falls in der Kultur eine Ausdifferenzierung zu Antikörper produzierenden Zellen stattgefunden hat, kann diese insgesamt nur sehr gering gewesen sein, so dass eine mögliche Antikörperproduktion eventuell zu gering und damit im ELISA nicht detektierbar war.

## **IX Zusammenfassung**

Der Einsatz von Heparin in der Prophylaxe und Therapie thrombembolischer Ereignisse gilt als erprobt, kostengünstig und effektiv. Die Heparin-induzierte Thrombopenie ist neben schweren Blutungskomplikationen die gefährlichste der bekannten unerwünschten Wirkungen, bei der im Gegensatz zu anderen medikamentös induzierten Thrombopenien, die zumeist über Hapten-Bildung ausgelöst werden, die Bildung spezifischer Antikörper im Vordergrund steht. Die daraus folgenden therapeutisch denkbaren Möglichkeiten mit Immunsuppressiva machen die HIT Typ II zu einem interessanten Gegenstand der Forschung. Obwohl eine allgemein akzeptierte Theorie zur Pathogenese existiert, ist die genauere Beteiligung des zellulären Immunsystems weitgehend unbekannt.

In der vorgelegten Arbeit wurde den Fragen nachgegangen, inwieweit sich die immunologische Reaktion bei Reexposition *in vitro* nachvollziehen lässt, welche Zellen des Immunsystems vorrangig beteiligt sind und ob eine Zell-Interaktion insbesondere der Lymphozyten nachweisbar ist und zur Bildung der spezifischen Antikörper führt.

Zunächst konnte in den durchgeführten Experimenten gezeigt werden, dass sich PBMC von HIT-Patienten *in vitro* durch den Heparin/PF4-Komplex zur Proliferation stimulieren lassen, während dies mit Zellen gesunder Spender nicht gelang, so dass die wesentliche pathogenetische Reaktion sich tatsächlich *in vitro* nachstellen lässt.

Um die Beteiligung von Zellen des Immunsystems näher zu charakterisieren, wurden periphere mononukleäre Zellen (PBMC) von zehn Patienten mit klassischer HIT Typ II und von 5 gesunden Spendern isoliert und mit Heparin/PF4-Komplex, PF4, Heparin und nur mit Medium 4 Tage lang sowohl in An- als auch Abwesenheit von autologen Thrombozyten kultiviert. Hierbei konnten wir eine leichte Proliferation von CD4-positiven T-Zellen an Tag 4 des Stimulationsversuchs mit autologen Thrombozyten und Heparin/PF4-Komplex feststellen, während keine Proliferation von CD8-positiven T-Zellen gezeigt werden konnte. Wir beobachteten eine deutliche Aktivierung der CD4-positiven T-Zellen mit einer Hochregulation der Aktivierungsmarker CD25 sowie CD154. Hierzu passend konnte eine Zunahme von CD40 auf Zellen, die wir für antigenpräsentierende Zellen halten, gemessen werden. CD154 wirkt als ein Mediator bei T-Zell-abhängiger B-Zell-Aktivierung, Proliferation und Differenzierung. Im

Gegensatz zu diesem Versuchsansatz konnten wir keine dieser Reaktionen bei der Verwendung von PBMC gesunder Spender beobachten.

Aufgrund unserer Ergebnisse aus dem Stimulationsversuch und weil es sich bei CD154 um einen potenten Modulator physiologischer Prozesse, wie zum Beispiel T-Zell-vermittelter Effektorfunktionen handelt, postulierten wir eine Beteiligung aktivierter T-Helferzellen an der HIT-Pathogenese. Um diese Hypothese zu beweisen, erweiterten wir den Stimulationsversuch, indem wir CD154 mit einem monoklonalen Antikörper vor der Kultur auf den peripheren mononukleären Zellen blockten. Wir beobachteten hierbei eine weit geringere Proliferation CD40-positiver Zellen, sowie eine fehlende T-Zell-Aktivierung.

Das Ergebnis des Blockversuchs bestätigt somit die entscheidende Rolle der CD40-CD154-Interaktion für die *in vitro* Aktivierung und Reaktivierung spezifischer T-Helferzellen von HIT-Patienten.

Mittels eines spezifischen ELISA ließ sich trotz der deutlichen Aktivierung keine Antikörperproduktion nachweisen, da es möglicherweise durch die CD40-CD154-Interaktion zwar zur Aktivierung der spezifischen Lymphozyten, jedoch nicht zur Ausreifung zu Antikörper produzierenden Plasmazellen kam.

Unsere Ergebnisse bestätigen die bisherige Auffassung der HIT-Pathogenese als spezifische immunologische Reaktion und zeigen mit der Proliferation aktivierter T-Lymphozyten und der CD40-CD154-Interaktion weitere interessante Details der autoimmunologisch vermittelten Pathogenese auf.

## **X        Summary**

The use of Heparin in prophylaxis and therapy of thrombembolic events is regarded as proved, economical and effective. Heparin-induced thrombocytopenia is the most dangerous of the known adverse events besides severe bleeding complications. In contrast to other drug-induced thrombocytopenias which are caused by haptent-formation, HIT is characterized by production of specific antibodies. Because of the conceivable therapeutic options with immunosuppressiva HIT Type II becomes an interesting object of research. Although there exists an accepted theory of the pathogenesis, the more particular contribution of the cellular immune system is still unknown. In our investigations we considered how far the immunological reaction can be established in vitro, which immune cells are mainly involved and if an interaction between lymphocytes can be observed and leads to production of specific antibodies. To characterize T-cell involvement peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from ten patients with classical HIT and five healthy donors were obtained and cultivated with heparin/PF4 complexes, PF4 alone, heparin alone and medium alone in the presence or absence of autologous thrombocytes. Thereby we could detect a slightly proliferation of CD4+ T-cells on day 4 of co-culture with autologous thrombocytes and the heparin/PF4 complexes whereas no proliferation of CD8+ T-cells could be noted. Impressively we could observe a bright activation of these CD4+ T-cells defined by an upregulation of the activation molecule CD25 as well as CD154. Suitably we could detect an upregulation of CD40 on non-T-cells, which we postulate to be antigen-presenting cells. CD154 (CD40L) is functioning as a mediator of T cell-dependent B cell activation, proliferation and differentiation. In contrast to this culture, we couldn't observe any of these reactions by using PBMC of healthy donors.

Because CD154 modulates physiologic processes, such as T cell mediated effector functions, we postulated an involvement of activated T-helper-cells in the pathogenesis of HIT.

With a view to proof this hypothesis we extended our first assay by blocking CD154 with a monoclonal antibody on PBMC before culture. As a result we observed less proliferation of CD40-positive cells as well as a lacking of T-cell activation.

The results of this blocking assay confirm the decisive role of CD40-CD154-interaction in activation and reactivation of specific T-helper-cells of HIT-patients.

Despite the clear cell activation there could not be found a production of antibodies in a specific ELISA. CD40-CD154-interaction might have lead to activation of specific lymphocytes, but not to maturation of antibody producing plasma cells.

Our results confirm the actual opinion of HIT-pathogenesis as a specific immunological reaction and show further interesting details of the autoimmunological pathogenesis with the proliferation of activated T-cells and the interaction of CD40 and its ligand CD154.

**XI      Literaturverzeichnis**

Agematsu, K., Nagumo, H., Oguchi, Y., Nakazawa, T., Fukushima, K., Yasui, K., Ito, S., Kobata, T., Morimoto, C., Komiyama, A.:

Generation of Plasma Cells From Peripheral Blood Memory B Cells: Synergistic Effect on Interleukin-10 and CD27/CD70 Interaction

Blood, 1998, 91: 173-180

Ahmad, S., Untch, B., Haas, S., Hoppensteadt, D.A., Misselwitz, F., Messmore, H.L., Walenga, J.M., Fareed, J.:

Differential prevalence of anti-heparin-PF4 immunoglobulin subtypes in patients treated with clivarin and heparin: Implications in the HIT pathogenesis

Molecular and Cellular Biochemistry, 2004, 258: 163-170

Bacsi, S., De Palma, R., Visentin, G.P., Gorski, J., Aster, R.H.:

Complexes of Heparin and Platelet Factor 4 Specifically Stimulate T Cells From Patients With Heparin-induced Thrombocytopenia/Thrombosis

Blood, 1999, 94: 208-215

Bernhard, H., Meyer zum Büschenfelde, C., Kolb, H.-J., Peschel, C.:

Adoptiver Transfer von malignomreaktiven T-Zellen

Der Onkologe, 1999, 5: 688-694

Buhler, L., Alwayn, I.P.J., Apple, J.Z., Robson, S.C., Cooper, D.K.C.:

Anti-CD154 monoclonal Antibody and Thromboembolism

Transplantation, 2001, 71: 491

Burmester, G.-R., Pezzuto, A.:

Grundlagen

In: Taschenatlas der Immunologie

Georg Thieme Verlag 1998 Stuttgart New York: 2-63

Castelli, R., Cassinerio, E., Cappellini, M.D., Porro, F., Graziadei, G., Fabris, F.:  
Heparin induced thrombocytopenia: pathogenetic, clinical, diagnostic and  
therapeutic aspects

Cardiovascular Hematological Disorders Drug Targets, 2007, 7: 153-162

Cerutti, A., Zan, H., Schaffer, A., Bergsagel, L., Harindranath, N., Max, E.E.,  
Casali, P.:

CD40 Ligand and Appropriate Cytokines Induce Switching to IgG, IgA, and IgE  
and Coordinated Germinal Center and Plasmacytoid Phenotypic Differentiation  
in a Human Monoclonal IgM+IgD+ B Cell Line

The Journal of Immunology, 1998, 160: 2145-2157

Danese, S., Katz, J.A., Saibeni, S., Papa, A., Gasbarrini, A., Vecchi, M., Fiocchi,  
C.:

Activated platelets are the source of elevated levels of soluble CD40 ligand in  
the circulation of inflammatory bowel disease patients

Gut, 2003, 52: 1435-1441

Davis, J.C. Jr., Totoritis, M.C., Rosenberg, J., Sklenar, T.A., Wofsy, D.:

Phase I clinical trial of a monoclonal antibody against CD40-ligand (IDEC-131)  
in patients with systemic lupus erythematosus

Journal of Rheumatology, 2001, 28: 95-101

Dutton, R.W., Bradley, L.M., Swain, S.L.:

T Cell Memory

Annual Reviews in Immunology, 1998, 16: 201-223

Fecteau, J.F., Néron, S.:

CD40 Stimulation of human peripheral B Lymphocytes: Distinct Response from  
Naïve and Memory Cells

The Journal of Immunology, 2003, 171: 4621-4629

Ferrant, J.L., Benjamin, C.D., Cutler, A.H., Kalled, S.L., Hsu, Y-M., Garber, E.A., Hess, D.M., Shapiro, R.I., Kenyon, N.S., Harian, D.M., Kirk, A.D., Burkly, L.C., Taylor, F.R.:

The contribution of Fc effector mechanisms in the efficacy of anti-CD154 immunotherapy depends on the nature of the immune challenge

International Immunology, 2004, 16: 1583-1594

Filion, L.G., Matusevicius, D., Graziani-Bowering, G.M., Kumar, A., Freedman, M.S.:

Monocyte-derived IL12, CD86 (B7-2) and CD40L expression in relapsing and progressive multiple sclerosis

Clinical Immunology, 2003, 106: 127-138

Fleischer, J., Grage-Griebenow, E., Kasper, B., Heine, H., Ernst, M., Brandt, E., Flad, H.-D., Petersen, F.:

Platelet Factor 4 Inhibits Proliferation and Cytokine Release of Activated Human T Cells

The Journal of Immunology, 2002, 169: 770-777

Franchini, M.:

Heparin-induced thrombocytopenia: an update

Thrombosis Journal, 2005, 3: 14

Greinacher, A., Kemkes-Matthes, B.:

Heparin induzierte Thrombopenie

Priv.-Doz. Dr. Bettina Kemkes-Matthes (Hrsg.), Zentrum für Innere Medizin der Universität Gießen, unter Mitarbeit von Prof. Dr. H. Breithaupt u.a. UNI-MED Science, 1. Auflage 1999: 13-16

Grewal, I.S., Flavell, R.A.:

CD40 and CD154 in cell-mediated immunity

Annual Reviews of Immunology, 1998, 16: 111-135

Hiller, E., Riess, H., Kurnik, K.:

Die normale Hämostase, Antithrombotische Therapie

In: Hämorrhagische Diathese und Thrombose

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2002: 1-20, 135-147

Hinz, P., Lubenow, N., Eckernkamp, A., Greinacher, A.:

Diagnose und Therapie der Heparin-induzierten Thrombopenie nach Trauma –  
aktuelle Empfehlungen

Der Unfallchirurg 2002, 105: 845-850

Janssen, D., Kroll, H., Greinacher, A.:

Ein Update zur Diagnostik und Therapie der HIT

Ergebnisse der HIT-School 2003 in Hamburg, Laborsonderteil 2003: 1-5

Kannan, M., Ahmad, S., Ahmad, F., Kale, S., Hoppensteadt, D.A., Fareed, J.,  
Saxena, R.:

Functional characterization of antibodies against heparin-platelet factor 4  
complex in heparin-induced thrombocytopenia patients in Asian-Indians:  
relevance to inflammatory markers

Blood Coagulation Fibrinolysis, 2005, 16: 487-490

Kim, K.M., Min, H.Y., Jung, S.H., Lee, T.H., Kim, J.G., Kang, C.Y.:

Characterization of an immunosuppressive anti-CD40 ligand monoclonal  
antibody

Hybridoma, 1998, 17: 463-470

Koshy, M., Berger, D., Crow, M.K.:

Increased Expression of CD40 Ligand on Systemic Lupus Erythematosus  
Lymphocytes

Journal of Clinical investigation, 1996, 98: 826-837

Koyama, I., Kawai, T., Andrews, D., Boskovic, S., Nadadzin, O., Wee, S.L., Sogawa, H., Wu, D.L., Smith, R.N., Colvin, R.B., Sachs, D.H. Cosimi, A.B.:  
Thrombophilia associated with anti-CD154 monoclonal antibody treatment and its prophylaxis in non-human primates.

Transplantation, 2004, 77: 460-462

Kyburz, D., Corr, M., Brinson, D.C., Von Damm, A., Tighe, H., Carson, D.A.:  
Human Rheumatoid Factor Production Is Dependent on CD40 Signaling and Autoantigen

The Journal of Immunology, 1999, 163: 3116-3122

Lederer, S.R., Friedrich, N., Gruber, R., Landgraf, R., Toepfer, M., Sitter, T.:  
Reduced CD40L expression on ex vivo activated CD4<sup>+</sup> T-lymphocytes from patients with excellent renal allograft function measured with a rapid whole blood flow cytometry procedure

International Archives of Allergy and Immunology, 2004, 133: 276-284

Leo, A., Winteroll, S.:

Laboratory Diagnosis of Heparin-Induced Thrombocytopenia and Monitoring of Alternative Anticoagulants

Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2003, 10: 731-740

Liu, C.Y., Battaglia, M., Lee, S.H., Sun, Q.-H., Aster, R.H., Visentin G.P.:

Platelet Factor 4 Differentially Modulates CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (regulatory) versus CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (Nonregulatory) T Cells

The Journal of Immunology, 2005, 174: 2680-2686

Liu, Z., Colpaert, S., D'Haens, G.R., Kasran, A., de Boer, M., Rutgeerts, P., Geboes, K., Ceuppens, J.L.:

Hyperexpression of CD40 ligand (CD154) in inflammatory bowel disease and its contribution to pathogenic cytokine production

The Journal of Immunology, 1999, 163: 4049-4057

Locke, C.F.S., Dooley, J., Gerber, J.:

Rates of clinically apparent heparin-induced thrombocytopenia for unfractionated heparin vs. low molecular weight heparin in non-surgical patients are low and similar

Thrombosis Journal, 2004, 3: 4

Lubenow, N., Eichler, P., Lietz, T., Farner, B., Greinacher, A.:

Lepirudin for prophylaxis of thrombosis in patients with acute isolated heparin-induced thrombocytopenia: an analysis of 3 prospective studies

Blood, 2004, 104: 3072-3077

Meabed, M.H., Taha, G.M., Mohamed, S.O., El-Hadidy, K.S.:

Autoimmune thrombocytopenia: flow cytometric determination of platelet associated CD154/CD40L and CD40 on peripheral blood T and B lymphocytes

Hematology, 2007, 12: 301-307

Newman, P.M., Chong, B.H.:

Heparin-induced thrombocytopenia: new evidence for the dynamic binding of purified anti-PF4-heparin antibodies to platelets and the resultant platelet activation

Blood, 2000, 96: 182-187

Nonoyama, S., Hollenbaugh, D., Aruffo, A., Ledbetter, J.A., Ochs, H.D.:

B Cell Activation via CD40 Is Required for Specific Antibody Production by Antigen-stimulated Human B Cells

Journal of Experimental Medicine, 1993, 178: 1097-1102

Paust, S., Cantor, H. :

Regulatory T cells and autoimmune disease

Immunological Reviews, 2005, 204: 195-207

Polese, L., Angriman, I., De Franchis, G., Cecchetto, A., Sturniolo, G.C., D'Inca, R., Scarpa, M., Ruffolo, C., Norberto, I., Frego, M., D'Amico, D.:

Persistence of high CD40 and CD40L expression after restorative proctocolectomy for ulcerative colitis

World Journal of Gastroenterology, 2005, 11: 5303-5308

Prechel, M.M., McDonald, M.K., Jeske, W.P., Messmore, H.L., Walenga, J.M.:

Activation of platelets by heparin-induced thrombocytopenia antibodies in the serotonin release assay is not dependent on the presence of heparin

Journal of Thrombosis and Hemostasis, 2005, 3: 2168-2175

Quezada, S.A., Bennett, K., Blazar, B.R., Rudensky, A., Sagaguchi, S., Noelle, R.J.:

Analysis of the Underlying Cellular Mechanisms of Anti-CD154-Induced Graft Tolerance: The Interplay of Clonal Anergy and Immune Regulation

The Journal of Immunology, 2005, 175: 771-779

Suh, J.-S., Malik, M.I., Aster, R.H., Visentin, G.P.:

Characterization of the Humoral Immune Response in Heparin-Induced Thrombocytopenia

American Journal of Hematology, 1997, 54: 196-201

Suvarna, S., Rauova, L., McCracken, E.K., Goss, C.M., Sachais, B.S., McKenzie, S.E., Reilly, M.P., Gunn, M.D., Cines, D.B., Ponez, M., Arepally, G.:

PF4/Heparin complexes are T cell-dependent antigens

Blood, 2005, 106: 929-931

Toubi, E., Adir-Shani, A., Kessel, A., Shmuel, Z., Sabo, E., Hacham, H.:

Immune aberrations in B and T Lymphocytes Derived from Chronic Urticaria Patients

Journal of Clinical Immunology, 2000, 20: 371-378

Toubi, E., Shoenfeld, Y.:

The role of CD40-CD154 Interactions in Autoimmunity and the Benefit of Disrupting this Pathway

Autoimmunity, 2004, 37: 457-464

Wagner, A., Güldenzoph, B., Lienenlücke, B., Hecker, M.:

CD154/CD40-Mediated Expression of CD154 in Endothelial Cells: Consequences for Endothelial Cell-Monocyte Interaction

Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology, 2004, 24: 715-720

Wang, C.R., Liu, M.F.:

Regulation of CCR5 expression and MIP-1alpha production in CD4<sup>+</sup> T cells from patients with rheumatoid arthritis

Clinical Experimental Immunology, 2003, 132: 371-378

Warkentin, T.E., Greinacher, A.:

Heparin-Induced Thrombocytopenia: Recognition, Treatment, and Prevention: The seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy

Chest, 2004, 126: 311-337

Weiss, C., Jelkmann, W.:

Funktionen des Blutes

In: Physiologie des Menschen 28. Auflage Schmidt, Thews, Lang

Springer Verlag 2000 Berlin Heidelberg New York: 411-447

Zola, H., Swart, B., Nicholson, I., Aasted, B., Bensussan, A., Boumsell, L., Buckley, C., Clark, G., Drbal, K., Engel, P., Hart, D., Horejsí, V., Isacke, C., Macardle, P., Malavasi, F., Mason, D., Olive, D., Saalmueller, A., Schlossman, S.F., Schwartz-Albiez, R., Simmons, P., Tedder, T.F., Uguccioni, M., Warren, H.:

CD molecules 2005: human cell differentiation molecules

Blood, 2005, 106: 3123-3126

Veröffentlichungen:

Banat, G.-A., Ihlow, K., Usluoglu, N., Hoppmann, S., Hoeck, M., Pralle, H.:  
Core-binding factor-beta positive acute myeloid leukaemia cells induce T-cell  
responses

British Journal of Haematology, 2003, 123: 819-29

Banat, G.-A., Usluoglu, N., Hoeck, M., Ihlow, K., Hoppmann, S., Pralle, H.:  
Dendritic cells fused with core binding factor-beta positive acute myeloid leukaemia  
blast cells induce activation of cytotoxic lymphocytes

British Journal of Haematology, 2004, 126: 593-601

Wachter, D., Tschischka, S., Huegens-Penzel, M., Kuchelmeister, K., Bohle, R.M.,  
Böker, D.K., Nestler, U.:

T-cell lymphoma mimicking schwannoma of a cervical nerve root

Neurosurgical Review, 2009, 32: 117-121

## **Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.

Reichelsheim, 24.08.2009

S.Tschischka

## **XII      Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. H.P. Pralle für das zur Verfügung gestellte, interessante und herausfordernde Thema und Herrn PD Dr. med. G.-A. Banat für die konstante und engagierte Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt Frau Marianne Hoeck für die Einführung in die Laborarbeit sowie ihre kompetente und unermüdliche Hilfe bei den Zellkulturen.

Allen Mitarbeitern des Hämatologielabors danke ich für das gute Arbeitsklima sowie den hilfreichen und regen Austausch und insbesondere Frau Kerstin Ihlow für die vielen gemeinsam verbrachten Arbeitsstunden.

Ebenfalls danke ich den Mitarbeiterinnen des Thrombozytenlabors des Instituts für klinische Immunologie für die freundliche Unterstützung.