

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**CD47-Expression auf Blutzellen
und im Blutplasma bei Autoimmunhämolytischer Anämie
und Immunthrombozytopenie**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Claudia Pagenkopf

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. Salama

2. Prof. Dr. med. G. Gaedicke

3. Prof. Dr. med. A. Greinacher

Datum der Promotion: 07.12.2007

Veröffentlichung von Teilergebnissen

Teilergebnisse dieser Dissertation wurden als Originalartikel in Transfusion Medicine veröffentlicht:

Ahrens N, Pagenkopf C, Kieseewetter H, Salama A. CD47 is expressed at normal levels in patients with autoimmune haemolytic anaemia and/or immune thrombocytopenia. *Transfus Med* 2006;16:397-402.

Des Weiteren wurden Teilergebnisse dieser Dissertation anlässlich des 39. Jahreskongresses der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI) vom 19. - 22. September 2006 in Frankfurt am Main als Poster ausgestellt:

Ahrens N, Pagenkopf C, Kieseewetter H, Salama A. CD47 Expression on Red Cells and Platelets in Patients with Autoimmune Hemolytic Anemia and/or Thrombocytopenia. *Transfus Med Hemother* 2006;33(Suppl.1):36-78

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Autoimmunhämolytische Anämie	2
1.1.1	Ätiologie	2
1.1.2	Pathophysiologie	2
1.1.3	AIHA vom Wärmetyt	3
1.1.4	AIHA vom Kältetyt	5
1.1.5	Paroxysmale Kältehämoglobinurie	6
1.1.6	Medikamentös induzierte AIHA	6
1.2	Immunthrombozytopenie	7
1.2.1	Ätiologie und Epidemiologie	7
1.2.2	Pathophysiologie	8
1.2.3	Klinik und Diagnose	9
1.2.4	Therapie und Verlauf	11
1.3	CD47	12
1.3.1	Struktur	12
1.3.2	Zelluläre CD47-Expression	13
1.3.3	Funktionen	15
1.4	CD47 in der Steuerung autoimmuner Prozesse	15
1.4.1	CD47 und Hämolyse	16
1.4.2	CD47 und Thrombozyteneliminierung	18
1.4.3	CD47 und Eliminierung lymphohämatopoetischer Zellen	18
1.4.4	Lösliches CD47	19
1.5	Fragestellung	19
2	Patienten, Material und Methoden	21
2.1	Patienten und gesunde Probanden	21
2.2	Chemikalien und Geräte	21
2.3	Durchflusszytometrie	23
2.3.1	Immunfluoreszenzmarkierung	23
2.3.2	Geräteaufbau und –funktion	23
2.3.3	Messergebnisse	25
2.3.4	Gating	26
2.3.5	Autofluoreszenz	28

2.3.6	Fluoreszenzkomensation	28
2.3.7	Fc-Rezeptor-Blockade	29
2.4	Quantitative Durchflusszytometrie.....	30
2.4.1	Kalibrierung mit QuantiBRITE	30
2.4.2	Quantifizierung von löslichem CD47 im Plasma.....	31
2.5	Methodenvalidierung	32
2.5.1	Präzisionskontrollen	32
2.5.2	Rh _{Null}	33
2.5.3	Plasma-Hemmversuch mit Referenzantigenen	33
2.6	Probenverarbeitung.....	33
2.6.1	Erythrozytenpräparation.....	34
2.6.2	Thrombozytenpräparation	34
2.6.3	Leukozytenpräparation.....	35
2.6.4	Plasmapräparation und Hemmversuch	36
2.7	Auswertung	37
2.7.1	Statistische Auswertung.....	37
2.7.2	Darstellung der Ergebnisse	38
3	Ergebnisse	39
3.1	CD47-Expression auf Erythrozyten	39
3.2	CD47-Expression auf Thrombozyten	41
3.3	CD47-Expression auf Lymphozyten	43
3.3.1	Einfluss der Lymphozytengröße auf die CD47-Expression	44
3.4	CD47-Expression auf Granulozyten	45
3.5	CD47 im Plasma	46
3.5.1	Plasma-Hemmversuch mit Referenzantigenen	46
3.5.2	Plasma-Hemmversuch mit CD47	47
4	Diskussion	51
4.1	Die Durchflusszytometrie als quantitatives Verfahren	51
4.2	Zellgebundenes CD47.....	53
4.2.1	CD47 auf der Oberfläche von Blutzellen	53
4.2.2	Speziesspezifitäten	57
4.3	CD47 im Plasma	59
4.4	Ausblick: Therapeutische Anwendung von CD47.....	62
4.5	Fazit	62

5	Zusammenfassung	64
6	Literaturverzeichnis	66

Abkürzungsverzeichnis

AIHA	Autoimmunhämolytische Anämie
CD	Cluster of Differentiation
CD47 ^{+/+}	homozygot CD47-positiv, Wildtyp
CD47 ^{-/-}	homozygot CD47-defizient
CD47 ^{+/-}	heterozygot
CV	Coefficient of Variation
DAF	Decay accelerating factor = CD55
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Forward Angle Light Scatter
GP	Glykoprotein
G-Protein	Guanin-Nucleotide-bindendes Protein
Hb	Hämoglobin
HK	Hämatokrit
IAP	Integrin Associated Protein = CD47
Ig	Immunglobulin
ITP	Immunthrombozytopenie
i.v.	intravenös
IVIG	intravenöse Immunglobuline
kDA	Kilodalton
MAIPA	Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigens
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIRL	Membrane Inhibitor of Reactive Lysis = Protectin = CD59
MMA	Monocyte Monolayer Assay

NOD	nonobese diabetic
OA3	Ovarielles Karzinomantigen 3
PE	Phycoerythrin
Rh	Rhesus
RhAG	Rhesus assoziiertes Glykoprotein
SHP	src homology phosphatase
SIRP α	Signal Regulatory Protein alpha
Src	Steroid receptor coactivator
SSC	Side Angle Light Scatter
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
Tukey HSD	Tukey honestly significant difference

1 Einleitung

Im Rahmen hämatologischer Autoimmunerkrankungen wie der Autoimmunhämolytischen Anämie (AIHA) und der Immunthrombozytopenie (ITP) kommt es zur gesteigerten Zerstörung körpereigener Erythrozyten beziehungsweise Thrombozyten aufgrund der Bildung von Autoantikörpern [1;2].

Ursache der Entstehung dieser Antikörper gegen körpereigene Antigene ist eine Störung der immunologischen Selbsttoleranz, die in der Ausbildung autoreaktiver T- und B-Zellen resultiert. Hierbei können eine fehlerhafte zentrale T-Zell-Selektion im Thymus, eine gestörte periphere Toleranz einschließlich Abnormalitäten des Zytokinhaushalts, aber auch eine abnorme Antigenexpression zugrunde liegen [3;4]. Darüber hinaus können virale oder bakterielle Infekte als Trigger für die Autoantikörperbildung dienen. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang vor allem die Immunantwort auf Erregerstrukturen, die im Sinne einer molekularen Mimikry einen identischen Aufbau mit wirtseigenen Zellepitopen aufweisen [3;5;6].

Der Nachweis antierythrozytärer oder antithrombozytärer Autoantikörper ist jedoch nicht immer mit dem Auftreten einer klinisch relevanten Erkrankung verbunden. Gelegentlich können solche Autoantikörper auch bei gesunden Menschen nachgewiesen werden [3;7-9]. Gegenwärtig stützen sich die Diagnose und Prognoseeinschätzung bei AIHA und ITP in erster Linie auf den Nachweis und die Quantifizierung von Autoantikörpern sowie deren Isotypklassifizierung und Antigenspezifität. Die Aussagekraft hinsichtlich des Schweregrades und des Verlaufes der Erkrankung ist jedoch eingeschränkt [9;10].

Es ist bisher nicht bekannt, welche weiteren Faktoren einen wesentlichen Einfluss auf die Erkrankung nehmen könnten. Wenige, neue Studien haben sich in diesem Zusammenhang mit dem Oberflächenprotein CD47 befasst. Die bisherigen Analysen seiner biologischen Funktionen, Signalwege und Interaktionen deuten darauf hin, dass CD47 eine Rolle in der Modulation immunologischer Prozesse spielen könnte.

1.1 Autoimmunhämolytische Anämie

1.1.1 Ätiologie

Neben der idiopathischen Form tritt die AIHA häufig sekundär im Rahmen von anderen Autoimmunerkrankungen wie etwa dem systemischen Lupus erythematoses und der rheumatischen Arthritis sowie im Rahmen von lymphoproliferativen Syndromen, Medikamenteneinnahme, Immundefekten und Infektionen, seltener auch im Zusammenhang mit Karzinomen auf [1;11;12]. Karzinomassoziierte Autoantikörper kommen dabei offenbar gehäuft im Zusammenhang mit großer Tumormasse und bereits eingetretener Metastasierung vor [13].

Die AIHA lässt sich in den Wärmetyt, den Kältetyt, die paroxysmale Kältehämoglobinurie und den medikamentös induzierten Typ unterteilen.

1.1.2 Pathophysiologie

Die Autoantikörper gehören der IgG-, IgM- oder IgA-Klasse an. Mit diesen Antikörpern beladene Erythrozyten werden durch Makrophagen und/oder durch Aktivierung des Komplementsystems eliminiert.

IgG-Antikörper interagieren mit den Fc-Rezeptoren der Makrophagen, sodass Antikörper-opsonierte Erythrozyten hauptsächlich extravasal von Makrophagen der Milz und der Leber phagozytiert werden. Dabei hängt die Reaktivität der Fc-Rezeptoren mit den Antikörpern entscheidend von der IgG-Subklasse ab. Während die Fc-Rezeptoren für IgG₃ eine sehr hohe und für IgG₁ eine etwas geringere Affinität besitzen, reagieren sie mit IgG₂ nur schwach und mit IgG₄ gar nicht. [1;7].

Bestimmte IgG-Antikörper sind zusätzlich in der Lage, die Komplementfaktoren C1 bis C3 oder sogar die gesamte Komplementkaskade zu aktivieren. Durch die Interaktion der opsonierenden Komponenten mit den Komplement-Rezeptoren der Makrophagen wird die extravasale Phagozytose verstärkt [11].

Im Allgemeinen ist die extravasale Hämolyse mit einem eher milden Verlauf der AIHA ohne ausgeprägte Hämoglobinämie verbunden [1].

Im Gegensatz dazu verursachen IgM-Antikörper sowie bestimmte IgG-Antikörper in erster Linie eine intravasale Hämolyse. Sie sind in der Lage, den terminalen Komplement-

komplex C5b-9 zu aktivieren. Dieser so genannte Membran-Angriffs-Komplex führt durch Porenbildung in der Zellmembran unmittelbar zur intravasalen Zerstörung der Erythrozyten. Aufgrund der Anwesenheit zahlreicher regulatorischer und komplementinhibierender Proteine, wie etwa Protectin und DAF (Decay Accelerating Factor) auf Erythrozyten und im Plasma bedarf es allerdings einer ausreichend starken Aktivierung des terminalen Komplementkomplexes, um eine direkte Zelllyse zu bewirken [11].

Die intravasale Hämolyse verläuft schlagartig und geht gewöhnlich mit einer Hämoglobinämie einher [1].

Zusätzlich unterliegen aber auch IgM-opsonierte Erythrozyten einer extravasalen Hämolyse, die über C3b-Rezeptoren der Phagozyten vermittelt wird. Den primären Ort der C3b-bedingten extravasalen Phagozytose stellen die Lebersinusoiden dar [11].

Die Mechanismen der IgA-induzierten Hämolyse sind noch nicht eindeutig geklärt. Auch für IgA-Antikörper existieren Fc-Rezeptoren auf Makrophagen und Monozyten. Aus einer Interaktion resultieren Phagozytose oder direkte monozyten-vermittelte Zelllyse. Dabei wurden bisher sowohl komplementabhängige als auch komplementunabhängige Abläufe beschrieben [7;14].

In der Mehrzahl der Fälle handelt es sich bei den Autoantikörpern um die so genannten Wärmeantikörper, deren höchste Reaktivität sich im Bereich der physiologischen Körpertemperatur befindet. Davon unterschieden werden Kälteantikörper, die grundsätzlich bei Temperaturen unter 37°C reagieren.

1.1.3 AIHA vom Wärmetyp

In bis zu 70% der Fälle und mit einer Inzidenz von 1:40000 bis 1:80000 wird die AIHA durch Wärmeautoantikörper verursacht, die überwiegend der IgG-Klasse seltener auch der IgM- oder IgA-Klasse angehören. Idiopathische und sekundäre Formen treten etwa gleich häufig auf [1].

Prinzipiell kann die Erkrankung in jedem Alter auftreten, wobei Erwachsene häufiger als Kinder und Frauen häufiger als Männer betroffen sind. Die Inzidenz steigt ab dem 40. Lebensjahr an, was vor allem auf die Zunahme sekundärer Formen zurückzuführen ist [11].

Die AIHA vom Wärmetyt entwickelt sich meist allmählich und verläuft chronisch. Entsprechend der überwiegenden Beteiligung von IgG-Antikörpern steht pathophysiologisch die extravasale Hämolyse im Vordergrund.

Klinisch zeigen sich in unterschiedlicher Ausprägung Anämiezeichen wie Schwäche, Schwindel, Blässe, Tachykardie, vermehrte Müdigkeit und Erschöpfbarkeit sowie Belastungsdyspnoe. Daneben können auch Ikterus, Hämoglobinämie, Hämoglobinurie, Hepatosplenomegalie, Ödeme sowie gelegentlich Fieber und Abdominalschmerz auftreten. Abhängig vom Hämolysegrad finden sich Veränderungen von Hb, HK, Erythrozyten- und Retikulozytenzahl.

Neben der häufig milden Verlaufsform treten jedoch auch fulminante und lebensbedrohliche Verläufe auf.

Serologisch findet sich bei über 95% der Patienten ein positiver direkter Antiglobulintest (direkter Coombs-Test) als Nachweis zellgebundener Antikörper beziehungsweise Komplementfaktoren. In etwa 40-60% der Fälle finden sich auf den Erythrozyten gleichzeitig IgG und C3d als Spaltprodukt von C3b. In 30-40% werden allein IgG, in bis zu 20% mehr als eine Antikörperklasse und in seltenen Fällen nur C3d, IgM oder IgA detektiert. In etwa 50% der Fälle findet sich zusätzlich ein positiver indirekter Antiglobulintest (indirekter Coombs-Test) als Nachweis freier Antikörper [1;15].

Selten ist der direkte Antiglobulintest komplett negativ, sodass die Autoantikörper ausschließlich im Eluat detektierbar sind [1;11].

Die Therapie richtet sich nach Schweregrad, assoziierten Erkrankungen sowie Alter und Konstitution des Patienten. Neben unter Umständen notwendigen Bluttransfusionen bei hochgradiger Anämie stützt sich die Behandlung der klinisch relevanten Hämolyse in erster Linie auf die Kortikosteroidtherapie mit Prednison oder Prednisolon beziehungsweise die Dexamethason-Stoßtherapie [1;15]. Bei Nicht-Ansprechen und zur Vermeidung von Kortikoidnebenwirkungen steht Azathioprin als Alternative oder Kombinationspartner zur Verfügung. Als Reservetherapeutikum wird Cyclophosphamid eingesetzt [1]. Patienten mit refraktären Formen profitieren gelegentlich auch von einer Therapie mit Rituximab (anti-CD20) [1;16]. Intravenöse Immunglobuline (IVIg) haben sich lediglich bei Kindern als effektiv erwiesen, deren AIHA sekundär im Rahmen einer Infektion auftritt. Bei Erwachsenen gelten sie als meist ineffektiv [1]. Die Splenektomie führt nur selten zur Remission und wird inzwischen vor allem bei Kindern nur noch als ultima ra-

tio angesehen [1;15]. In Einzelfällen erweisen sich auch Danazol, Cyclosporin A oder Plasmapherese als wirksam [15;16].

1.1.4 AIHA vom Kältetyp

Etwa 10% der AIHA-Patienten weisen Kälteagglutinine auf, die fast ausschließlich der IgM-Klasse angehören. Nur sehr selten finden sich IgA- oder IgG-Antikörper.

Der idiopathischen Form mit einer Peakinzidenz um das 70. Lebensjahr stehen die sekundären Formen gegenüber, die vorwiegend im Rahmen lymphoproliferativer Erkrankungen oder Infektionen, vor allem mit *Mycoplasma pneumoniae*, auftreten [1;11].

Da IgM-Antikörper hauptsächlich eine intravasale Hämolyse über die Komplementaktivierung auslösen, findet sich serologisch ein C3d-positiver direkter Antiglobulintest. Der Hämolysegrad ist abhängig von der Kälteexposition. Kälteantikörper zeigen zwischen 0 und 4°C ihre maximale Reaktivität. Komplement kann jedoch bei solch niedrigen Temperaturen nicht aktiviert werden. Aus diesem Grund induzieren Kälteagglutinine letztendlich nur im Bereich von über 10 bis 37°C eine Hämolyse, wobei ihre maximale Wirkung bei 20-22°C erreicht wird [1]. Entsprechend hängt die klinische Relevanz der Kälteantikörper in erster Linie von ihrer Temperaturamplitude und in wesentlich geringerem Ausmaß vom Titer ab [1;7].

Milde bis moderate anämische Symptome können ständig auftreten. Nach Kälteexposition tritt darüber hinaus eine zumeist reversible Akrozyanose auf. Seltener kommt es zu einer kompletten Vasookklusion mit nachfolgender Nekrose.

Im Gegensatz zu den chronischen Formen verläuft die infektassoziierte Variante akut. Auch hier ist das Ausmaß der akuten Hämolyse vor allem von der Temperaturamplitude der Autoantikörper abhängig. Sie ist meist nach wenigen Tagen reversibel [1;11].

Therapeutisch steht der Schutz vor Kälte im Vordergrund. Benötigte Blutkonserven werden vor der Transfusion angewärmt [1]. In Einzelfällen hat sich Rituximab als wirkungsvoll erwiesen [17;18]. Die Splenektomie ist bei der AIHA vom Kältetyp hingegen nicht effektiv [1;16]. Bei nicht zu umgehender Kälteexposition, wie etwa im Rahmen kardiovaskulärer Operationen, kann eine prophylaktische Plasmapherese in Kombination mit immunsuppressiver Therapie sinnvoll sein [1].

1.1.5 Paroxysmale Kältehämoglobinurie

Eine Sonderform der Kälteagglutinine stellen die Donath-Landsteiner-Antikörper dar, die die seltene paroxysmale Kältehämoglobinurie verursachen. Während sie früher vor allem im Zusammenhang mit tertiärer Syphilis beobachtet wurde, tritt sie heute fast ausschließlich bei Kindern nach viralen Infekten des oberen Respirationstrakts auf [1].

Die Donath-Landsteiner-Agglutinine gehören der IgG-Klasse an und reagieren zweiphasig. Bei niedrigen Temperaturen binden sie an Erythrozyten. Erst bei Wiederanstieg der Temperatur kann Komplement aktiviert werden, während die Antikörper bereits wieder von den Erythrozyten dissoziieren. Es resultiert eine intravasale Hämolyse. Die zusätzlich stattfindende C3d- und Fc-Rezeptor-vermittelte extravasale Hämolyse spielt eher eine untergeordnete Rolle. Der direkte Antiglobulintest zeigt sich stark positiv für C3d und nur bei niedrigen Temperaturen auch positiv für IgG [11;12].

In Abhängigkeit von einer Kälteexposition entwickeln sich schlagartig Blässe sowie eine Dunkelfärbung des Urins im Sinne einer Hämoglobinurie. Weiterhin treten Abdominalkrämpfe, Fieber und Schüttelfrost auf.

Die infektassoziierte Hämolyse ist trotz schweren akuten Verlaufs selbstlimitierend und im Allgemeinen innerhalb weniger Tage reversibel.

Die Therapie beschränkt sich deshalb auf Kälteschutz und Transfusion vorgewärmten Blutes bei Bedarf. Im mittlerweile seltenen Fall einer zugrunde liegenden Syphiliserkrankung erfolgt die entsprechende Penicillin-Therapie [1;11].

1.1.6 Medikamentös induzierte AIHA

Methyldopa, Penicillin, nicht-steroidale Antirheumatika, Cephalosporine, Rifampicin und mehr als 70 weitere Medikamente sind beschrieben, eine AIHA zu induzieren [1].

Die pathophysiologischen Zusammenhänge sind bisher nicht eindeutig geklärt. Jedoch erscheint die Neoantigenbildung durch Interaktion der Medikamente oder ihrer Metaboliten mit Bestandteilen der Erythrozytenmembran wahrscheinlich. Das entstehende Neoantigen provoziert entweder die Bildung medikamentenabhängiger Antikörper, die nur in Gegenwart des Medikaments reagieren, oder aber die Bildung klassischer Autoantikörper.

Medikamentenabhängige Antikörper lösen über Komplementaktivierung eine schwere intravasale Hämolyse aus, die mit einer hohen Inzidenz lebensbedrohlicher Komplikati-

onen wie Nierenversagen, Schock und akuter Verbrauchskoagulopathie einhergeht. In vitro ist die Hämolyse nur in Anwesenheit des Medikaments nachweisbar.

Im Gegensatz dazu aktivieren medikamenteninduzierte Autoantikörper, die auch in Abwesenheit des Medikaments reagieren, kein Komplement. Sie führen zu einer extravasalen Hämolyse, die klinisch und serologisch nicht von der klassischen AIHA vom Wärmetyp zu unterscheiden ist. Die Diagnose wird in diesem Fall durch die Tatsache gestützt, dass der Patient auf das Absetzen des auslösenden Medikaments reagiert.

Eine Remission tritt nach dem Absetzen und bei entsprechender Reexposition prophylaxe oft bereits innerhalb weniger Tage ein [1;11].

1.2 Immunthrombozytopenie

1.2.1 Ätiologie und Epidemiologie

Die ITP tritt mit einer jährlichen Inzidenz von 10:100.000 auf. Etwa 50% der Erkrankten sind Kinder unter 10 Jahren, wobei Jungen und Mädchen gleich häufig betroffen sind. Die ITP des Kindesalters verläuft akut und tritt häufig nach Virusinfekten, zum Beispiel mit Varizella zoster, auf. In der Regel ist sie innerhalb weniger Wochen bis Monate reversibel [2;6]. Nur etwa 20% der Kinder entwickeln eine chronische Form mit länger als sechs Monate anhaltender Thrombopenie. Meist stellt sich jedoch noch nach Jahren eine spontane Remission ein [19].

Das Auftreten einer ITP im Erwachsenenalter ist hingegen nahezu immer mit einem chronischen Verlauf verbunden. Frauen sind rund doppelt so häufig betroffen wie Männer. Die Peakinzidenz liegt im jungen Erwachsenenalter von 18-40 Jahren [2]. Im Widerspruch dazu gibt es jedoch auch Hinweise, dass die Inzidenz unter gleichzeitiger Aufhebung der Geschlechtsunterschiede mit zunehmendem Alter steigt [20].

Der idiopathischen Form der ITP stehen die sekundären Formen gegenüber, die vor allem im Zusammenhang mit systemischem Lupus erythematodes, Antiphospholipid-syndrom, Lymphomen, Medikamenteneinnahme oder Infektionen auftreten [2].

1.2.2 Pathophysiologie

Normale Thrombozyten weisen auch ohne das Vorliegen einer immunologischen Erkrankung eine große Anzahl IgG-Moleküle auf. Diese befinden sich zu mehr als 99% in den intrazellulären alpha-Granula. Obwohl bei ITP-Patienten eine Erhöhung der thrombozytären IgG-Menge beobachtet werden kann, steht sie in keinem Zusammenhang mit dem Vorhandensein antithrombozytärer Autoantikörper. Vielmehr beruht die Zunahme der IgG-Moleküle auf einer gemeinhin kompensatorisch gesteigerten Thrombopoese, die zum vermehrten Vorliegen junger, großer Thrombozyten führt, die über eine entsprechend größere Anzahl alpha-Granula verfügen. Daher findet sich eine IgG-Vermehrung ebenso bei Thrombozytopenien nicht-immunologischer Genese, die mit einer peripheren Thrombozytenzerstörung einhergehen, nicht jedoch bei Störungen der Thrombopoese [19;21].

Weniger als 1% der thrombozytären IgG-Moleküle befindet sich auf der Zelloberfläche. Eine Erhöhung dieser Fraktion wiederum reflektiert im Allgemeinen tatsächlich das Vorliegen antithrombozytärer Antikörper [21].

Obleich IgG den überwiegenden Anteil der Autoantikörper darstellt, können in vielen Fällen auch IgM und IgA detektiert werden [4;8;9;22]. Gelegentlich finden sich mehrere Antikörperklassen gleichzeitig [8;9].

Zahlreiche Glykoproteine (GP) auf der Thrombozytenoberfläche konnten bisher als Antigene identifiziert werden, die mit Autoantikörpern reagieren. Das häufigste Ziel stellen der Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa und der von-Willebrand-Faktor-Rezeptor GPIb/IX dar [8;9]. Seltener sind Autoantikörper auch gegen GPIV, GPV oder den Kollagenrezeptor GPIa/IIa gerichtet [2;9].

Typischerweise weist ein Großteil der Patienten gleichzeitig Antikörper gegen verschiedene Antigene auf [9]. Diese multiplen Antigenespezifitäten entstehen möglicherweise im Rahmen des so genannten Epitope-Spreading. Dabei werden antikörperbesetzte Thrombozyten durch antigenpräsentierende Zellen phagozytiert und anschließend abgebaut. Neben der Freilegung des primären Antigens können hierbei auch ursprünglich verborgene Epitope freigelegt und präsentiert werden. Somit wird nicht nur die initiale Immunreaktion verstärkt, sondern zusätzlich die Produktion von Autoantikörpern gegen weitere Antigene angeregt [2].

Bisher konnte weder für bestimmte Antikörperklassen oder Antikörpermengen noch für bestimmte Antigenspezifitäten eine eindeutige Korrelation mit dem Ausmaß der Thrombozytenzerstörung nachgewiesen werden [9;19;21;22].

Hauptort der Fc-Rezeptor-vermittelten Thrombozyteneliminierung ist das makrophagozytäre System der Milz. In weitaus geringerem Ausmaß findet die Phagozytose auch in der Leber statt [2;19].

Als Reaktion auf die vermehrte Zerstörung ist in den meisten Fällen eine kompensatorische Steigerung der Thrombozytenproduktion zu beobachten [2]. Aufgrund der normalen bis erhöhten Zahl an Megakaryozyten im Knochenmark bleibt der Thrombopoetinspiegel dabei niedrig [23].

Bisweilen zeigen Patienten jedoch trotz unbeeinträchtigter Megakaryozytenzahl eine unangemessen verminderte Thrombozytenproduktion. Möglicherweise induzieren Autoantikörper noch intramedullär die Zerstörung neu gebildeter Thrombozyten [24]. In-vitro-Analysen ergaben, dass einige Autoantikörper darüber hinaus die Bildung und Reifung der Megakaryozyten selbst beeinträchtigen [25].

Abgesehen von der B-Zell-abhängigen Antikörperbildung haben sich inzwischen auch zytotoxische T-Zellen als pathophysiologisch relevant erwiesen. Diese zeigen bei ITP-Patienten Zeichen einer erhöhten Aktivität und sind in der Lage, autologe Thrombozyten zu lysieren [26-28].

1.2.3 Klinik und Diagnose

Das Ausmaß der Symptome hängt im Wesentlichen von der Thrombozytenzahl ab. Während Patienten mit mehr als 50.000 Thrombozyten/mm³ oft asymptomatisch sind, finden sich bei niedrigeren Thrombozytenzahlen gehäuft Blutungszeichen. Typisch sind Petechien und Purpura der herabhängenden Körperpartien, konjunktivale und gingivale Blutungen, Epistaxis und Menorrhagie. Ab einer Thrombozytenzahl von weniger als 10.000/mm³ steigt darüber hinaus das Risiko innerer Blutungen. Intrazerebrale Blutungen sind zwar selten, stellen aber die häufigste Todesursache der ITP dar [2;19]. Dabei scheinen ältere Patienten bei äquivalenten Thrombozytenzahlen ein höheres Risiko für hämorrhagische Komplikationen zu haben.

Eine Splenomegalie ist vor allem für erwachsene Patienten eher untypisch. Bei Kindern kann in bis zu 12% der Fälle eine vergrößerte Milz palpirt werden, wobei auch gesunde Kinder häufiger palpable Milzgrößen aufweisen [19;29].

Die Diagnosestellung der ITP basiert in erster Linie auf der Abwesenheit möglicher anderer Ursachen einer Thrombopenie. Unter anderem müssen die Differentialdiagnosen hereditäre Thrombopenie, heparininduzierte Thrombopenie, kongestiver Hypersplenismus, myelodysplastisches Syndrom, neonatale alloimmune Thrombopenie, posttransfusionelle Purpura und thrombotisch-thrombozytopenische Purpura ausgeschlossen werden [2;19;29].

Aufgrund des Fehlens eines ITP-spezifischen Befundes werden Notwendigkeit und Aussagekraft der üblichen Labordiagnostik und klinisch-apparativen Untersuchungen nach wie vor unterschiedlich bewertet [29].

Das Blutbild ist abgesehen von einer Thrombopenie zumeist unauffällig. Gegebenenfalls kann blutungsbedingt zusätzlich eine Anämie auftreten [2]. Differentialdiagnostisch muss in diesem Fall ein Evans-Syndrom ausgeschlossen werden, in dessen Rahmen sowohl antithrombozytäre als auch antierythrozytäre Antikörper auftreten [30].

Im Blutaussstrich von ITP-Patienten finden sich nicht selten vermehrt große, unreife Thrombozyten. Rote und weiße Blutzellen sind in der Regel morphologisch unauffällig. Bei der Knochenmarkpunktion, die derzeit nur bei Patienten jenseits des 60. Lebensjahres sowie vor einer Splenektomie indiziert ist, ergibt sich gewöhnlich ein unauffälliges Bild oder eine erhöhte Megakaryozytenzahl als Zeichen verstärkter Thrombopoese [2;29]. Nur selten findet sich eine verminderte Zahl an Megakaryozyten [25].

Im Vergleich zur Diagnostik der AIHA hat der Nachweis der Autoantikörper für die ITP keinen so hohen Stellenwert. Mit dem Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigen (MAIPA)-Test können glykoproteinspezifische Antikörper mit hoher Spezifität nachgewiesen werden. Jedoch ist die Sensitivität des Tests mit 49-66% so niedrig, dass die Diagnose einer ITP auch bei negativem Ergebnis nicht ausgeschlossen werden kann [2]. Inzwischen sind durchflusszytometrische Verfahren mit Einsatz von Microbeads entwickelt worden, die sich aufgrund höherer Sensitivität möglicherweise als geeigneter für die Routinediagnostik erweisen werden [31].

1.2.4 Therapie und Verlauf

Ziel der Therapie ist es, eine Thrombozytenzahl zu erreichen, die eine adäquate Hämostase sichert. Hierfür müssen nicht notwendigerweise normale Thrombozytenzahlen angestrebt werden. Asymptomatische Patienten mit milder bis moderater Thrombopenie können deshalb zunächst ohne Therapie unter Beobachtung bleiben [19;29].

Für die Initialtherapie bei Erwachsenen mit Blutungssymptomatik oder Thrombozytenzahlen kleiner $30.000/\text{mm}^3$ stellen Glukokortikoide die Standardmedikation dar. Die Ansprechraten betragen bis zu 75%. Meist tritt eine Reaktion innerhalb der ersten drei Wochen auf [2;29].

Intravenöse Immunglobuline führen zu einem wesentlich rascheren, aber nur vorübergehenden Thrombozytenanstieg und dienen daher in erster Linie der Behandlung schwerer akuter Blutungen. Ähnliche Effekte können mit anti-D-Immunglobulinen erzielt werden, die allerdings nur bei Rhesus-positiven Patienten wirksam sind [19;29].

Erst bei Versagen der glukokortikoidbasierten Primärtherapie wird eine Splenektomie durchgeführt. Bis zu zwei Drittel der Patienten erreichen hierdurch eine komplette Remission. Oftmals erleiden Patienten jedoch noch nach Jahren einen Rückfall. In bis zu 10% dieser Fälle finden sich im Nachhinein akzessorische Milzen [19].

Für die Behandlung der chronisch refraktären ITP, die weder auf Glukokortikoide noch auf Splenektomie anspricht, existieren eine Reihe von Therapieansätzen, die sich aber jeweils nur in Einzelfällen als wirksam erwiesen haben. Dazu zählen die Gabe von Azathioprin, Cyclophosphamid, Vincaalkaloiden, Danazol, Colchicin, Cyclosporin A und Rituximab sowie Kombinationschemotherapien [2;19;26;29].

Lediglich in der Notfalltherapie akut lebensbedrohlicher Blutungen kommen Thrombozytenkonzentrate zum Einsatz. Sie werden dann gemeinsam mit parenteralen Hochdosis-Glukokortikoiden sowie Immunglobulinen verabreicht [29].

Kinder erholen sich in den meisten Fällen auch ohne Behandlung innerhalb weniger Wochen. Auf eine spezifische Therapie kann deshalb auch bei schwerer Thrombopenie verzichtet werden, sofern der Patient keine signifikanten Blutungszeichen aufweist. Dennoch erhält ein Großteil der Kinder üblicherweise Glukokortikoide oder intravenöse Immunglobuline.

Die Indikation zur Splenektomie wird äußerst zurückhaltend gestellt. Sie wird frühestens zwölf Monate nach Diagnosestellung und bei schwerster Thrombopenie mit Blutungssymptomen trotz Glukokortikoid- oder IVIG-Therapie in Erwägung gezogen [2;19;29].

Insgesamt wird das Outcome nicht allein durch Blutungsereignisse, sondern in hohem Maße auch durch Therapiekomplicationen beeinflusst. Im Vordergrund steht dabei die infektionsbedingte Morbidität und Mortalität aufgrund immunsuppressiver Behandlungsregimes. Auch nach Versagen der Primärtherapie einschließlich Splenektomie werden weiterführende Therapien deshalb vor allem bei moderater Thrombopenie kaum eingesetzt [32].

1.3 CD47

Brown et al. beschrieben 1990 erstmals ein Plasmamembranmolekül, das auf Leukozyten, Thrombozyten und Plazentazellen funktionell mit β_3 -Integrinen assoziiert ist. Es erhielt zunächst den Namen „Integrin-associated Protein“ (IAP), obwohl es ebenso auf Erythrozyten gefunden wurde, die gar keine Integrine besitzen [33].

Wenig später konnte nachgewiesen werden, dass IAP identisch ist mit CD47, einem ubiquitär exprimierten Glykoprotein, das sich außer auf hämatopoetischen Zellen vor allem auch auf epithelialen, endothelialen und mesenchymalen Zellen, auf Fibroblasten sowie in neuronalem und lymphatischem Gewebe findet [34;35].

Molekulares Klonen zeigte eine Aminosäure-Sequenzidentität zwischen CD47 und dem ovariellen Karzinom-Antigen OA3 sowie hohe Homologien zum Pockenvirusprotein A38L [36].

1.3.1 Struktur

CD47 gehört zur so genannten Immunglobulin-Supergen-Familie, einer Gruppe von Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen mit sequenzhomologen Domänen zu Immunglobulinen [37].

Die extrazelluläre IgV-ähnliche Domäne des CD47 besteht aus circa 120 Aminosäuren und weist eine starke Glykosylierung auf. Die sich anschließenden fünf hydrophoben, membranüberspannenden Segmente mit einer Länge von circa 152 Aminosäuren sind

über Cholesterolbindungen stabil mit der Zellmembran assoziiert. Die Länge des kurzen intrazytoplasmatischen Schwanzes variiert zwischen 3 und 36 Aminosäuren [38]. Diese verschiedenen Formen entstehen durch alternatives Splicen der messenger-RNA, für die bisher vier Isotypen bekannt sind. Es findet sich eine gewebespezifische Verteilung der unterschiedlichen Formen. Form 2 als häufigste und mit 20 Aminosäuren zweitkürzeste Variante ist auf hämatopoetischen Zellen sowie auf Endothel und Fibroblasten dominierend. Die längste Variante Form 4 findet sich hingegen vorwiegend in neuronalem Gewebe [39].

Eine extrazelluläre Disulfidbrücke, die die Ig-Domäne mit den membranüberspannenden Segmenten verbindet, sichert die geeignete Konformation für Ligandenbindung und Funktionalität des Proteins (Abb. 1) [40]. Insgesamt besitzt CD47 eine molekulare Masse von 45-55kDa [38].

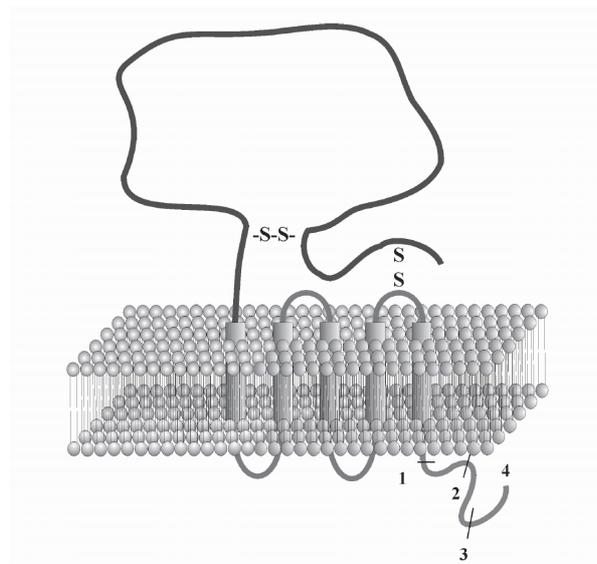


Abb. 1: Molekulare Struktur von CD47: 1-4 = Isoformen des intrazytoplasmatischen Schwanzes [41]

1.3.2 Zelluläre CD47-Expression

Auf Erythrozyten ist CD47 einerseits mit dem Rh-Komplex assoziiert und bindet andererseits Protein 4.2. Das Protein 4.2 wiederum stellt die Verbindung zwischen dem membranären Anionenaustauscher Band3-Komplex und dem zytoskelettalen Spektrinfilament dar, wodurch die Verankerung des Zytoskeletts in der Plasmamembran ermöglicht wird. Dementsprechend stellt die Verbindung zwischen CD47 und Protein 4.2 einen

Kontaktpunkt des Rh-Komplexes mit dem Band3-Komplex und damit dem Zytoskelett dar [41-43] (Abb. 2).

Der größte Teil des erythrozytären CD47 ist in der beschriebenen Art und Weise mit Rh-Komplex und Zytoskelett assoziiert. Daneben existiert eine kleinere mobile Fraktion von CD47, die sich frei in der Plasmamembran bewegen kann und damit möglicherweise in der Lage ist, in speziellen Membranabschnitten zu kumulieren, um bei Zell-Zell-Kontakten in größerer Menge als Ligand zur Verfügung zu stehen [44].

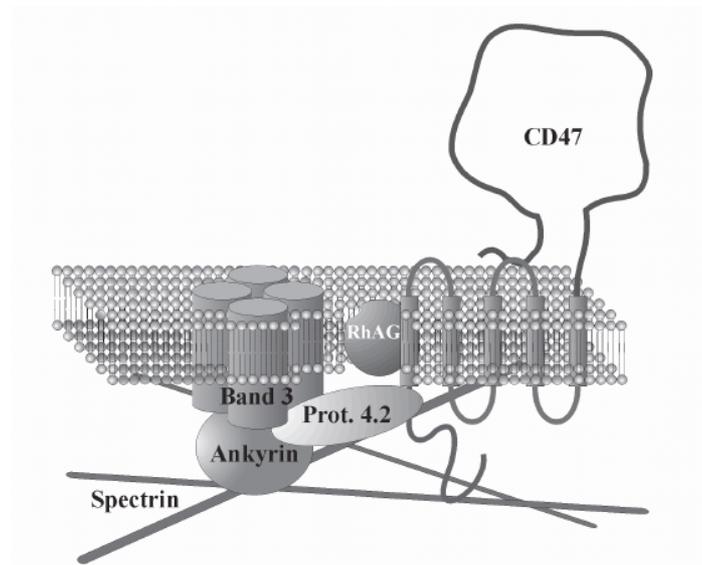


Abb. 2: CD47 als Verbindungsglied zwischen Rh-Komplex und Band3-Komplex [41]

Auf Thrombozyten ist CD47 Teil eines supramolekularen Komplexes bestehend aus Cholesterol, heterotrimeren inhibitorischen G-Proteinen und bestimmten Integrinen. Zu diesen Integrinen zählen der Vitronektinrezeptor $\alpha_v\beta_3$, der Fibrinogenrezeptor $\alpha_{IIb}\beta_3$ sowie der Kollagenrezeptor $\alpha_2\beta_3$ [38;45;46].

Auch auf Leukozyten findet sich CD47 im Komplex mit $\alpha_v\beta_3$, G-Proteinen und weiteren Signalmolekülen in speziellen Membranabschnitten, die reich an Cholesterol und Sphingolipiden sind [38;47]. Ein Teil des leukozytären CD47 liegt zudem in Form von CD47-Oligomeren vor [48].

1.3.3 Funktionen

Entsprechend der weiten Gewebeverteilung von CD47 wird ihm eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen in der Steuerung diverser biologischer Vorgänge zugeordnet. CD47 fungiert als Thrombospondin-Rezeptor und beeinflusst als Integrin-assoziiertes Protein die Ligandenbindung und Funktion von Integrinen. Auf diese Weise werden unter anderem die Zell-Zell-Adhäsion, die Thrombozytenaggregation und -migration, die transendotheliale und transepitheliale Leukozytenmigration sowie die Chemotaxis vaskulärer glatter Muskelzellen stimuliert [33;41;46;49;50].

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass CD47-defiziente Mäuse eine herabgesetzte Widerstandsfähigkeit gegen bakterielle Infekte aufweisen, da CD47 maßgeblich an der infektabhängigen Migration und Aktivierung von Leukozyten beteiligt ist [51].

Darüber hinaus dient CD47 der Apoptoseinduktion aktivierter T-Zellen und ist in die Regulation des Calciumeinstroms in Endothelzellen involviert [52;53]. In kortikalen Neuronen steuert es die synaptische Funktion und das Dendritenwachstum [54].

Schließlich spielt CD47 eine bedeutende Rolle in der Regulation autoimmuner Prozesse.

1.4 CD47 in der Steuerung autoimmuner Prozesse

CD47 ist ein Ligand des inhibitorischen Rezeptors SIRP α (Signal Regulatory Protein alpha), der in hohem Maße auf Makrophagen und anderen phagozytierenden Zellen wie Granulozyten, Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert ist.

Die Phagozytoseaktivität der Makrophagen wird durch aktivierende und inhibitorische Signale gesteuert. Dabei wirkt keines der Signale per se dominierend. Vielmehr entscheidet die relative Stärke darüber, ob Phagozytose stattfindet oder nicht. Aktivierend wirken Signale von den Fc γ -Rezeptoren und Komplement-Rezeptoren, die mit Antikörper- und Komplement-opsonierten Zielzellen interagieren. Ihnen stehen die inhibitorischen CD47-SIRP α -Signale gegenüber [55].

Die Interaktion von CD47 der Zielzelle mit SIRP α des Makrophagen vollzieht sich als direkte Protein-Protein-Bindung [56]. Daraufhin erfolgt eine Tyrosinphosphorylierung intrazellulärer Domänen des SIRP α mit anschließender Aktivierung der Tyro-

sinphosphatase SHP-1 (src homology phosphatase 1). Diese ist durch Dephosphorylierungen in der Lage, tyrosinkinaseabhängige Signalwege zu unterbrechen. Die CD47-SIRP α -Interaktion führt auf diesem Weg zu einer Hemmung der makrophagozytären Zellaktivierung und Phagozytose, sofern ihr Signal stärker ist als das der aktivierenden Rezeptoren [55].

Nach dem gleichen Prinzip verläuft in natürlichen Killerzellen die Signalkaskade inhibitorischer Rezeptoren, die MHC-Klasse-I-Moleküle binden und damit die Zerstörung körpereigener Zellen verhindern [57].

In Analogie zu den MHC-Klasse-I-Molekülen könnte es sich bei CD47 also um ein weiteres Signalprotein der Selbsttoleranz handeln. Als ubiquitäres Molekül ist es überdies auch auf Zellen, wie zum Beispiel Erythrozyten, exprimiert, die kein MHC-Klasse-I besitzen [58].

Zahlreiche tierexperimentelle Studien haben sich mit der Untersuchung von CD47 als Regulator der Selbsttoleranz im Rahmen hämatologischer Autoimmunerkrankungen befasst.

1.4.1 CD47 und Hämolyse

In Versuchen mit Knockout-Mäusen zeigten Oldenborg et al., dass CD47-defiziente (CD47^{-/-}) Spendererythrozyten im Empfängerorganismus von Wildtyp(CD47^{+/+})-Mäusen rasch eliminiert werden, während CD47^{+/+}-Erythrozyten unbeeinträchtigt bleiben. Nach gezielter Blockade von SIRP α werden die CD47^{+/+}-Erythrozyten jedoch in gleichem Maße eliminiert wie CD47^{-/-}-Erythrozyten. Durch testweise Splenektomie und spezifische Zellzerstörung konnten die Makrophagen der roten Milzpulpa als genauer Ort der Erythrozyteneliminierung bestimmt werden. Hier verhindert offenbar die Interaktion zwischen erythrozytärem CD47 und dem SIRP α der Milzmakrophagen eine Phagozytose [58]. In gleicher Weise konnte gezeigt werden, dass CD47 auch die Phagozytose anti-körper- oder komplementopsonierter Erythrozyten hemmt [55].

Hinsichtlich des Einflusses von CD47 auf den Verlauf einer AIHA führten Oldenborg et al. darüber hinaus Untersuchungen an NOD(nonobese diabetic)-Mäusen durch, die genetisch vorprogrammiert an einer AIHA erkranken.

CD47^{+/+}-NOD-Mäuse entwickeln eine spontane milde AIHA im Alter von 300 - 550 Tagen. Bei CD47^{-/-}-NOD-Mäusen hingegen bricht die AIHA bereits wesentlich früher aus und nimmt einen schweren, letalen Verlauf.

Fehlt jedoch der genetische NOD-Hintergrund und damit die Disposition für die Entwicklung einer AIHA, so bricht sie auch in CD47-defizienten Mäusen nicht aus.

Diese CD47^{-/-}-Mäuse weisen allerdings eine erhöhte Sensitivität für eine experimentell induzierte AIHA auf. Nach peritonealer Injektion antierythrozytärer Antikörper entwickeln sie im Vergleich zu CD47^{+/+}-Mäusen bei deutlich niedrigeren Antikörpermengen bereits eine schwere letale AIHA.

Außerdem werden bei gleicher Opsonierung CD47^{-/-}-Erythrozyten im Organismus anämischer CD47^{-/-}-NOD-Mäuse sehr viel schneller eliminiert als CD47^{+/+}-Erythrozyten [59]. CD47-Defizienz allein ist also kein Auslöser einer AIHA, hat aber erheblichen Einfluss auf Schweregrad und Progression der Autoimmunreaktion.

CD47 und Erythrozytenalterung

CD47 könnte einen weiteren Part im multifaktoriellen Prozess der Ausmusterung alternder Erythrozyten spielen. Neben zytoskeletalen Veränderungen, die zu vermehrter Rigidität und damit zum Hängenbleiben der Erythrozyten in der Milzpulpa führen, sowie zahlreichen anderen Modulationen der Oberflächenstrukturen führt womöglich auch der Verlust von CD47 zur gesteigerten Phagozytose ausgedienter Erythrozyten durch Milzmakrophagen [41]. Gestützt wird diese These durch die Feststellung, dass alternde murine Erythrozyten circa 20% ihrer CD47-Menge einbüßen [60].

Außerdem ergaben Analysen gelagerter Erythrozytenkonzentrate, dass die CD47-Menge auf Erythrozyten während der Lagerung signifikant abnimmt, während sich parallel dazu die Menge von löslichem CD47 im Überstand vermehrt [61;62].

Möglicherweise ist diese Reduktion des erythrozytären CD47 verantwortlich für die bekanntermaßen beschleunigte Erythrozyteneliminierung im Empfängerorganismus nach Bluttransfusionen [63].

CD47 und Rh_{Null}

Patienten mit dem seltenen Phänotyp Rh_{Null} bilden keine Rh-Antigene aus. Gleichzeitig ist die CD47-Menge auf ihren Erythrozyten um etwa 75-90% vermindert, während andere Zellen normale CD47-Level exprimieren [34;64-66]. Klinisch weisen Rh_{Null}-Patienten eine milde hämolytische Anämie auf, die durch Splenektomie behoben werden kann

[58;65]. Als Ursache der verkürzten erythrozytären Überlebenszeit wird auch hier die verminderte CD47-SIRP α -Interaktion mit konsekutiv vermehrter Phagozytose durch Milzmakrophagen vermutet [58].

Ähnliche Beobachtungen konnten für die Protein 4.2-Defizienz gemacht werden, bei der ebenfalls eine starke Verminderung der CD47-Expression auf Erythrozyten sowie eine hämolytische Anämie auftreten [43].

1.4.2 CD47 und Thrombozyteneliminierung

Während CD47^{-/-}-Mäuse einerseits unauffällige Erythrozytenparameter aufweisen, entwickeln sie andererseits eine spontane milde Thrombozytopenie, ohne dass sich dabei Hinweise auf eine verkürzte Lebensspanne der Thrombozyten finden.

In Analogie zu Erythrozyten aber werden auch CD47-defiziente Thrombozyten im Empfängerorganismus von Wildtyp-Mäusen rasch phagozytiert, nicht jedoch CD47^{+/+}-Thrombozyten. Zudem erweisen sich CD47^{-/-}-Mäuse als wesentlich sensitiver für die experimentell erzeugte ITP als CD47^{+/+}-Mäuse. Auch die in vitro beobachtete Phagozytose CD47-defizienter Thrombozyten erfolgt deutlich rascher als die von gleichermaßen opsonierten CD47^{+/+}-Thrombozyten. Durch spezifische SIRP α -Blockade lässt sich auch für CD47^{+/+}-Thrombozyten das Phagozytoselevel auf das der CD47^{-/-}-Thrombozyten anheben [67].

1.4.3 CD47 und Eliminierung lymphohämatopoetischer Zellen

Der Einfluss von CD47 auf die Eliminierung lymphohämatopoetischer Zellen wurde in Alloreaktionsversuchen an Mäusen untersucht.

Die Kapazität, im Organismus immundefizienter Mäuse eine Graft-versus-host-Reaktion hervorzurufen, ist für allogene CD47^{-/-}-T-Zellen im Vergleich zu CD47^{+/+}-T-Zellen deutlich eingeschränkt. Im Lymphgewebe der CD47^{+/+}-Empfänger können wenige Tage nach dem Zelltransfer praktisch keine CD47^{-/-}-T-Zellen gefunden werden.

Ebenso sind CD47-defiziente Knochenmarkzellen nicht fähig, in CD47^{+/+}-Empfängern zu proliferieren, sodass zuvor in letaler Dosis bestrahlte Mäuse trotz Knochenmarktransplantation sterben, während die Empfänger von CD47^{+/+}-Knochenmarkzellen überleben.

Sowohl Knochenmarkszellen als auch T-Zellen werden innerhalb von 24 Stunden im Empfängerorganismus von Milzmakrophagen aber auch von dendritischen Zellen vernichtet, wenn ihnen das Oberflächenprotein CD47 fehlt [68].

1.4.4 Lösliches CD47

Nicht nur oberflächengebundenes, sondern auch lösliches CD47 ist in der Lage, die Phagozytoseaktivität von Makrophagen zu beeinflussen. Die Präinkubation von Mausemakrophagen mit löslichem CD47-Streptavidin-Fusionsprotein führt in vitro zur Hemmung der Phagozytose kolloidaler Perfluorcarbonpartikel, die als Medikamentencarrier normalerweise nach i.v.-Injektion schnell phagozytiert und aus dem Blutkreislauf eliminiert werden [69].

1.5 Fragestellung

Patienten mit AIHA oder ITP zeigen ein sehr variables klinisches Bild. Autoantikörper können sowohl als Zufallsbefund beim symptomlosen Gesunden als auch im Zusammenhang mit jeder Verlaufsform vom moderaten Krankheitsbild ohne Therapiebedarf bis hin zum lebensbedrohlichen Zustand detektiert werden [3;7-9].

In der diagnostischen Einschätzung der AIHA werden vor allem die Bestimmung von Antikörperklassen und -subklassen sowie Titer, Affinität, Temperaturamplitude und Komplementbindungsfähigkeit in Betracht gezogen. Keiner dieser Parameter korreliert jedoch zuverlässig mit der Hämolysestärke. [10;11].

Auch für die ITP findet sich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Antikörperklasse, Titer oder Antigenspezifitäten einerseits und dem Ausmaß der Thrombozytenzerstörung andererseits [9].

Es fehlt also ein verlässlicher Parameter, der eindeutige Rückschlüsse auf den Schweregrad der Hämolyse beziehungsweise der Thrombozytopenie zulässt.

Dass CD47 als Phagozytoseinhibitor agieren und damit den Verlauf und den Schweregrad von Autoimmunzytopenien mildern kann, wurde bisher nur in wenigen Tierexperimenten und in vitro untersucht.

Möglicherweise beeinflusst CD47 auch beim Menschen die Phagozytose von Erythrozyten, Thrombozyten und lymphohämatopoetischen Zellen. Es stellt sich daher die Frage, welchen Einfluss die CD47-Expression humaner Blutzellen auf das Ausmaß von Autoimmunzytopenien hat.

In der vorliegenden Arbeit sollte die CD47-Expression bei Patienten mit AIHA und ITP im Vergleich zu Gesunden untersucht werden. Ebenso sollte überprüft werden, ob sich Patienten mit aktiver Hämolyse oder Thrombozytenzerstörung bezüglich ihrer CD47-Expressionslevel von Patienten, die sich in Remission befinden, unterscheiden.

Zu diesem Zweck sollte die CD47-Expression auf Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten sowie als lösliches Protein im Plasma bestimmt werden.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten und gesunde Probanden

In der vorliegenden Studie wurden Patienten mit AIHA vom Wärmetyp sowie Patienten mit ITP aus der Immunhämatologischen Ambulanz des Institutes für Transfusionsmedizin der Charité als Probanden eingeschlossen. Blutproben von gesunden Probanden als Vergleichsgruppe stammen von Blutspendern.

AIHA-Patienten wurden der Gruppe „aktiv“ zugeteilt, wenn zum Untersuchungszeitpunkt eine Anämie im Rahmen der Hämolyse nachgewiesen werden konnte. Patienten ohne Anämie und in nicht transfusionsbedürftigem Zustand wurden der Gruppe „in Remission“ zugeteilt. Die Einteilung der ITP-Patienten erfolgte in „aktiv“ bei Thrombozytenzahlen $< 50.000/\mu\text{l}$ beziehungsweise „in Remission“ bei Thrombozytenzahlen $> 50000/\mu\text{l}$.

2.2 Chemikalien und Geräte

Chemikalien

- PBS-Lösung (nach Dulbecco) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} : Biochrom AG, Berlin, Deutschland
- Hanks' Salzlösung (HBSS) mit $0,35\text{g/l NaHCO}_3$: Biochrom AG, Berlin, Deutschland
- OptiLyse B: Immunotech, Marseille, Frankreich
- Venimmun N, 5%, humanes IgG: Aventis Behring, Marburg, Deutschland
- Rinderalbuminlösung: Biotest, Dreieich, Deutschland

Antikörper

- anti-human CD47-PE (Klon B6H12), Mouse IgG_{1,κ}: Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- anti-human CD41a-FITC (Klon HIP8), Mouse IgG_{1,κ}: Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- anti-human CD45-FITC (Klon HI30), Mouse IgG_{1,κ}: Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

-
- anti-human Blood Group A-FITC (Klon NaM87-1F6), Mouse IgG_{3,κ}: Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
 - anti-human Glycophorin A-PE (Klon GA-R2), Mouse IgG_{2b,κ}: Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Isotypkontrollen

- Mouse IgG_{1,κ}-PE (Klon MOPC-21): Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- Mouse IgG_{1,κ}-FITC (Klon MOPC-21): Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Kalibrierungsbeads

- QuantiBRITE PE: Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Verbrauchsmaterialien

- Citrat-Monovetten: Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Falcon FACS-Röhrchen: Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- Microlance-Kanülen: Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- Einmalspritzen: B. Braun, Melsungen, Deutschland
- Minisart Filter, 0,2µm: Sartorius, Göttingen, Germany
- Pipettenspitzen: Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Geräte

- Durchflusszytometer FACScan flow cytometer: Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- Tischzentrifuge Rotanta/RP: Hettich, Tuttlingen, Deutschland
- Zellzähler: Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Deutschland
- Pipetten 10-1000µl: Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur gleichzeitigen Analyse mehrerer, voneinander unabhängiger physikalischer und biochemischer Eigenschaften einzelner Zellen einer Suspension. Grundlage hierfür bildet die Messung der Fluoreszenz- und Streulichtsignale immunfluoreszenzmarkierter Zellen.

2.3.1 Immunfluoreszenzmarkierung

Im Rahmen der direkten Immunfluoreszenzanalyse werden Zellen mit fluorochromgekoppelten monoklonalen Antikörpern inkubiert, die gegen ein spezifisches Epitop des zu untersuchenden Antigens gerichtet sind.

Fluorochrome sind Verbindungen, die nach Absorption energiereicher Strahlung Licht charakteristischer Wellenlänge emittieren. Dabei springt ein Außenelektron, durch die Energiezufuhr angeregt, auf ein höheres Energieniveau. Beim kurz darauf erfolgenden Rücksprung auf das ursprüngliche, niedrigere Niveau wird ein Teil der zuvor aufgenommenen Energie als Lichtenergie frei. Ein weiterer Teil geht in Form von Wärme verloren, sodass das Emissionsspektrum eines Fluorochroms langwelliger als sein Anregungsspektrum ist (Stokes shift).

Als Strahlenquelle dient zum Beispiel ein Argonlaser, dessen Emissionsspektrum im Absorptionsbereich des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffs liegt.

Durch die Auswahl unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe, die mit derselben Wellenlänge anregbar sind, sich aber in der Emissionswellenlänge gut voneinander unterscheiden, ist innerhalb der Mehrfarbenfluoreszenzanalyse die gleichzeitige Untersuchung mehrerer Parameter einer Zellsuspension durch Anregung mit nur einer einzigen monochromatischen Laserquelle möglich [70].

2.3.2 Geräteaufbau und –funktion

Flüssigkeitssystem

Die Zellsuspension wird aus dem Probenröhrchen durch eine Stahlkapillare in die Messküvette geführt. Eine kontinuierlich zugeleitete Trägerflüssigkeit erfasst die aus der Kapillare austretende Suspension, beschleunigt diese und zieht sie dabei zu einem dünnen Flüssigkeitsfaden im Zentrum der Küvette aus. Dieser Vorgang wird als hydro-

dynamische Fokussierung bezeichnet. Die Zellen passieren nun einzeln und nacheinander den Messpunkt.

Optisches System

Am Messpunkt trifft von einem Argonlaser ausgesendetes Licht der Wellenlänge 488nm auf den Probenstrom. Jede Zelle streut das auftreffende Laserlicht qualitativ und quantitativ gemäß ihren physikalischen Eigenschaften. Die Vorwärtsstreuung (FSC = Forward Angle Light Scatter) im Kleinwinkelbereich von 0 bis 10° ist dabei vor allem abhängig von der Zellgröße, während die Seitwärtsstreuung im Winkel von 90° (SSC = Side Angle Light Scatter) als Maß für die Granularität und Membranfaltung gilt. Blenden und Filter trennen das Seitwärtsstreulicht von der emittierten Fluoreszenz und zerlegen diese weiterhin in die einzelnen Farbbereiche (Abb. 3).

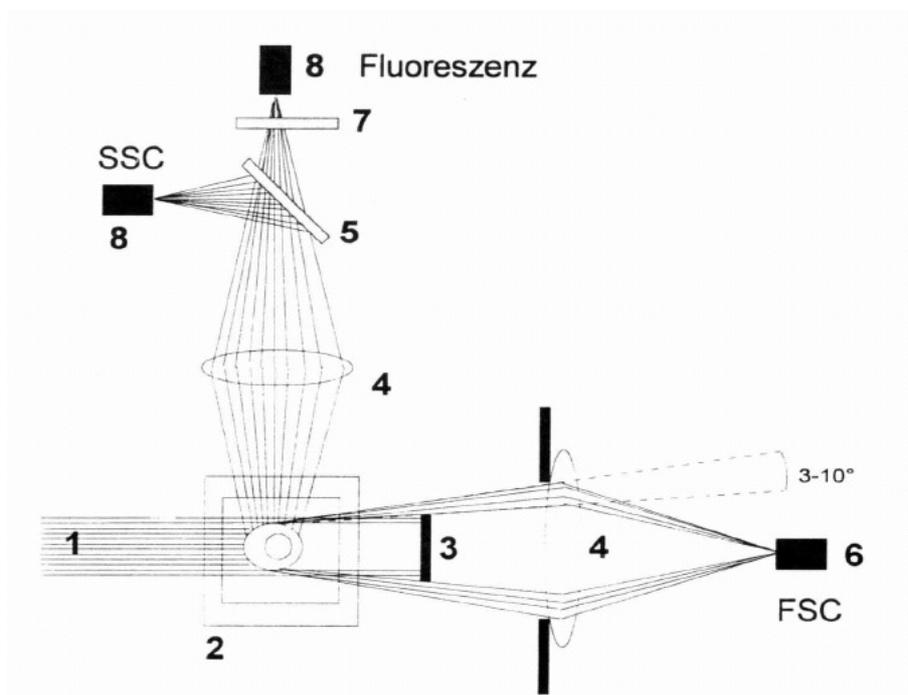


Abb. 3: Optische Elemente eines Durchflusszytometers: 1=Laserstrahl, 2=Messkuvette, 3=Blockerstreifen, 4=Sammellinse, 5=Teilerspiegel, 6=Photodiode, 7=Lichtfilter, 8=Photomultiplier.[70]

Signalverarbeitung

Die optischen Signale werden in Photodetektoren in elektrische Signale umgewandelt und je nach Messbereichsumfang linear oder logarithmisch verstärkt. Durch einen Analog-Digital-Wandler erfolgt die Konversion der Signalintensitäten in Klassen. Die Speicherung der Daten erfolgt in einer Listendatei, die die ursprüngliche Korrelation der einzelnen Werte einer jeden Zelle beibehält und somit die wiederholte Datenauswertung nach verschiedenen Aspekten ermöglicht [70].

2.3.3 Messergebnisse

Für die Auswertung der gemessenen Daten stehen verschiedene Darstellungsformen zur Verfügung.

In einem Punktehistogramm (Dot Plot) wurden die zwei Parameter Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht zueinander in Beziehung gesetzt. Dabei entspricht jeder Punkt mindestens einer Zelle oder aber mehreren Zellen mit identischen Eigenschaften (Abb. 4).

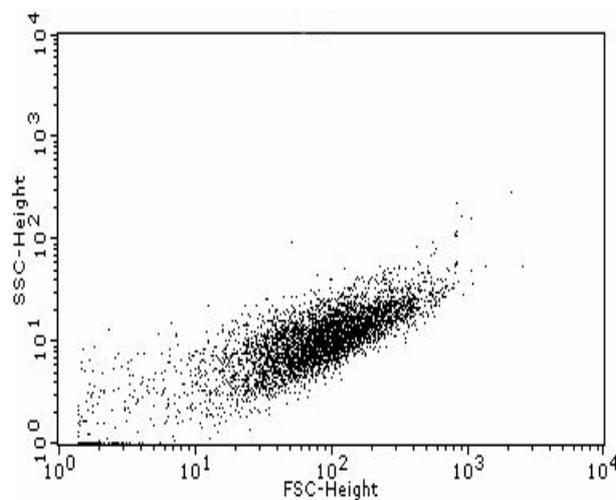


Abb. 4: Dot Plot

Für die Auswertung der Immunfluoreszenzmessungen wurde das Histogramm gewählt. In dieser einparametrischen Häufigkeitsverteilung wird jedem Messkanal die Anzahl der entsprechenden Messwerte zugeordnet (Abb. 5).

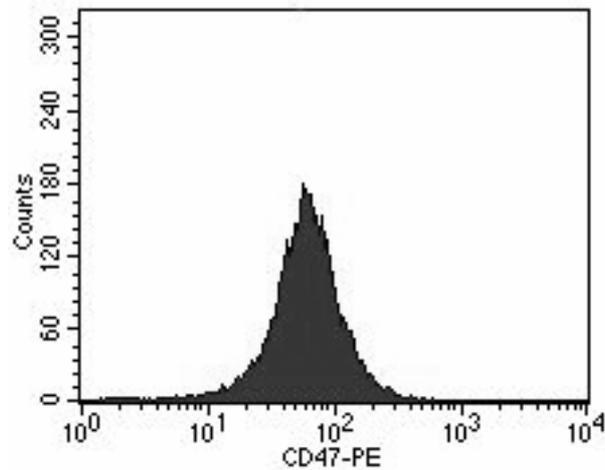


Abb. 5: Histogramm

2.3.4 Gating

Um die Messdaten auswerten zu können, müssen die interessierenden Zellen zunächst von anderen Zellarten, Zelltrümmern und Aggregaten abgegrenzt werden.

Die zu untersuchende Zellpopulation wurde dazu im Dot Plot des Vorwärts-Seitwärts-Scatters anhand ihrer spezifischen Größen- und Granularitätsmerkmale identifiziert und in Form eines Auswertefensters markiert. Durch dieses so genannte Gating wurden alle nun folgenden Fluoreszenzanalysen ausschließlich für Ereignisse durchgeführt, die innerhalb des eingegrenzten Bereiches liegen.

Für das Gating von Thrombozyten, Lymphozyten und Granulozyten wurde als zusätzliches Identifikationskriterium die positive Fluoreszenz nach Markierung mit FITC-gekoppeltem anti-CD41a (Thrombozyten) beziehungsweise anti-CD45 (Lymphozyten und Granulozyten) festgelegt (Abb. 6).

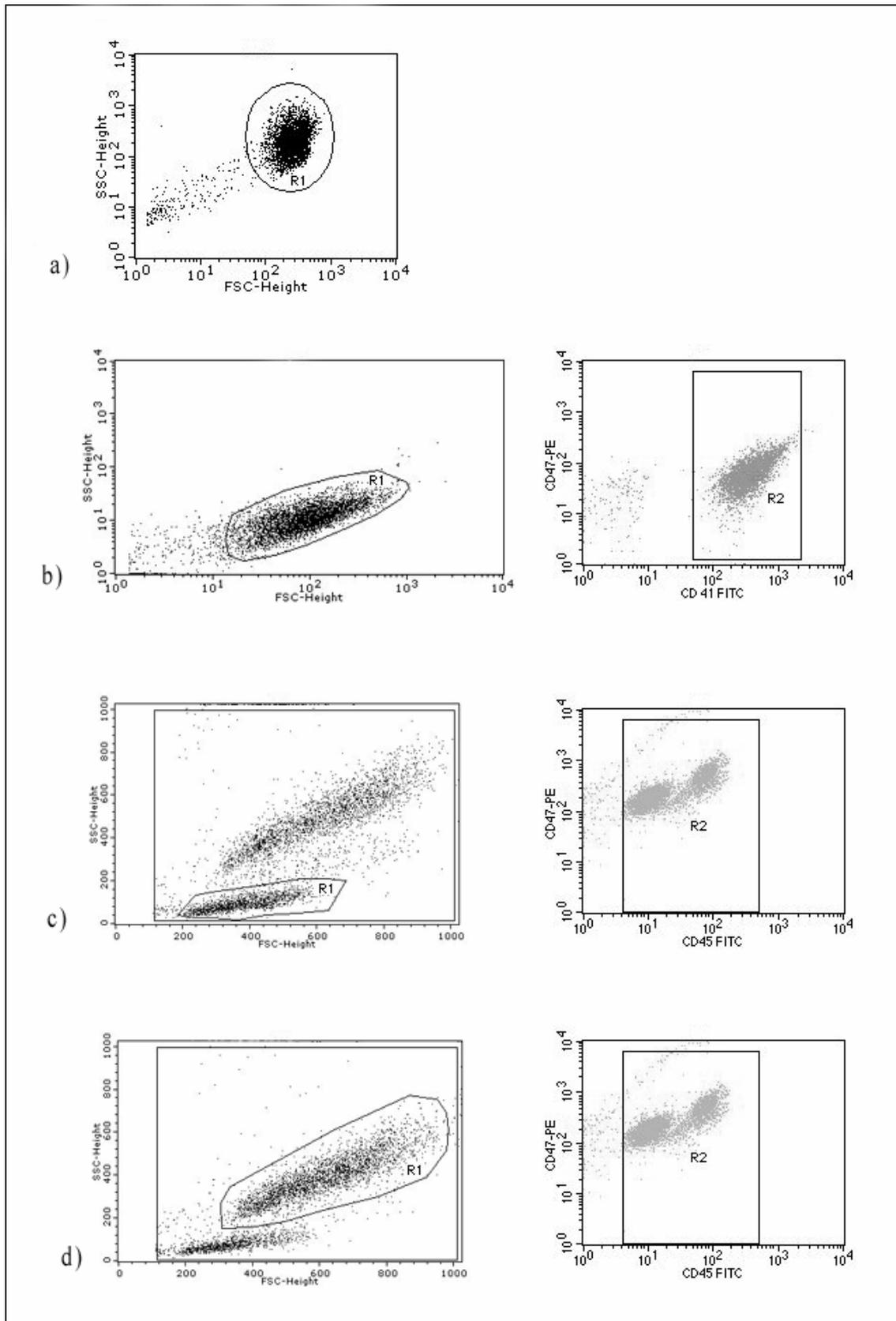


Abb. 6: Gatingstrategien für Erythrozyten (a), Thrombozyten (b), Lymphozyten (c), Granulozyten (d). Messereignisse werden nur dann in die Auswertung einbezogen, wenn sie die Bedingungen der Auswertefenster R1 und R2 erfüllen.

2.3.5 Autofluoreszenz

Alle Zellen weisen eine Autofluoreszenz auf, die von normalen Zellbestandteilen wie Flavinen und Cytochromen ausgeht [71]. Um die Verfälschung der Messergebnisse durch diese unspezifische Fluoreszenz zu verhindern, wurden für die unterschiedlichen Zellpopulationen zunächst Analysen mit Isotypkontrollen durchgeführt. Dafür wurden die Zellansätze mit FITC- und PE-gekoppelten Antikörpern inkubiert, die zwar dem Isotyp des anti-CD47-Antikörpers entsprechen, aber keine Spezifität für das Antigen besitzen. Anhand der Fluoreszenzmessung dieser ungefärbten Zellansätze wurden nun die Photoröhrenspannungen und Verstärker so eingestellt, dass die Population im Dotplot jeweils durch die erste Dekade der logarithmischen Fluoreszenzachsen begrenzt wird. Entsprechende Quadrantenmarker bilden schließlich die Grenze zwischen antigenpositiven und –negativen Zellen (Abb. 7).

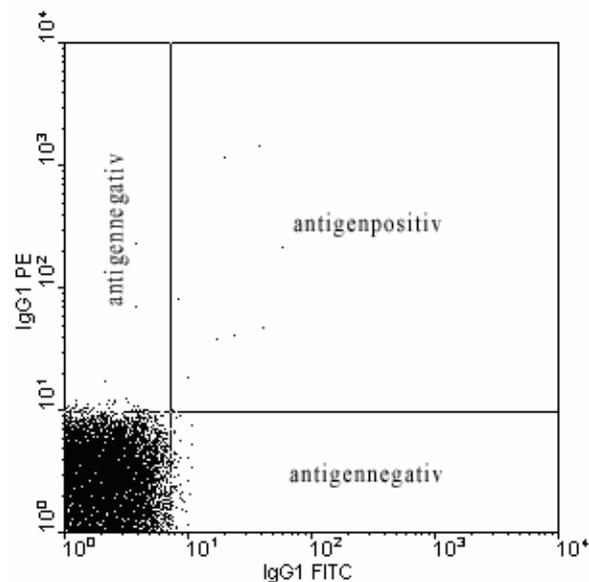


Abb. 7: Quadrantenmarker zur Festlegung des Bereichs antigenpositiver Zellen

2.3.6 Fluoreszenzkomensation

Bei der gleichzeitigen Verwendung zweier Antikörper mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen ist zu beachten, dass sich die Fluoreszenzspektren von FITC und PE überlappen, sodass ein Teil der FITC-Fluoreszenz im PE-Kanal detektiert wird und umgekehrt. Um diesen unerwünschten Effekt zu korrigieren, muss von jedem Signalimpuls der durch die spektrale Überstrahlung verursachte Fluoreszenzanteil subtrahiert werden

[70]. Zur Geräteeinstellung wurden mit jeweils nur einem der beiden fluoreszenzmarkierten Antikörper inkubierte Zellansätze einzeln gemessen. Die Kompensationselektronik konnte nun so eingestellt werden, dass diese einfach positiven Zellen im entsprechend anderen Fluoreszenzkanal denselben Grenzwert haben wie negative Zellen (Abb. 8).

Eine solche Kompensationseinstellung ist abhängig von der Photoröhrenspannung, die anschließend nicht mehr verändert werden darf.

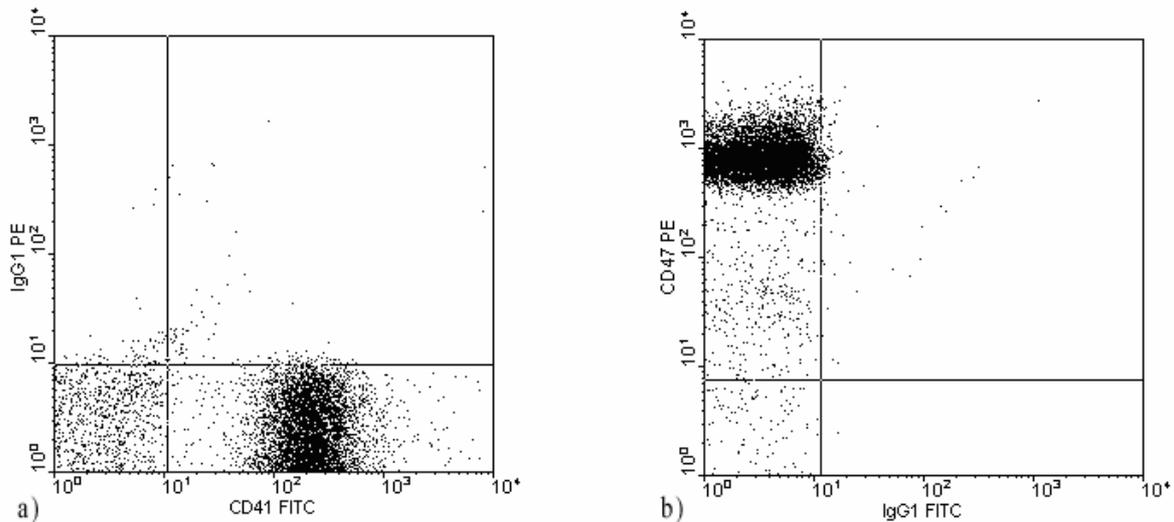


Abb. 8: Fluoreszenzkomensation mit FITC-positiven (a) und PE-positiven (b) Zellen

2.3.7 Fc-Rezeptor-Blockade

Viele Zellen besitzen Fc-Rezeptoren für Immunglobuline. Deshalb kann bei Inkubation mit farbstoffgekoppelten Antikörpern zusätzlich zur spezifischen Bindung des Antikörpers an das gesuchte Antigenepitop eine unspezifische Färbung der Zellen durch Bindung des Antikörpers an den Fc-Rezeptor erfolgen. Dieser unerwünschte Effekt wird verhindert, indem die Zellsuspension mit einem Immunglobulin präinkubiert wird, das dem Isotyp des später verwendeten fluoreszenzgekoppelten Antikörpers entspricht, aber keine Spezifität für das zu untersuchende Antigen besitzt. So werden die Fc-Rezeptoren abgesättigt und stehen im Folgenden nicht mehr für die unspezifische Bindung zur Verfügung [71]. Dementsprechend wurde jede Probe noch vor dem eigentlichen Färbeschritt mit humanem IgG inkubiert.

2.4 Quantitative Durchflusszytometrie

Der weit verbreitete Einsatz der Durchflusszytometrie zur qualitativen Probenauswertung beschränkt sich zumeist auf die Ermittlung der Anteile antigenpositiver und antigennegativer Zellen innerhalb einer Population. Dabei werden Zellen dann als positiv für die Expression eines spezifischen Antigens identifiziert, wenn ihre Messung einen Fluoreszenzintensitätslevel ergibt, der oberhalb eines mehr oder weniger willkürlich festgelegten Grenzwertes liegt.

Hingegen werden im Rahmen der quantitativen Durchflusszytometrie Unterschiede der Fluoreszenzintensitäten quantifiziert, um so die heterogenen Expressionslevel eines Antigens in verschiedenen Zellpopulationen miteinander vergleichen zu können.

2.4.1 Kalibrierung mit QuantiBRITE

Um akkurate, vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, bedarf es einer Eichung der Fluoreszenzintensitätsskalierung mit Hilfe von fluorochromkonjugierten Kalibrierungsbeads. Das verwendete QuantiBRITE-Set besteht aus einem Gemisch von vier Bead-Populationen mit jeweils definierter Anzahl PE-Moleküle (Abb. 9). Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der Beads wurden gegen die entsprechenden PE-Molekülzahlen aufgetragen, sodass die lineare Regressionsgerade $y = ax + b$ (mit a = Steigung, b = Achsenschnittpunkt, $y = \log_{10}$ der Fluoreszenzintensität, $x = \log_{10}$ der PE-Molekülzahl) berechnet werden konnte (Abb. 10).

Voraussetzung für die Kalibrierung ist, dass die Beads mit exakt denselben Instrumenteneinstellungen gemessen werden wie später die Proben. Deshalb wurden Messung und Regressionsanalyse mit drei Ansätzen der QuantiBRITE-Beads jeweils gesondert in den Instrumenteneinstellungen für Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten durchgeführt.

Anhand der ermittelten Regressionsgleichung konnten später die geometrischen Mittel der gemessenen Fluoreszenzintensitäten in „PE-Moleküle pro Zelle“ konvertiert werden, um so einen exakten Vergleich der unterschiedlichen CD47-Expressionslevel zu ermöglichen.

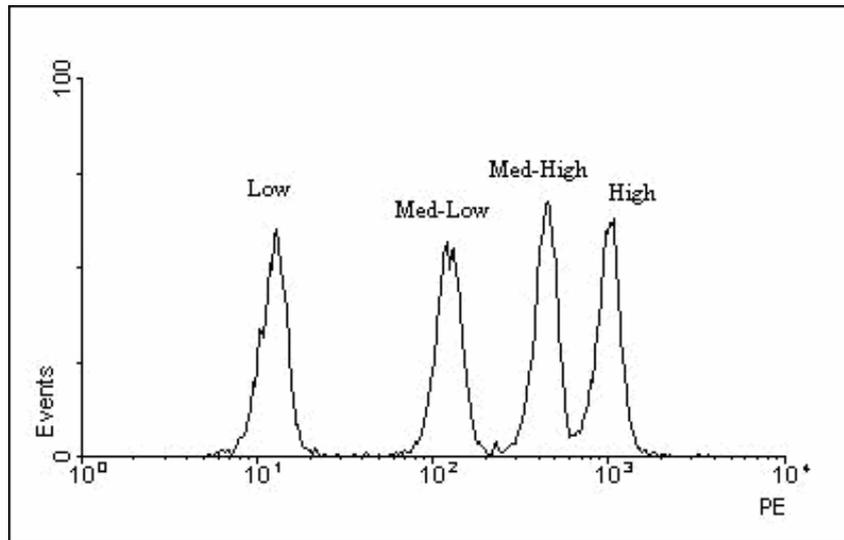


Abb. 9: Fluoreszenzintensitäten der vier Bead-Populationen

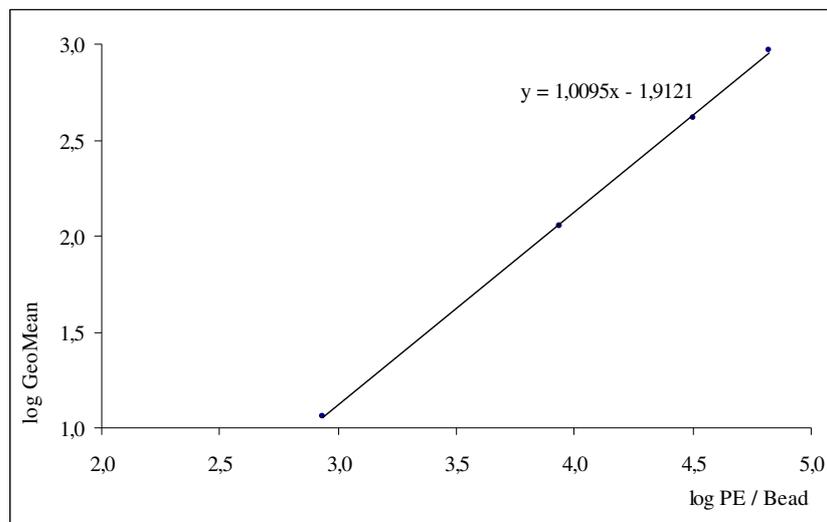


Abb. 10: Errechnete Regressionsgerade

2.4.2 Quantifizierung von löslichem CD47 im Plasma

Durchflusszytometrische Messungen setzen voraus, dass ein zu analysierendes Antigen an die Oberfläche einer Zelle oder eines anderen Partikels gebunden ist. Um lösliches CD47 zunächst an anti-CD47-beladene Kunststoffpartikel zu binden und anschließend mit fluorochrommarkiertem Antikörper zu detektieren, werden zwei Antikörper benötigt, die nicht um dasselbe Antigenepitop konkurrieren.

Die zur Verfügung stehenden anti-CD47-Klone B6H12 (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland), BRIC 125 (International Blood Group Reference Laboratory, Bristol, England) und BRIC 126 (AbD Serotec, Oxford, UK) wurden paarweise auf Epitopbindungskonkurrenz untersucht. Dabei zeigte sich der kompetitive Bindungscharakter für jede aller möglichen Kombinationen dadurch, dass die Vorinkubation mit einem ungefärbten Antikörperklon die Fluoreszenzmarkierung einer Zellsuspension durch den zweiten, fluorochrommarkierten Klon hemmt.

Deshalb musste die Quantifizierung des löslichen CD47 im Plasma auf indirektem Wege im Rahmen eines Hemmversuches erfolgen. Nach Vorinkubation des Plasmas mit PE-markiertem anti-CD47 wurden Erythrozyten hinzugegeben und es folgte ohne erneute Antikörperzugabe ein weiterer Inkubationsschritt. Für die Detektion von erythrozytengebundenen CD47-Molekülen standen nun nur noch diejenigen Antikörper zur Verfügung, die zuvor nicht bereits lösliches CD47 gebunden hatten. Damit steht die Menge an löslichem CD47 in umgekehrt proportionalem Verhältnis zur gemessenen Fluoreszenzintensität auf Erythrozyten.

Als Referenzprobe diente eine sechsprozentige Rinderalbuminlösung, die in der Vorinkubation mangels löslichem CD47 keine Antikörper wegfangen konnte und deshalb wesentlich höhere Fluoreszenzintensitäten als die Plasmaproben erbrachte. Durch Subtraktion der Fluoreszenzwerte der Plasmamessungen von den Albuminkontrollwerten konnte schließlich ein Wert ermittelt werden, der direkt proportional zur Menge an löslichem CD47 ist.

Die Erythrozyten stammten für alle Ansätze vom selben Spender der Blutgruppe 0, Rhesus negativ.

2.5 Methodvalidierung

2.5.1 Präzisionskontrollen

Um die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse zu überprüfen, wurden Präzisionskontrollen durchgeführt. Inter-Assay-Kontrollen umfassten die parallele Durchführung aller Arbeitsschritte an vier Erythrozytenansätzen derselben Blutprobe und den anschließenden Vergleich der Fluoreszenzintensitäten. Für Intra-Assay-Kontrollen wurde ein einzi-

ger Erythrozytenansatz dreimal hintereinander am Durchflusszytometer analysiert (Tabelle 1).

Tabelle 1: Präzisionskontrollen. CV = Variationskoeffizient

	n	Mittelwert der Fluoreszenzintensitäten	Standardabweichung	CV (%)
Inter-Assay	4	1109,86	21,38	1,93
Intra-Assay	3	1076,77	9,09	0,84

2.5.2 Rh_{Null}

Als Vergleichsprobe für die Bestimmung verminderter CD47-Expressionslevel dienten Erythrozyten des seltenen Phänotyps Rh_{Null}, die bekanntermaßen bedeutend weniger CD47 exprimieren als Erythrozyten aller anderen Blutgruppen [34;44].

2.5.3 Plasma-Hemmversuch mit Referenzantigenen

Die Eignung des Plasma-Hemmversuchs zum Nachweis löslicher Proteine wurde durch Kontrollversuche mit Referenzantigenen überprüft.

Als Positivkontrolle diente Plasma eines Spenders der Blutgruppe A Lewis(a-b+), der als Sekretor lösliches Blutgruppenantigen A im Plasma aufweist. In der Negativkontrolle wurde Blutplasma auf Glycophorin A untersucht, das nicht sezerniert wird und deshalb nicht in löslicher Form vorliegt.

2.6 Probenverarbeitung

Die Blutentnahme erfolgte mit Citratmonovetten. Die Blutproben wurden per Hand transportiert und innerhalb eines engen Zeitfensters von wenigen Stunden weiterverarbeitet.

Zur Herstellung der Zellsuspensionen der verschiedenen Blutzellpopulationen wurden Proben in folgender Reihenfolge aus der Monovette gewonnen:

1. Entnahme von Vollblut für die Leukozytenpräparation
2. Zentrifugation des Restblutes: 800 U/min, ohne Bremse, 25min

3. Abnahme des Überstandes (PRP = plättchenreiches Plasma) für die Thrombozytenpräparation
4. Scharfe Zentrifugation des Rückstands zur Gewinnung von Erythrozytensediment: 3000 U/min, 5min
5. Abnahme von 2ml Plasma aus dem Überstand

2.6.1 Erythrozytenpräparation

Herstellung der Erythrozytensuspension:

- Lösen von 10 μ l Erythrozytensediment in 1000 μ l PBS
- Bestimmung der Erythrozytenzahl im Zellzähler und Verdünnung der Suspension auf 10000 Erythrozyten/ μ l

Fc-Rezeptor-Blockade:

- Inkubation von 10 μ l Erythrozytensuspension mit 20 μ l humanem IgG (5%), 15min bei Raumtemperatur, im Dunkeln

Färbeschritt:

- Inkubation mit 20 μ l PE-markiertem anti-CD47, 30min bei Raumtemperatur, im Dunkeln

Inkubationsstopp:

- Zugabe von 500 μ l PBS

2.6.2 Thrombozytenpräparation

Thrombozyten können durch mechanischem Stress oder Kälte sehr schnell aktiviert werden. Um eine solche Aktivierung, die unter Umständen Einfluss auf die Oberflächenproteine nehmen kann, zu verhindern, wurden die Thrombozyten äußerst vorsichtig behandelt. Sämtliche Chemikalien wurden vor der Verwendung auf Raumtemperatur erwärmt, Pipettierschritte wurden besonders vorsichtig und Zentrifugationen ohne Bremse durchgeführt.

Herstellung der Thrombozytensuspension:

- Zentrifugation von 1ml PRP: 800 U/min, ohne Bremse, 5min
- Dekantieren und Resuspension des Pellets in 500µl HANKS
- Bestimmung der Thrombozytenzahl im Zellzähler und Verdünnung der Suspension auf 5000 Thrombozyten/µl

Fc-Rezeptor-Blockade:

- Inkubation von 50µl Thrombozytensuspension mit 20µl humanem IgG (5%), 15min bei Raumtemperatur, im Dunkeln

Färbeschritt:

- Inkubation mit 10µl PE-markiertem anti-CD47 und 10µl FITC-markiertem anti-CD41, 30min bei Raumtemperatur, im Dunkeln

Inkubationsstopp:

- Zugabe von 500µl HANKS

2.6.3 Leukozytenpräparation

Zur Gewinnung der Leukozytensuspension aus dem Vollblut mussten die in circa tausendfacher Überzahl vorhandenen Erythrozyten zunächst mit der Optilyse-Lösung lysiert werden, damit die zu analysierenden Zellen angereichert und unspezifisch anfärbare Zellen gleichzeitig entfernt werden konnten.

Herstellung der Leukozytensuspension:

- Inkubation von 200µl Vollblut mit 200µl Optilyse, 10min bei Raumtemperatur, im Dunkeln
- Nach Zugabe von 4ml Aqua dest. Inkubation 10min bei Raumtemperatur, im Dunkeln
- Scharfe Zentrifugation: 1800 U/min, 10min
- Dekantieren und Resuspendieren und Zugabe von 2ml PBS
- Scharfe Zentrifugation: 1800 U/min, 10min
- Dekantieren und Resuspendieren in 300µl PBS
- Bestimmung der Leukozytenzahl im Zellzähler und Verdünnung der Suspension auf 2000 Leukozyten/µl

Fc-Rezeptor-Blockade:

- Inkubation von 50µl Leukozytensuspension mit 20µl humanem IgG (5%), 15min bei Raumtemperatur, im Dunkeln

Färbeschritt:

- Inkubation mit 20µl PE-markiertem anti-CD47 und 10µl FITC-markiertem CD45, 30min bei Raumtemperatur, im Dunkeln

Inkubationsstopp:

- Zugabe von 500µl PBS

2.6.4 Plasmapräparation und Hemmversuch

Jede Plasmaprobe wurde vor der Verarbeitung zunächst durch Filtration von verunreinigenden Kleinstbestandteilen befreit. Die Herstellung des Erythrozytensedimentes erfolgte für jeden Versuchsansatz vom selben Spender der Blutgruppe 0, Rhesus negativ.

Aufbereitung der Plasmaprobe:

- Sterilfiltration mit Minisart-Filtern (Porengröße 0,2 µm)

Herstellung der Erythrozytensuspension:

- Scharfe Zentrifugation des Vollblutes zur Gewinnung von Erythrozytensediment: 3000 U/min, 5min
- Verdünnung des Erythrozytensedimentes 1:1010 mit PBS

Plasmainkubation:

- Inkubation von 10µl Plasma (bzw. 10µl 6%iger Albuminlösung als Referenzprobe) mit 10 µl 1:7 verdünntem, PE-markiertem anti-CD47 30min bei Raumtemperatur, im Dunkeln

Erythrozyteninkubation:

- Zugabe von 20µl Erythrozytensuspension und Inkubation 30 min bei Raumtemperatur, im Dunkeln

Inkubationsstopp:

- Zugabe von 500µl PBS

2.7 Auswertung

Es wurden keine absoluten Zahlen von CD47-Molekülen pro Zelle, sondern miteinander vergleichbare relative CD47-Expressionslevel bestimmt. Als Korrelat für die relative CD47-Menge dient hierbei die Zahl der antikörpergekoppelten PE-Moleküle, die auf den zu untersuchenden Zellen detektiert wurden. Entsprechend erfolgt die Darstellung der CD47-Expression im Folgenden grundsätzlich als „PE-Moleküle pro Zelle“.

Vergleiche der CD47-Expression können dabei ausschließlich innerhalb einer Zellsorte durchgeführt werden. Der Vergleich relativer Expressionslevel zwischen verschiedenen Zellsorten ist aufgrund unterschiedlicher Präparationsprotokolle und Instrumenteneinstellungen nicht möglich.

2.7.1 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS für Windows, Version 11 (SPSS Inc., Chicago, USA).

Alle Stichproben wurden zunächst mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest auf Normalverteilung untersucht. Mit dem Levene-Test wurde zwischen den zu vergleichenden Gruppen auf Varianzenhomogenität getestet.

Die Gruppenvergleiche erfolgten mit dem Tukey Kramer-Test für paarweise Mittelwertvergleiche. Er ist eine Variante des Tukey HSD (honestly significant difference) und kommt bei ungleichen Stichprobenumfängen zum Einsatz. Der Tukey-Test gilt als Verfahren mit Allgemeintestcharakter und kann somit auch ohne vorgeschaltete Varianzanalyse durchgeführt werden [72]. Voraussetzungen sind Normalverteilung sowie Varianzenhomogenität der Stichproben.

Das multiple Signifikanzniveau als maximale Wahrscheinlichkeit, mindestens eine der einzelnen Nullhypothesen irrtümlich abzulehnen, wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt.

Zellgröße und CD47-Expression wurden anhand der Korrelation nach Pearson auf einen linearen Zusammenhang untersucht. Als Signifikanzniveau wurde auch hier $\alpha = 0,05$ festgelegt.

2.7.2 Darstellung der Ergebnisse

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgt in Form von Boxplot-Diagrammen. Dabei bilden unteres Quartil (25%-Quantil) und oberes Quartil (75%-Quantil) die Begrenzungen der Box. Der Median ist als mittlere Querlinie dargestellt. Die so genannten Whiskers reichen als vertikale Linien bis zum minimalen beziehungsweise maximalen Wert, sofern diese innerhalb des anderthalbfachen Interquartilsabstands liegen. Werte zwischen dem anderthalbfachen und dreifachen Interquartilsabstand werden als „Ausreißer“ definiert und mit einem Kreis (○) gekennzeichnet. Werte außerhalb des dreifachen Interquartilsabstands gelten als „Extremwerte“ und werden mit einem Stern (*) markiert.

3 Ergebnisse

3.1 CD47-Expression auf Erythrozyten

Die Quantifizierung der CD47-Expression auf Erythrozyten ergab weder im Vergleich zwischen Gesunden und AIHA-Patienten ($p=0,555$) noch zwischen Gesunden und ITP-Patienten ($p=0,996$) einen signifikanten Unterschied.

Auch AIHA-Patienten und ITP-Patienten unterschieden sich hinsichtlich ihrer erythrozytären CD47-Expression nicht signifikant voneinander ($p=0,528$).

Dagegen erbrachte die Untersuchung von Erythrozyten der Blutgruppe Rh_{Null} eine Reduktion der CD47-Menge auf weniger als ein Zehntel der Menge normaler Erythrozyten (Abb. 11).

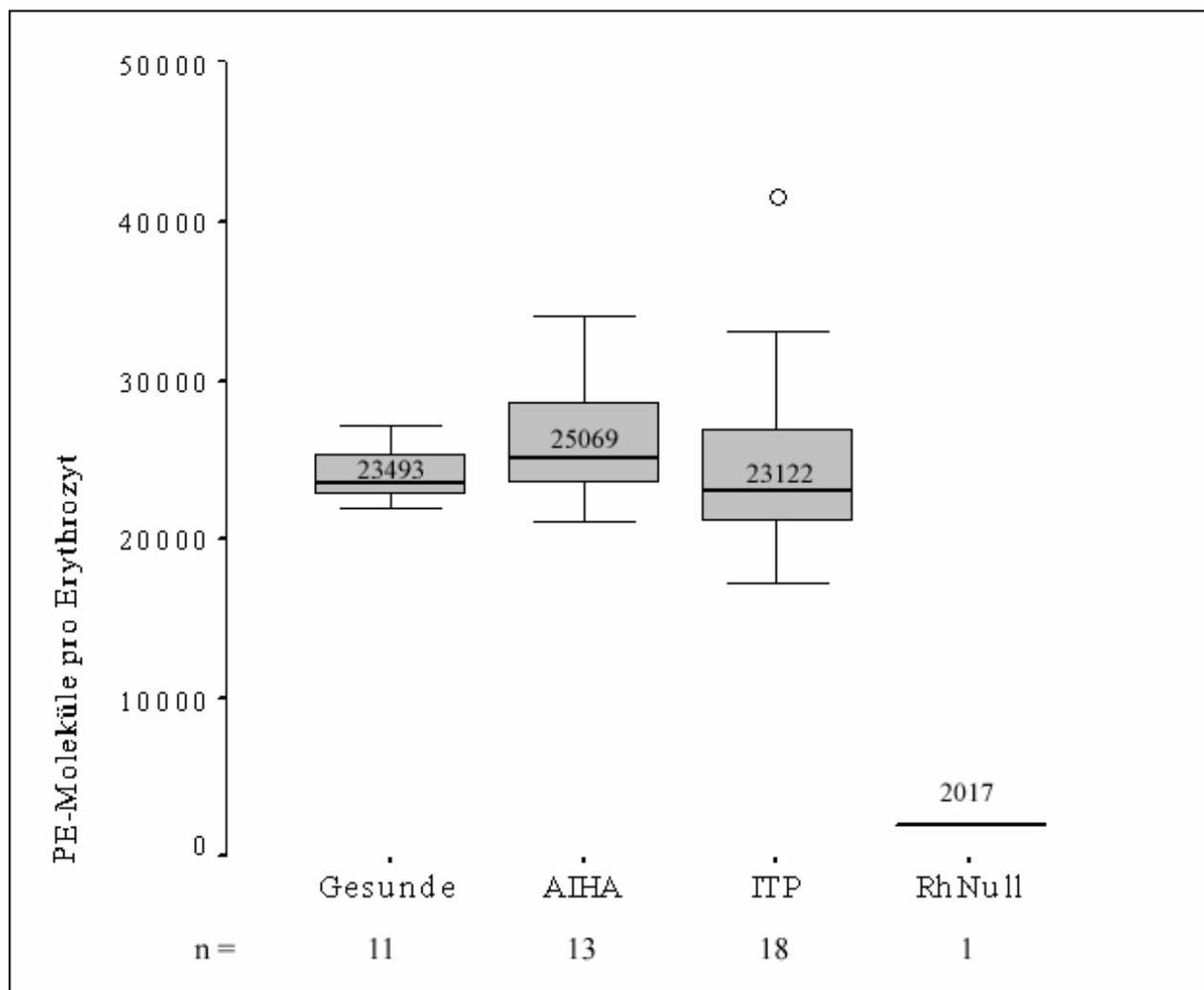


Abb. 11: CD47-Expression auf Erythrozyten mit Angabe der Medianwerte. n = Stichprobengröße.

Die erythrozytäre CD47-Expression wurde darüber hinaus zwischen den zwei Subgruppen der AIHA-Patienten verglichen. Dabei ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit aktiver AIHA und Patienten in Remission ($p=0,487$) (Abb. 12). Außerdem zeigte sich kein Unterschied zwischen Patienten mit aktiver AIHA und Gesunden ($p=0,178$) oder zwischen Patienten in Remission und Gesunden ($p=0,930$).

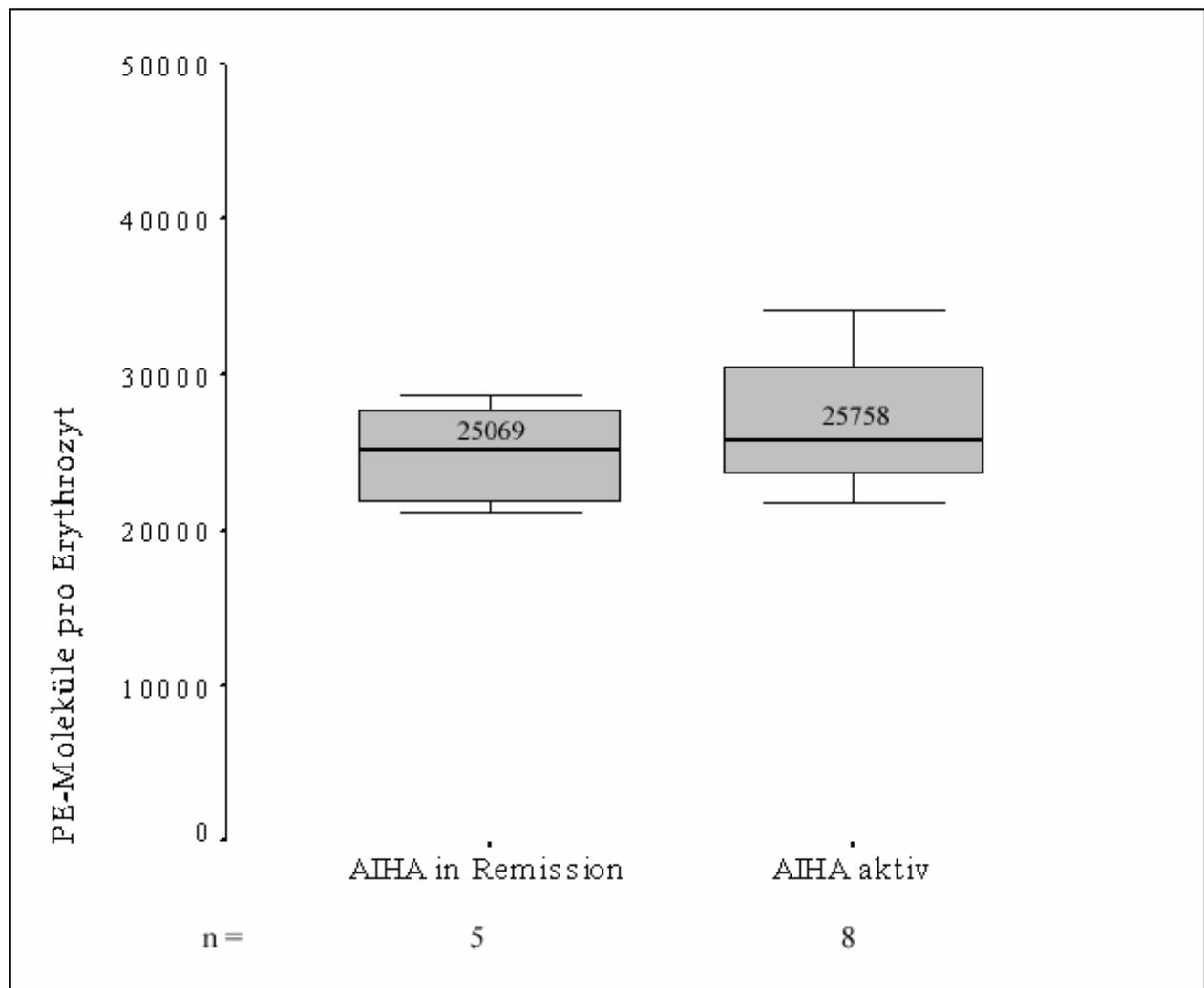


Abb. 12: CD47-Expression auf Erythrozyten. Vergleich der AIHA-Subgruppen mit Angabe der Medianwerte. n = Stichprobengröße.

3.2 CD47-Expression auf Thrombozyten

Thrombozyten von ITP-Patienten unterschieden sich hinsichtlich ihrer CD47-Menge nicht signifikant von den Thrombozyten Gesunder ($p=0,858$).

Ebenso zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen AIHA-Patienten und Gesunden ($p=0,883$) sowie zwischen ITP-Patienten und AIHA-Patienten ($p=0,999$) (Abb. 13).

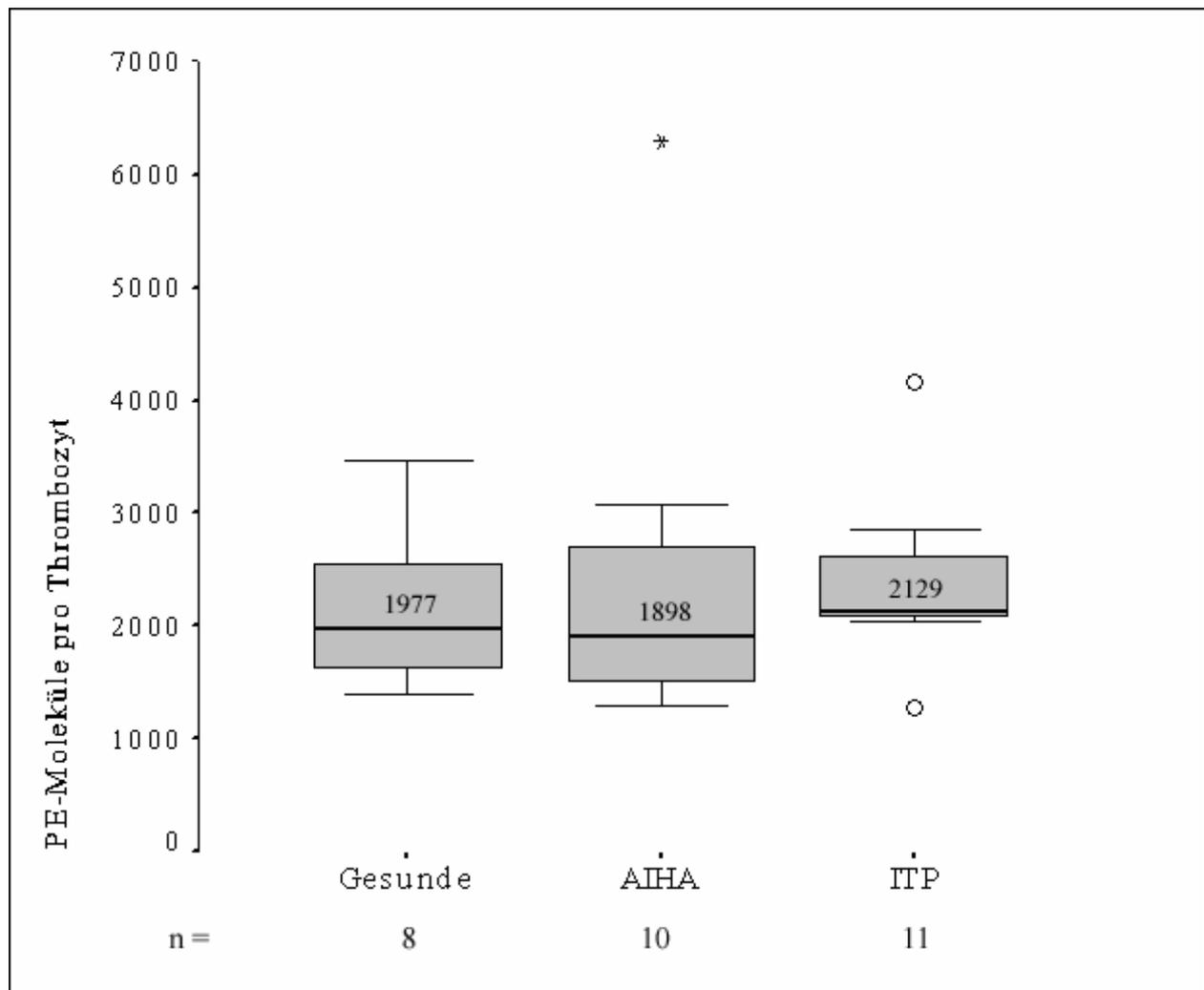


Abb. 13: CD47-Expression auf Thrombozyten mit Angabe der Median-Werte. n = Stichprobengröße.

Innerhalb der Gruppe der ITP-Patienten zeigte sich zwischen Patienten mit aktiver ITP und Patienten in Remission keine unterschiedlich exprimierte thrombozytäre CD47-Menge ($p=0,940$) (Abb. 14).

Ebenso unterschieden sich weder Gesunde und Patienten mit aktiver ITP ($p=0,717$) noch Gesunde und Patienten in Remission ($p=0,862$) hinsichtlich ihrer CD47-Expression auf Thrombozyten voneinander.

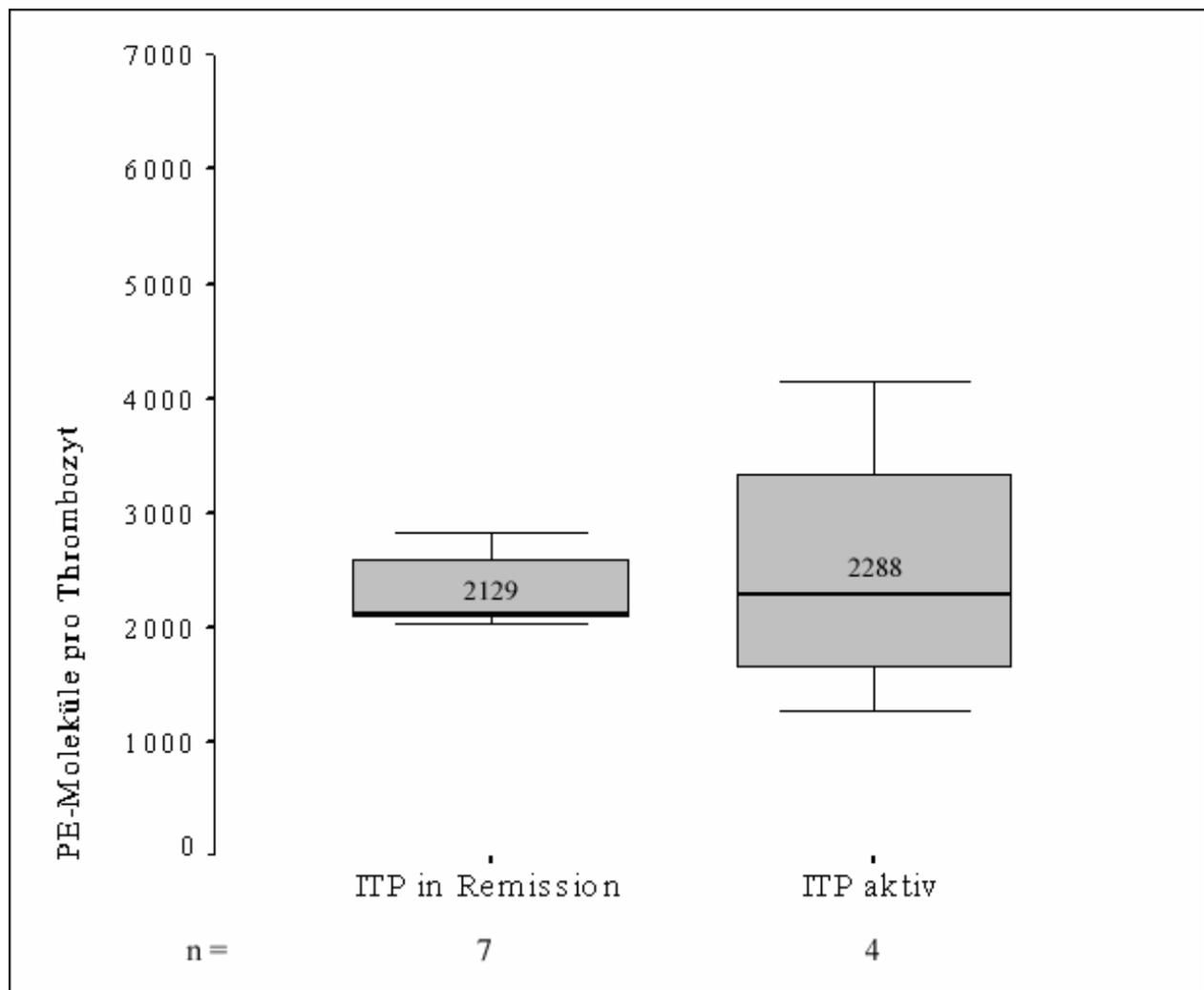


Abb. 14: CD47-Expression auf Thrombozyten. Vergleich der ITP-Subgruppen mit Angabe der Medianwerte. n = Stichprobengröße.

3.3 CD47-Expression auf Lymphozyten

Die Lymphozytenmessungen ergaben, dass ITP-Patienten signifikant weniger CD47 exprimieren als Gesunde ($p=0,033$) und AIHA-Patienten ($p=0,015$). Zwischen AIHA-Patienten und Gesunden zeigte sich hingegen kein signifikanter Unterschied ($p=0,994$) (Abb. 15).

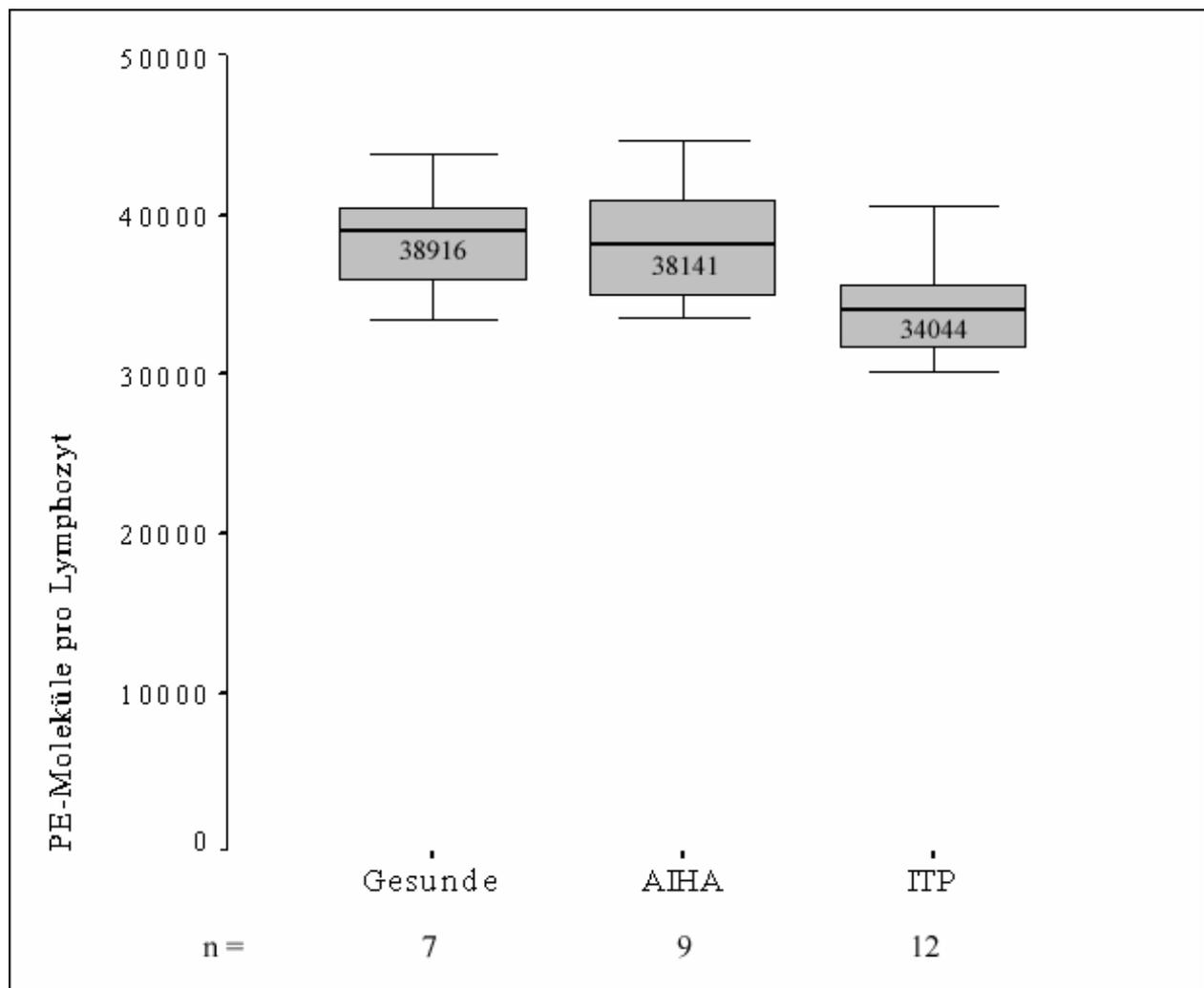


Abb. 15: CD47-Expression auf Lymphozyten mit Angabe der Medianwerte. n = Stichprobengröße.

3.3.1 Einfluss der Lymphozytengröße auf die CD47-Expression

Die Betrachtung der mittleren Lymphozytengröße ergab beim Vergleich aller untersuchten Probanden deutliche individuelle Unterschiede. Das geometrische Mittel der Vorwärtsstreuung (FSC) als Maß für die mittlere Zellgröße der Lymphozyten eines Patienten wies eine interindividuelle Streubreite von 331,2 - 426,4 auf.

Die Untersuchung auf einen Zusammenhang zwischen Zellgröße und CD47-Expression erbrachte eine statistisch signifikante ($p=0,032$), positive Korrelation nach Pearson mit dem Korrelationskoeffizienten $r=0,4069$ (Abb. 16).

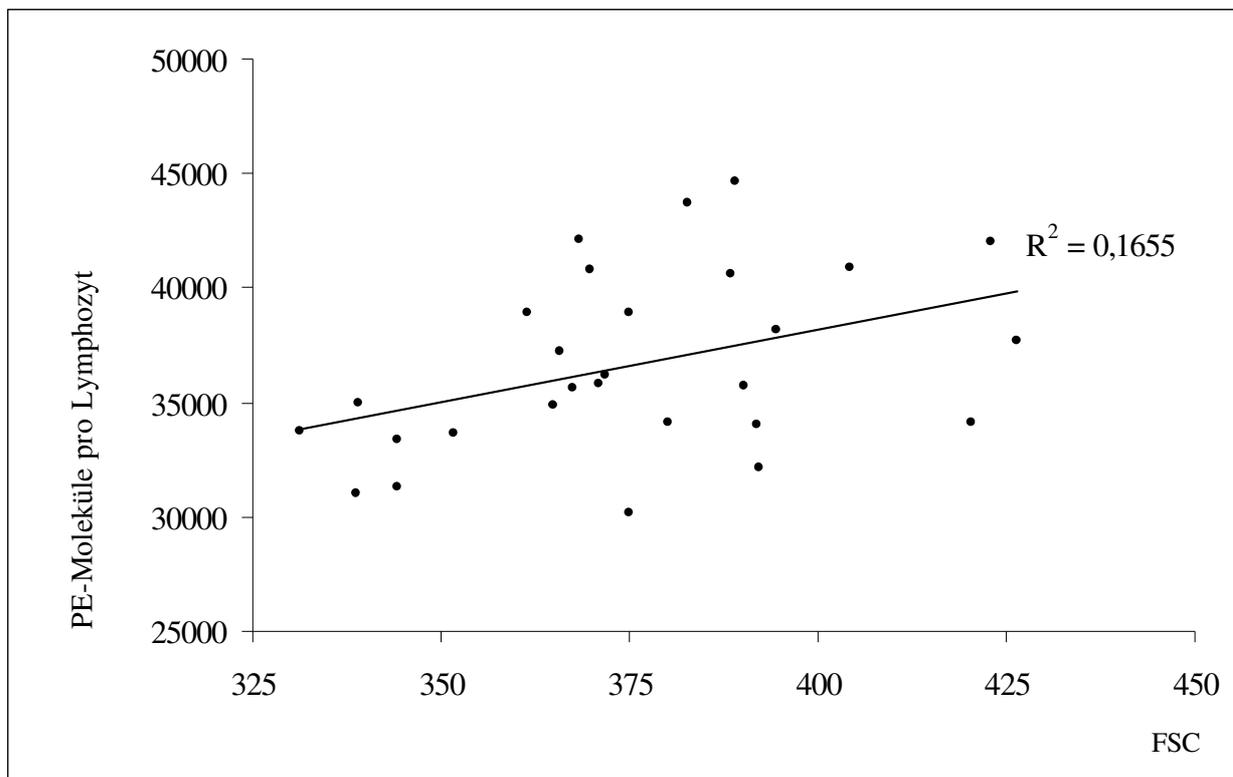


Abb. 16: Korrelation zwischen mittlerer Zellgröße (FSC) der Lymphozyten und CD47-Expression. R^2 =Bestimmtheitsmaß

3.4 CD47-Expression auf Granulozyten

Für die CD47-Menge auf Granulozyten konnten weder zwischen Gesunden und AIHA-Patienten ($p=0,066$), noch zwischen Gesunden und ITP-Patienten ($p=0,577$) oder AIHA-Patienten und ITP-Patienten ($p=0,261$) signifikante Unterschiede gefunden werden (Abb. 17).

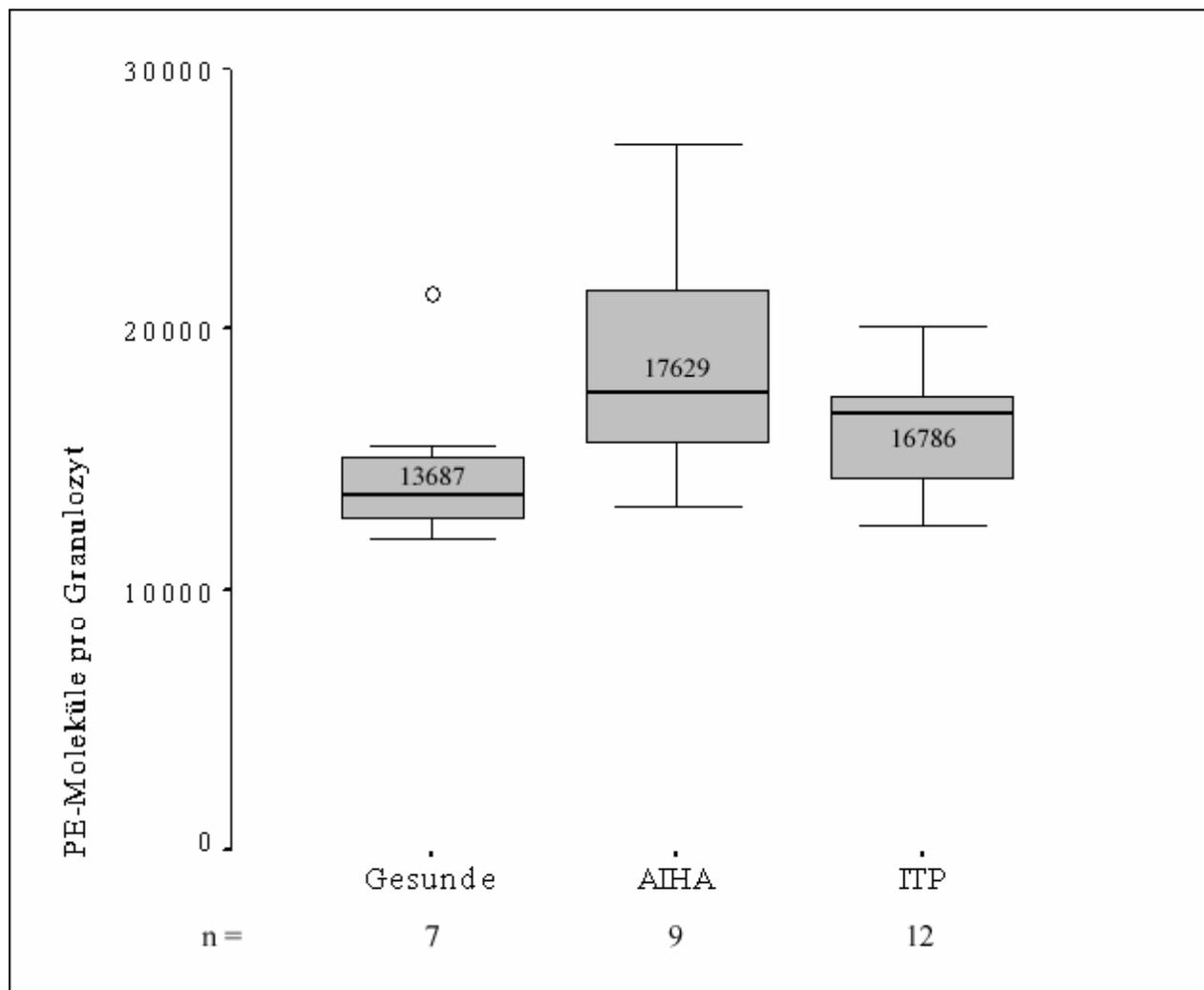


Abb. 17 CD47-Expression auf Granulozyten mit Angabe der Medianwerte. n = Stichprobengröße.

3.5 CD47 im Plasma

3.5.1 Plasma-Hemmversuch mit Referenzantigenen

Als Positivkontrolle ließ sich Blutgruppenantigen A im Plasma des Sekretors der Blutgruppe A Lewis(a-b+) nachweisen. Während der Vorinkubation des Plasmas mit Anti-A-Antikörper wurde ein Teil dieser Antikörper durch die löslichen Antigene gebunden und stand nun nicht mehr für die Färbung der anschließend hinzugefügten Erythrozyten zur Verfügung. Mit zunehmender Verdünnungsstufe des Plasmas wurden höhere Fluoreszenzintensitäten gemessen, die einen entsprechend niedrigeren Level an gelöstem Antigen anzeigen. Die höchsten Fluoreszenzintensitäten erreichte die Referenzprobe Albumin, die kein lösliches A-Antigen enthält (Abb. 18).

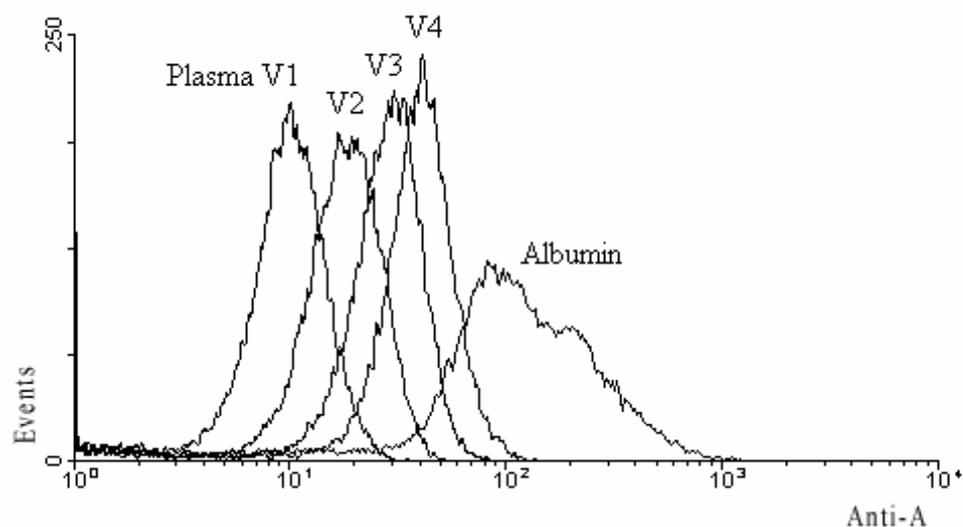


Abb. 18: Positivkontrolle mit Nachweis von löslichem Blutgruppenantigen A. V1=unverdünntes Plasma. V2, V3, V4 = ansteigende Verdünnungsstufen.

Die als Negativkontrolle durchgeführte Untersuchung des Plasmas auf Glycophorin A zeigte unabhängig von der Verdünnungsstufe im Vergleich zu Albumin keine Verminderung der Fluoreszenzintensität (Abb. 19).

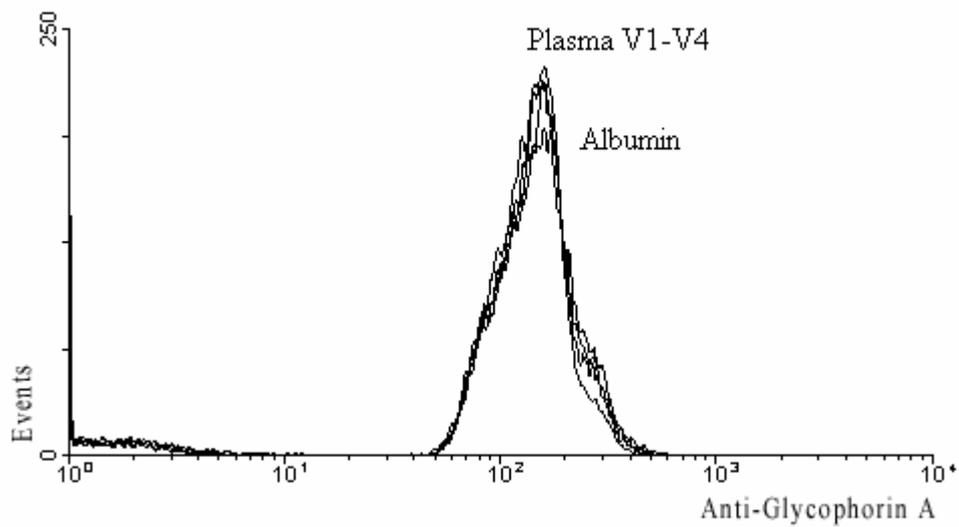


Abb. 19: Negativkontrolle. Es lässt sich kein lösliches Glycophorin A nachweisen. V1=unverdünntes Plasma. V2, V3, V4 = ansteigende Verdünnungsstufen.

3.5.2 Plasma-Hemmversuch mit CD47

CD47 konnte nicht nur als zellgebundenes Oberflächenprotein, sondern darüber hinaus auch in löslicher Form im Plasma aller untersuchten Blutproben nachgewiesen werden (Abb. 20).

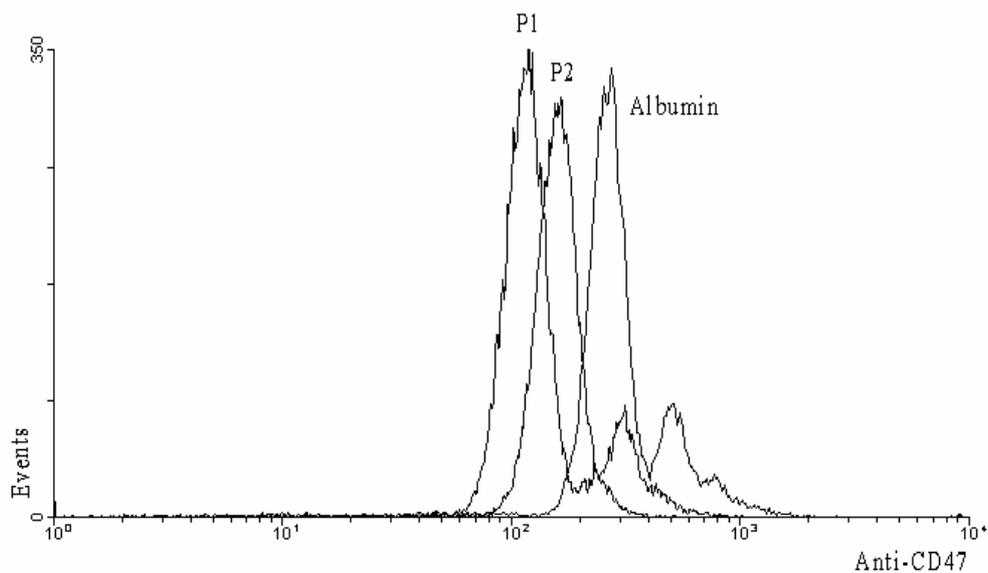


Abb. 20: Nachweis von löslichem CD47 im Plasma exemplarisch für zwei Patienten (P1 und P2) dargestellt.

Dabei zeigte sich im Plasma der ITP-Patienten eine höhere CD47-Menge als im Plasma von Gesunden ($p=0,002$) und AIHA-Patienten ($p=0,003$).

Zwischen Gesunden und AIHA-Patienten ergab sich dagegen kein signifikanter Unterschied ($p=0,963$) (Abb. 21).

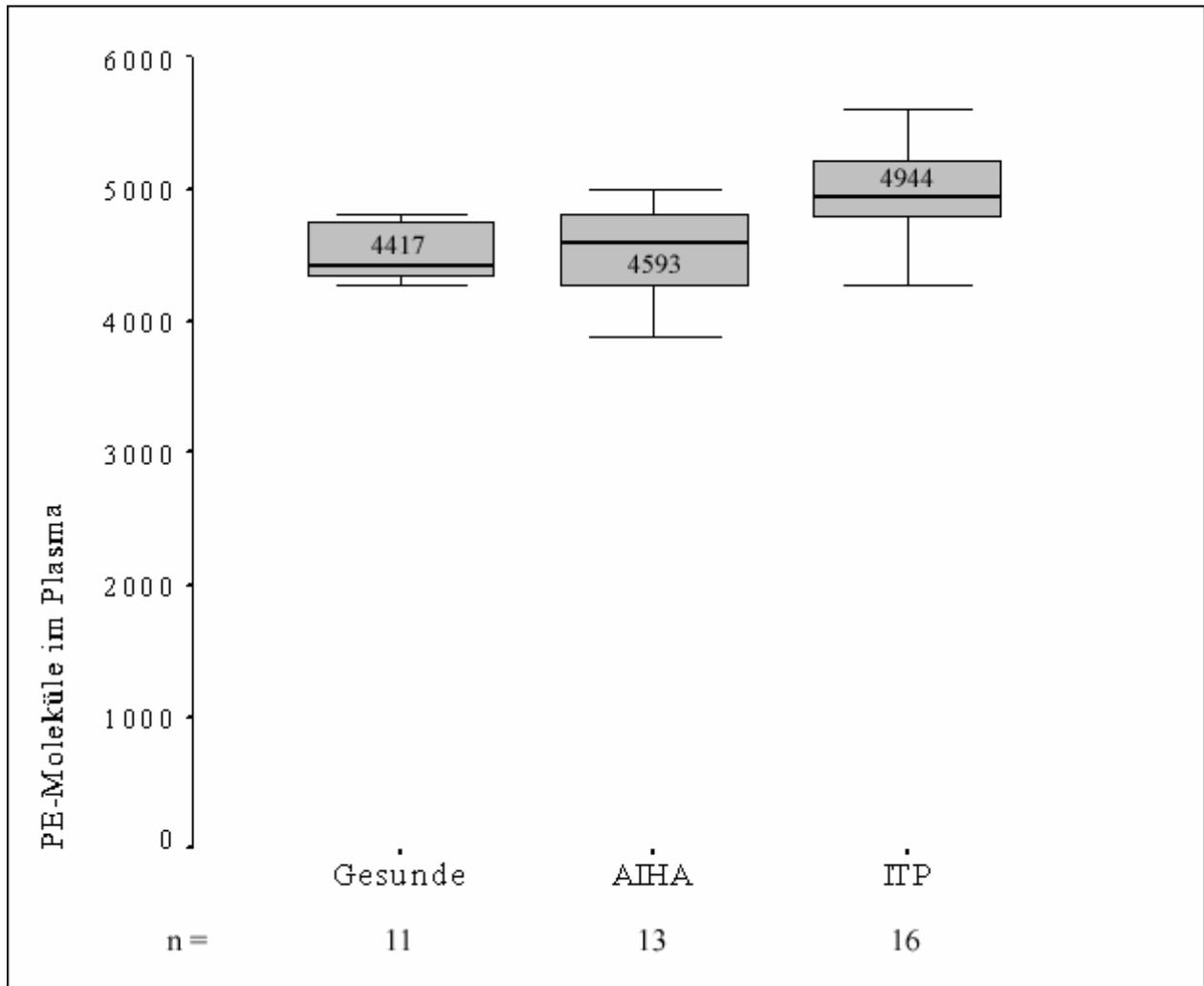


Abb. 21: CD47-Expression im Plasma mit Angabe der Medianwerte. n = Stichprobengröße.

Die Subgruppenanalyse der ITP-Patienten erbrachte weiterhin eine signifikant höhere CD47-Expression im Plasma sowohl der Patienten mit aktiver ITP im Vergleich zu Gesunden ($p=0,049$) als auch der Patienten in Remission im Vergleich zu Gesunden ($p=0,004$).

Untereinander unterschieden sich Patienten mit aktiver ITP und Patienten in Remission hingegen nicht signifikant voneinander ($p=0,681$) (Abb. 22).

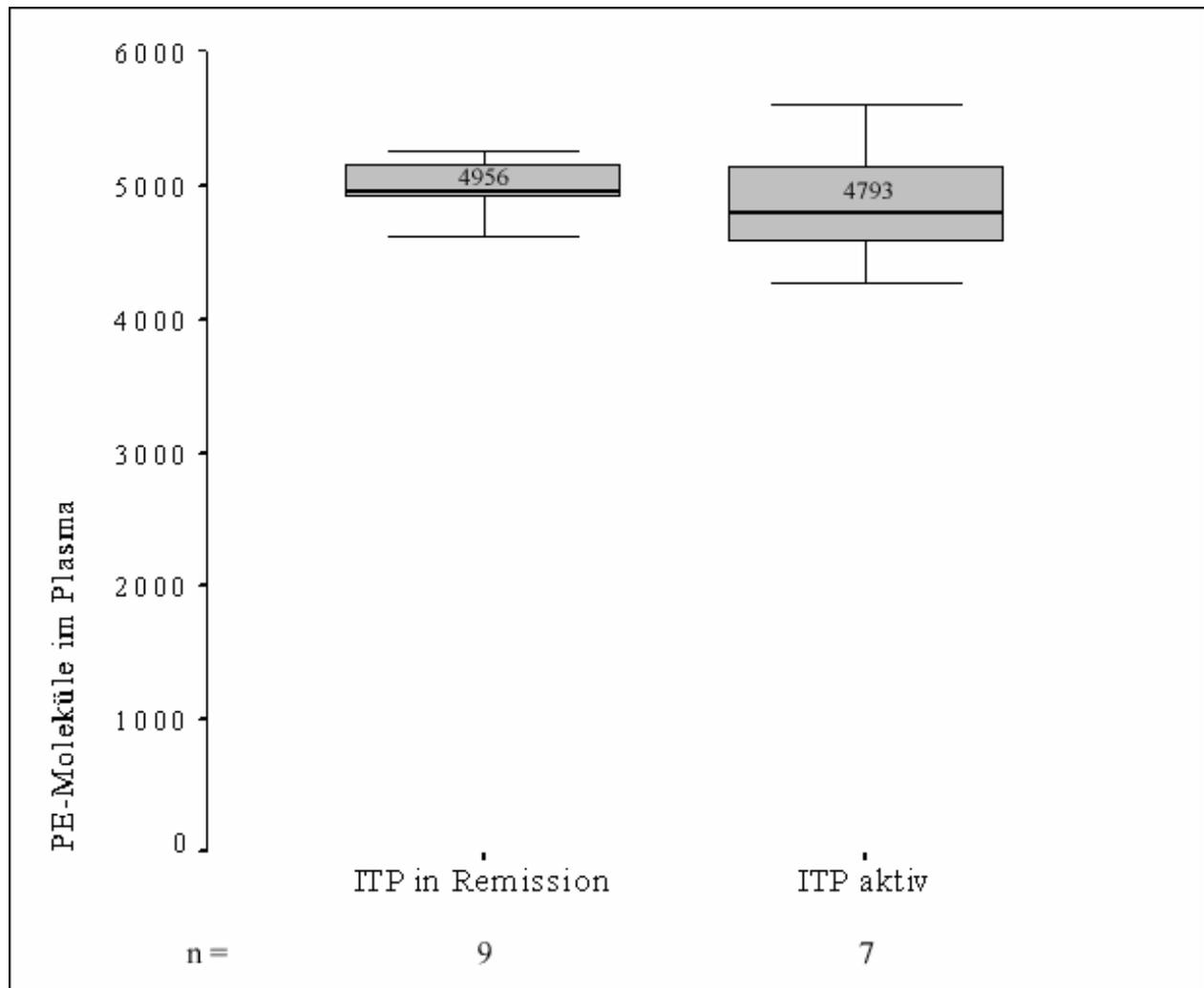


Abb. 22: CD47-Expression im Plasma. Vergleich der ITP-Subgruppen mit Angabe der Medianwerte. n = Stichprobengröße.

Innerhalb der Gruppe der AIHA-Patienten zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit aktiver AIHA und Patienten in Remission ($p=0,510$) (Abb. 23). Auch von Gesunden unterschieden sich weder Patienten mit aktiver AIHA ($p=0,959$) noch Patienten in Remission ($p=0,614$).

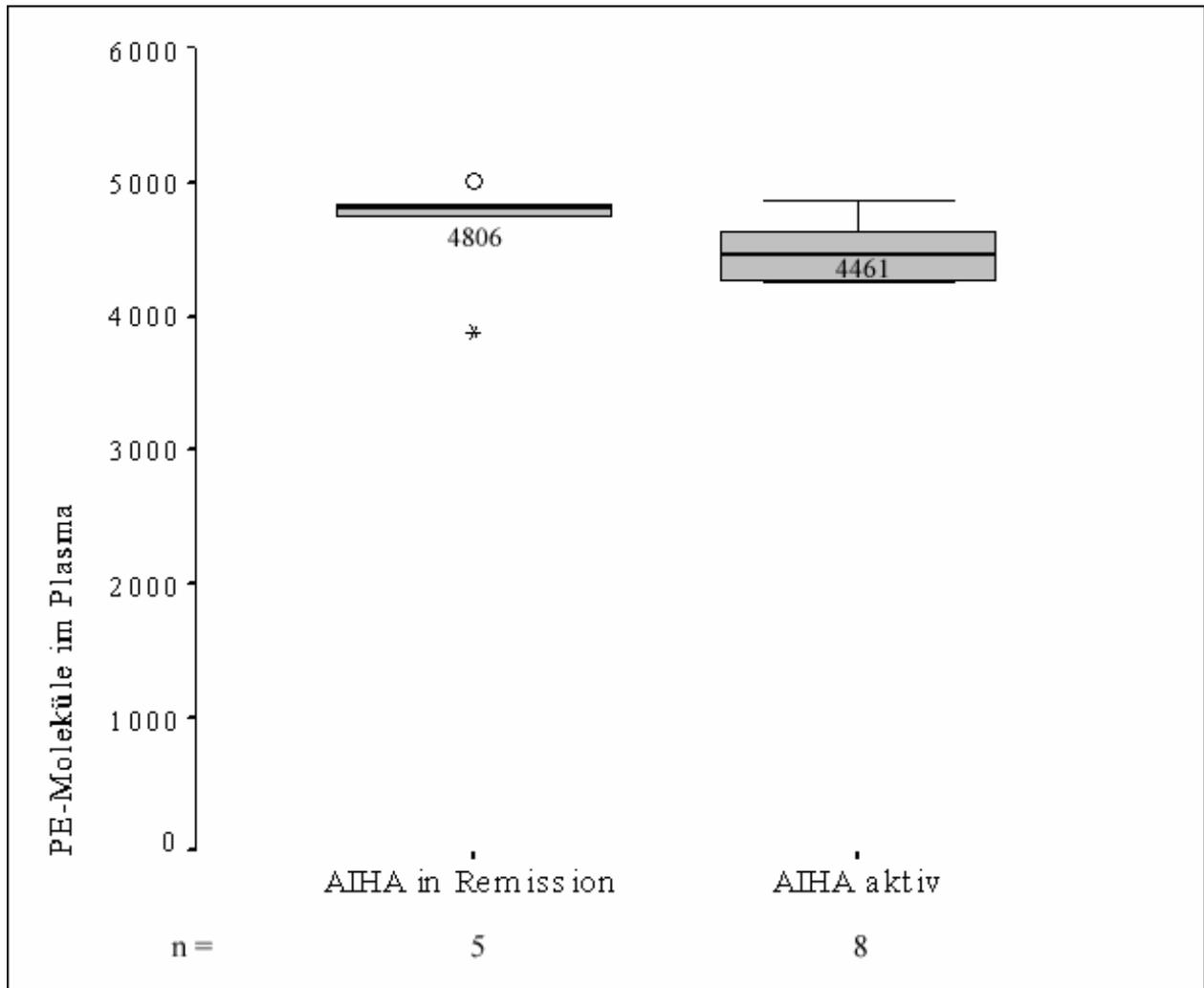


Abb. 23: CD47-Expression im Plasma. Vergleich der AIHA-Subgruppen mit Angabe der Medianwerte. n = Stichprobengröße.

4 Diskussion

In wenigen experimentellen Studien hat sich CD47 in den letzten Jahren als potentiell Protein der Selbsttoleranz erwiesen und wurde unter anderem hinsichtlich seiner Rolle in der Regulation hämatologischer Autoimmunerkrankungen analysiert [41;55;58;59;67]. Diesbezügliche Erkenntnisse beruhen allerdings ausschließlich auf Tierexperimenten und In-vitro-Untersuchungen. Es ist bisher nicht bekannt, welche Rolle CD47 bei Autoimmunzytopenien des Menschen spielt.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun der Zusammenhang zwischen CD47 und dem Ausmaß der Blutzellzerstörung im Rahmen von AIHA und ITP beim Menschen untersucht. Dafür wurden die CD47-Expressionslevel der Blutzellen und des Blutplasmas von Patienten und Gesunden mittels quantitativer Durchflusszytometrie miteinander verglichen.

Vor der Interpretation der Ergebnisse dieser Untersuchungen erfolgt zunächst die Einschätzung der angewandten Methodik.

4.1 Die Durchflusszytometrie als quantitatives Verfahren

Der Einsatz der Durchflusszytometrie als quantitatives Verfahren zur Bestimmung und zum Vergleich von Antigenmengen ist eine bisher wenig standardisierte Methode [73]. Um valide und reproduzierbare Messergebnisse zu erhalten, müssen vor allem Instrumentenleistung und Probenverarbeitung streng kontrolliert werden.

Alle Messungen der vorliegenden Arbeit wurden am selben Durchflusszytometer vorgenommen. Messwertabweichungen aufgrund unterschiedlicher Geräteleistungen konnten somit ausgeschlossen werden. Die Kalibrierung des Instruments mit Hilfe der Quanti-BRITE-Beads ermöglichte die Kontrolle des logarithmisch verstärkten Fluoreszenzsignals der Photomultiplier. Es wurden keine Von-Tag-zu-Tag Abweichungen gefunden.

Die gemessene Fluoreszenzintensität ist direkt von der vorhandenen Antigenmenge abhängig, sofern sich die verwendete Antikörpermenge im Sättigungsbereich befindet. In Titrationsreihen konnte jedoch mit Ausnahme der Lymphozyten für keine der hier untersuchten Zellarten eine Antikörperkonzentration gefunden werden, die in einem öko-

nomisch vertretbaren Kostenrahmen den Sättigungsbereich für oberflächengebundenes CD47 erreicht.

Deshalb mussten die Messungen mit nicht sättigenden Antikörpermengen durchgeführt werden. Unter diesen Voraussetzungen ist es nicht möglich, die absolute Zahl von CD47-Molekülen pro Zelle zu errechnen. Trotzdem können die relativen Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Proben quantitativ miteinander verglichen werden, denn die Fluoreszenzintensität ist auch unter nicht sättigenden Bedingungen proportional zur Antigenmenge, solange ein striktes Präparationsprotokoll eingehalten wird. Die Messergebnisse werden in diesem Fall außer von der Antigenmenge erheblich von weiteren Einflussfaktoren bestimmt. So steigt die Fluoreszenzintensität bei Erhöhung der Antikörperkonzentration, bei Verringerung der Zellzahl in der Probe sowie bei Verlängerung der Inkubationszeit [71].

Zur Kontrolle dieser Einflussfaktoren wurden in einer streng kontrollierten Versuchsdurchführung alle Mengen, Konzentrationen und Zeiten sowie Instrumenteneinstellungen konstant gehalten.

Daneben weist der verwendete Antikörperklon B6H12 eine deutliche Temperaturabhängigkeit der Bindungsaffinität auf, die vor allem unter nicht sättigenden Bedingungen eine Rolle spielt. Rosales et al. konnten zeigen, dass die Bindung von B6H12 an CD47 bei höherer Temperatur mit größerer Affinität erfolgt und bei deutlicher Temperatursenkung sogar reversibel ist [74].

In der vorliegenden Arbeit wurden daher alle Präparations- und Inkubationsschritte bei Raumtemperatur in klimatisierten Laborräumen durchgeführt.

Letztendlich weisen die Ergebnisse der Präzisionskontrollen darauf hin, dass die durchflusszytometrische Quantifizierung von CD47 mit dem für diese Arbeit konzipierten Procedure in der Tat reproduzierbare Messwerte ergibt.

Darüber hinaus ergab die Analyse von Erythrozyten des Phänotyps Rh_{Null}, die im Vergleich zu allen anderen Blutgruppen bedeutend weniger CD47 exprimieren, übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen ebenfalls eine deutlich niedrigere CD47-Expression [34;44]. Die verwendete Methode ist demnach in der Lage, tatsächlich existierende Unterschiede der CD47-Expression zu detektieren.

4.2 Zellgebundenes CD47

Das Oberflächenprotein CD47 konnte ohne Ausnahme sowohl bei Gesunden als auch bei AIHA-Patienten und ITP-Patienten auf allen untersuchten Zellen nachgewiesen werden. Ein vollständiges Fehlen von CD47 auf Blutzellen ließ sich somit bei keiner Patientengruppe feststellen.

Auch von anderen Arbeitsgruppen ist eine komplette CD47-Defizienz beim Menschen bisher nicht beschrieben worden [59]. Selbst die erythrozytäre CD47-Reduktion, die im Rahmen der Protein 4.2-Defizienz sowie der Rhesusvarianten Rh_{Null}, D-- und D.. zu beobachten ist, beträgt in keinem der Fälle mehr als 90% [66]. In diesem Zusammenhang wird spekuliert, dass eine minimale CD47-Expression notwendig ist, um die Eliminierung unreifer Erythrozyten vor dem Eintritt in die Zirkulation zu verhindern [75]. Eine solche Überlegung lässt sich ohne weiteres in die Hypothese einordnen, dass CD47 als Signalprotein der Selbsttoleranz agiert.

Dass zellgebundenes CD47 in der Lage ist, die Phagozytose von Blutzellen zu verhindern, wurde vorwiegend an vollständig CD47-defizienten Knockout-Mäusen nachgewiesen [55;58;59;67;68]. Da eine solche komplette CD47-Defizienz beim Menschen offensichtlich nicht existiert, stellt die vergleichende Betrachtung der CD47-Expressionslevel von Patienten mit hämatologischen Autoimmunerkrankungen eine Möglichkeit dar, die Rolle von CD47 in der Steuerung humaner Autoimmunprozesse zu beurteilen.

4.2.1 CD47 auf der Oberfläche von Blutzellen

Obwohl die zu Kontrollzwecken durchgeführte Analyse von Erythrozyten der Blutgruppe Rh_{Null} erwartungsgemäß eine deutliche Verminderung der CD47-Expression ergab, fanden sich im Übrigen keine Unterschiede der erythrozytären CD47-Menge. AIHA-Patienten exprimieren nicht weniger CD47 auf ihren Erythrozyten als Gesunde oder ITP-Patienten. Auch zwischen Patienten mit aktiver AIHA und Patienten in Remission war kein Unterschied erkennbar.

Vergleichbare Ergebnisse lieferte auch die Analyse von Thrombozyten. ITP-Patienten besitzen weder geringere CD47-Expressionslevel auf ihren Thrombozyten als Gesunde oder AIHA-Patienten, noch zeigte sich ein Unterschied zwischen Patienten mit aktiver ITP und Patienten in Remission.

Erythrozyten und Thrombozyten, die im Rahmen von AIHA beziehungsweise ITP in gesteigertem Maße phagozytiert werden, weisen also im Vergleich zu weniger betroffenen und unbeeinträchtigten Zellen keine verminderte CD47-Expression auf.

Die zusätzliche Betrachtung der CD47-Expressionslevel auf Lymphozyten und Granulozyten, die nicht von der autoimmunen Phagozytose betroffen sind, liefert darüber hinaus Informationen über das generelle CD47-Expressionsniveau auf Blutzellen bei Patienten mit Autoimmunzytopenien.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen für Erythrozyten und Thrombozyten fanden sich dabei auch auf Granulozyten keine unterschiedlichen CD47-Mengen zwischen Gesunden, AIHA-Patienten und ITP-Patienten.

Im Gegensatz dazu ergab die Analyse der Lymphozyten, dass ITP-Patienten signifikant weniger CD47 exprimieren als Gesunde oder AIHA-Patienten. Lymphozyten stellen damit die einzige Zellsorte dar, bei der sich unterschiedliche CD47-Mengen im Vergleich der Patientengruppen nachweisen ließen. Ein konkreter Zusammenhang ist allerdings gerade vor dem Hintergrund fraglich, dass alle übrigen Zellsorten und selbst die in verstärktem Maße phagozytierten Zellen keine veränderte CD47-Expression aufweisen. Weiterhin bleibt unklar, warum ausschließlich die Gruppe der ITP-Patienten von einer CD47-Verminderung betroffen ist, während AIHA-Patienten normale CD47-Mengen auf ihren Lymphozyten aufweisen. Eine spezifische autoimmune Neutropenie, die diesen Umstand erklären könnte, liegt bei der betreffenden Patientengruppe nicht zusätzlich vor. Der ermittelte Unterschied ist mit einer Reduktion um circa 10% ohnehin relativ klein. Zudem stellen die Lymphozyten mit ihren Subtypen T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen eine heterogene Zellpopulation dar, die individuell sehr unterschiedlich zusammengesetzt sein kann. Dies spiegelt sich in den vorliegenden Untersuchungen auch in der interindividuellen Streubreite der mittleren Zellgrößen wieder. Darüber hinaus gilt für Lymphozyten eine positive Korrelation zwischen Zellgröße und CD47-Expression, die für keine andere Zellsorte nachgewiesen werden konnte. Somit ist anzunehmen, dass die detektierten Abweichungen der CD47-Menge in erster Linie auf den Unterschieden in der Zusammensetzung der Lymphozytenpopulation beruhen und nicht primär in Zusammenhang mit der Diagnose einer Autoimmunzytopenie gebracht werden können.

Ähnliche Verhältnisse herrschen auch für Granulozyten, die ebenfalls eine heterogene Zellpopulation darstellen und sich zudem durch eine hohe Fragilität und einen besonders schnellen Alterungsprozess auszeichnen.

Obwohl Lymphozyten und Granulozyten als undifferenzierte Zellgruppen somit nur eingeschränkt interindividuell vergleichbar sind, lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen dennoch ableiten, dass auch für diese beiden Zellsorten kein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer AIHA oder ITP und der CD47-Expression besteht.

Insgesamt findet sich bei Patienten mit AIHA oder ITP weder ein allgemein vermindertes CD47-Expressionsniveau auf Blutzellen, noch weisen die explizit von der autoimmunen Phagozytose betroffenen Zellen niedrigere CD47-Mengen auf. Der Einfluss des Oberflächenproteins CD47 auf die Phagozytoserate erscheint damit weitaus weniger eindeutig, als aufgrund der Untersuchungen an CD47-defizienten Knockout-Mäusen zunächst vermutet werden konnte.

CD47^{-/-}-Erythrozyten, die im Organismus von Wildtyp-Mäusen rasch phagozytiert werden, bleiben in CD47^{-/-}-Organismen unbeeinträchtigt. Diese Tatsache lässt vermuten, dass die Phagozytoseaktivität der Makrophagen nicht allein vom CD47 auf Zielzellen, sondern gleichzeitig auch vom CD47-Expressionslevel der Umgebung beeinflusst wird [58]. Fehlt CD47 im gesamten Organismus und damit auf der eigenen Zelloberfläche, stellt die CD47-Defizienz der Zielzellen also keinen Phagozytoseanreiz für Makrophagen mehr dar. Demzufolge ist von der Beteiligung zusätzlicher inhibitorischer Signale auszugehen. Möglicherweise existieren neben CD47 noch weitere, bisher nicht beschriebene Signalproteine der Selbsttoleranz, die in der Lage sind, eine komplette CD47-Defizienz zu kompensieren.

Eine solche Redundanz der phagozytoseinhibierenden und Selbsttoleranz erzeugenden Signale ließe die Bedeutung von CD47 für den Verlauf von Autoimmunzytopenien weiter in den Hintergrund treten.

Auch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen lassen inzwischen an der dominierenden Rolle von CD47 als Phagozytoseinhibitor zweifeln. Arndt et al. untersuchten die Reaktivität peripherer Blutmonozyten mit Rh_{Null}-Erythrozyten in einem Monocyte Monolayer Assay (MMA). Dabei stellten sie fest, dass Rh_{Null}-Erythrozyten trotz deutlich verminderter CD47-Expression im Vergleich zu Kontrollerythrozyten mit normaler CD47-Menge keine erhöhte Interaktion mit Monozyten aufweisen [76]. Es konnte also kein Hinweis auf eine verstärkte Phagozytose der CD47-schwachen Zellen gefunden werden.

Ohnehin gilt es inzwischen als umstritten, dass der hämolytischen Anämie, die im Zusammenhang mit Rh_{Null} oder auch der Protein 4.2-Defizienz auftritt, in erster Linie eine verminderte CD47-SIRP α -Interaktion zugrunde liegt. Es ist vielmehr möglich, dass die einhergehenden zytoskeletalen Abnormalitäten im Sinne einer hereditären Sphärozytose die Ursache der Anämie sind. Unterstützt wird diese Annahme vor allem dadurch, dass eine vergleichbare Verminderung der erythrozytären CD47-Expression auch bei den Rhesusvarianten D-- und D.. beobachtet werden kann, ohne dass Zytoskelettveränderungen oder eine Hämolyse auftreten [66].

Offenbar geht also eine Reduktion des oberflächengebundenen CD47 um etwa 75% und mehr beim Menschen nicht zwangsläufig mit einer gesteigerten Phagozytose betroffener Zellen einher. Für murine Zellen konnte eine Dosisabhängigkeit des phagozytoseinhibierenden Effekts von CD47 nachgewiesen werden. Untersuchungen an heterozygoten Knockout-Mäusen ergaben, dass eine Reduktion des zellgebundenen CD47 um 50% bei Erythrozyten beziehungsweise 45% bei Thrombozyten ausreicht, um die Phagozytoserate IgG-opsonierter Zellen signifikant zu steigern. In Abwesenheit von Autoantikörpern und bei damit fehlender Opsonierung führt eine Reduktion von CD47 in dieser Größenordnung allerdings auch bei Mäusen nicht zur gesteigerten Clearance der Zellen [67;77].

Dies lässt vermuten, dass der Phagozytosesteuerung durch CD47 wesentlich komplexere Mechanismen zugrunde liegen. Tatsächlich hat sich inzwischen herausgestellt, dass CD47 nicht in jedem Fall als Phagozytoseinhibitor agiert, sondern in Abhängigkeit vom biologischen Kontext sogar prophagozytotisch wirken kann. Für gealterte beziehungsweise apoptotische Erythrozyten, Thymozyten und T-Zellen konnte gezeigt werden, dass sie nur dann an Makrophagen binden und anschließend von ihnen ingestiert werden, wenn sie CD47 auf ihrer Oberfläche exprimieren und im Gegenzug unversehrt bleiben, wenn ihnen das Oberflächenprotein fehlt [78;79].

Demnach erfüllt CD47 also abhängig von der Lebensfähigkeit der Zielzellen vollkommen gegensätzliche Funktionen. Während CD47 auf vitalen Zellen die Phagozytose verhindert, dient es auf apoptotischen und alternden Zellen dazu, die Eliminierung durch Makrophagen zu steigern [80].

Darüber hinaus ist CD47 in der Lage, als so genannter Todesrezeptor die Apoptose aktivierter T-Zellen zu induzieren [81]. Insbesondere Defekte der klassischen Fas-vermittelten Apoptose aktivierter autoreaktiver T-Lymphozyten werden in Zusammenhang mit der Exazerbation von AIHA und ITP gebracht [3;82]. Als alternativer Todesre-

zeptor dient CD47 möglicherweise der Downregulation einer Autoimmunreaktion durch Kontrolle autoreaktiver T-Zellen und B-Zellen, die sich als resistent gegen die klassische Fas-induzierte Apoptose erweisen [81].

Aufgrund dieses vielfältigen und mitunter gegensätzlichen Signalpotentials ist anzunehmen, dass CD47 neben der Interaktion mit SIRP α auch auf anderen Wegen Einfluss auf die Zelleliminierung im Rahmen von AIHA und ITP nimmt.

4.2.2 Speziesspezifitäten

Wesentliche Erkenntnisse über die Rolle des Oberflächenproteins CD47 als Phagozytoseinhibitor und in der Regulation hämatologischer Autoimmunerkrankungen wurden in experimentellen Studien an Mäusen gewonnen [55;58;59;67;68]. Es ist nicht auszuschließen, dass der CD47-SIRP α -Interaktion möglicherweise speziesspezifische Konditionen, Mechanismen und Affinitäten zugrunde liegen.

Subramanian et al. fanden in diesem Zusammenhang heraus, dass mesenchymale Stammzellen des Menschen trotz hoher CD47-Expression kein humanes SIRP α binden. Daraus schlossen sie, dass die CD47-SIRP α -Interaktion selbst innerhalb einer einzigen Spezies zellspezifische Unterschiede aufweist und Rückschlüsse von einer Zellsorte auf andere folglich nicht ohne Weiteres möglich sind [83]. Es erscheint daher ungewiss, inwiefern die CD47-SIRP α -Interaktion zwischen verschiedenen Spezies bewahrt ist.

Bei der Übertragung des Mausmodells auf den Menschen bedarf es deshalb der Berücksichtigung einiger wesentlicher Unterschiede zwischen beiden Spezies. Erste erhebliche Divergenzen fanden Lindberg et al. bereits beim Vergleich der Aminosäuresequenzen von humanem und murinem CD47. Für die extrazelluläre Domäne ergab sich eine Übereinstimmung von nur 61% zwischen Maus und Mensch, während die transmembranären Segmente zu 77% übereinstimmen [36].

Außerdem unterscheiden sich humane und murine Erythrozyten hinsichtlich der membranstrukturellen Verankerung von CD47. Einerseits weisen beide Spezies die gleiche CD47-Dichte auf der Zelloberfläche auf [84]. Andererseits findet sich die Assoziation von CD47 an den Rh-Komplex sowie an Protein 4.2 und den Band3-Komplex ausschließlich auf humanen, nicht jedoch auf murinen Erythrozyten [42;66;79]. Entsprechend der fehlenden Verankerung mit dem Zytoskelett ist murines CD47 zu über 80%

frei in der Zellmembran beweglich, während die mobile Fraktion beim Menschen nur etwa 40% ausmacht [66;84].

Mobile beziehungsweise diffusionsfähige Rezeptorproteine haben die Fähigkeit, in Zellkontaktzonen zu akkumulieren und damit vermutlich die Liganden-Rezeptor-Bindungen zu stabilisieren und entstehende Signale zu potenzieren [44]. Subramanian et al. konnten nachweisen, dass eine entsprechende Akkumulation von CD47 in der Adhäsionszone zwischen Erythrozyten und einem SIRP α -Komplex nur bei Mäusen und nicht beim Menschen auftritt [84]. Demzufolge wäre eine Verstärkung des Signals der Selbsttoleranz bei der Interaktion mit SIRP α durch humanes CD47 nicht annähernd in dem Ausmaß möglich wie durch murines CD47. Daneben ist es durchaus denkbar, dass die beschriebenen unterschiedlichen membranären Proteinassoziationen von CD47 nachfolgend mit eben so unterschiedlichen Signalkaskaden einhergehen.

Abweichungen zwischen Maus und Mensch betreffen nicht nur CD47 selbst, sondern auch seinen Interaktionspartner SIRP α , dessen Aminosäuresequenzen beider Spezies im Bereich der CD47-bindenden Immunglobulindomäne zu 34% voneinander abweichen [83]. Die CD47-SIRP α -Interaktion weist darüber hinaus bei Mäusen eine deutlich stärkere Affinität auf als bei Menschen [84].

Es findet sich also bereits hinsichtlich struktureller und mechanistischer Voraussetzungen eine Vielzahl bedeutsamer Unterschiede, die die Übertragung der Verhältnisse bei Mäusen auf den Menschen ausgesprochen schwierig, wenn nicht gar unmöglich machen.

Dass bei Mäusen ein Zusammenhang zwischen CD47-Expression und Schweregrad einer Autoimmunzytopenie besteht, wurde aus zahlreichen Phagozytoseassays geschlossen. Diese ergaben, dass die CD47-SIRP α -Interaktion die antikörper- oder komplementinduzierte Phagozytose von Blutzellen blockiert. Daneben lieferten vor allem die Beobachtungen an NOD-Mäusen, die im CD47-defizienten Zustand an einer fulminant verlaufenden AIHA erkranken, entscheidende Hinweise. Erythrozyten dieser CD47-defizienten NOD-Mäuse sind in deutlich höherem Maße durch Antikörper opsoniert als CD47^{+/+}-NOD-Mäuse, sodass Oldenborg et al. darüber hinaus eine beschleunigte Autoantikörperproduktion im CD47-defizienten Zustand postulierten. Einem hypothetischen Mechanismus zufolge werden CD47^{-/-}-Erythrozyten dabei bereits phagozytiert, wenn sie nur durch ein Minimum von Autoantikörpern opsoniert sind, während CD47^{+/+}-

Erythrozyten bei gleichem Opsonierungsgrad aufgrund des überwiegenden inhibitorischen CD47-SIRP α -Signals weitgehend unversehrt bleiben. Die vermehrte Phagozytose führt wiederum zu verstärkter Antigenpräsentation mit nachfolgend gesteigerter Antikörperproduktion. Im Sinne eines geschlossenen Kreislaufs verstärkt die CD47-Defizienz damit die weitere Phagozytoserate und führt zur progressiven Exazerbation einer präformierten AIHA [59].

Ein solcher Zusammenhang zwischen CD47-Level und Schweregrad einer Autoimmunitypenie lässt sich beim Menschen anhand der Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit nicht belegen.

4.3 CD47 im Plasma

Neben der zellgebundenen Form konnte CD47 auch als lösliches Protein im Plasma aller untersuchten Blutproben nachgewiesen werden.

Es handelt sich dabei nach dem Stand unseres Wissens um den erstmaligen und derzeit einzigen positiven Nachweis von löslichem CD47 in menschlichem Plasma.

Diese Ergebnisse widersprechen den Untersuchungen von Anniss et al., die keinen Hinweis auf das Vorhandensein von löslichem CD47 im Plasma fanden [61]. Mittels Western Blot analysierten sie Plasmaproben, die vor der Messung in mehreren Schritten verdünnt wurden. Obwohl nähere Angaben über die resultierende Verdünnungsstufe fehlen, sank die CD47-Konzentration in ihrem Analysat möglicherweise bereits unter die Nachweisgrenze.

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten durchflusszytometrischen Messungen kann aufgrund der durchgeführten Mikrofiltration des Plasmas zunächst ausgeschlossen werden, dass irrtümlich zellgebundenes CD47 detektiert wurde. Kontrollmessungen ergaben darüber hinaus, dass lösliches Blutgruppenantigen A im Plasma von Sekretoren detektiert werden kann, während das nicht sezernierbare Oberflächenprotein Glykophorin A in löslicher Form tatsächlich nicht nachweisbar ist. Somit erweist sich die verwendete indirekte Messmethode für den exklusiven Nachweis löslicher Proteine geeignet, ohne von der gleichzeitigen Existenz oberflächengebundener Varianten beeinflusst zu werden.

Im quantitativen Vergleich stellte sich heraus, dass ITP-Patienten mehr lösliches CD47 im Plasma aufweisen als Gesunde oder als AIHA-Patienten. Dabei trat die vermehrte CD47-Menge im Plasma bei Patienten mit aktiver ITP und Patienten in Remission gleichermaßen auf.

Im Gegensatz dazu unterschieden sich AIHA-Patienten hinsichtlich der Menge an löslichem CD47 nicht signifikant von Gesunden. Auch bei der Betrachtung der AIHA-Subgruppen fanden sich keinerlei Unterschiede zwischen Patienten mit aktiver AIHA, Patienten in Remission und Gesunden.

Eine mögliche Quelle des im Plasma detektierten löslichen CD47 stellt die Freisetzung von oberflächengebundenem CD47 durch Bildung von Membranvesikeln dar.

Für Thrombozyten ist bekannt, dass sie insbesondere im aktivierten Zustand Membranvesikel abstoßen, die neben bioaktiven Lipiden auch Proteine enthalten [85]. Insofern ist es prinzipiell möglich, dass eine artifizielle Thrombozytenaktivierung aufgrund mechanischen Stresses während der Blutentnahme und Probenpräparation überhaupt erst zur Freisetzung von CD47 im Rahmen der Mikrovesikulation geführt hat. Allerdings hätte sich dieser Umstand auf alle Proben gleichermaßen ausgewirkt und erklärt somit nicht die höhere CD47-Menge im Plasma der ITP-Patienten, die demnach bereits in vivo vorzuliegen scheint.

Möglicherweise stoßen die Thrombozyten der ITP-Patienten also in verstärktem Maße CD47 von ihrer Oberfläche ab. Dagegen sprechen jedoch die Ergebnisse der Thrombozytenmessungen, die für dieselbe Patientengruppe keine korrespondierende Verminderung des oberflächengebundenen CD47 ergaben.

Neben Thrombozyten kommen darüber hinaus auch andere Zellen als möglicher Ursprung des löslichen CD47 in Frage. Anniss et al. beobachteten, dass gelagerte Erythrozyten, die im Verlauf der Aufbewahrung zunehmend CD47 von ihrer Oberfläche verlieren, gleichzeitig ihre bikonkave Form einbüßen und nadelförmige Zellausläufer ausbilden. Daraus leiteten sie ab, dass CD47 möglicherweise in Mikrovesikeln, die aus diesen Zellausläufern entstehen, von der Zelloberfläche abgestoßen wird [61].

Bei der Untersuchung polymorphnukleärer Leukozyten fanden Rosales et al. hingegen heraus, dass die CD47-Expression unbeeinflusst vom Aktivierungszustand der Zellen konstant bleibt. Sie fanden keine Hinweise auf eine Internalisierung oder Freisetzung von CD47 in aktivierten und nicht aktivierten Leukozyten [74].

Die Ablösung von Membranvesikeln geschieht unter Trennung der Verbindung zwischen membranärer Lipiddoppelschicht und Zytoskelett. Entsprechend werden vorrangig mobile Oberflächenproteine freigesetzt, die nicht zytoskeletal gebunden sind [86]. Insbesondere auf Erythrozyten ist CD47 jedoch zum größten Teil zytoskeletal verankert und kann somit theoretisch weitaus schlechter durch Vesikulation freigesetzt werden.

Unabhängig vom Ursprung kann CD47 auch in löslicher Form als Phagozytoseinhibitor fungieren. Hsu et al. zeigten dies bereits anhand ihrer Versuche mit künstlichen CD47-Fusionsproteinen, die in der Lage sind, die Phagozytoserate kolloidaler Medikamentencarrier zu vermindern [69]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass CD47 nicht zwangsläufig an die Oberfläche der Zielzelle gebunden sein muss, um mit SIRP α der Makrophagen interagieren und die inhibitorische Signalkaskade in Gang setzen zu können.

In Bezug auf Autoimmunzytopenien bleibt unklar, in welcher Größenordnung lösliches CD47 vorliegen muss, um die Phagozytoseaktivität der Makrophagen nennenswert zu beeinflussen. Der in den Plasmaanalysen detektierte Unterschied ist tatsächlich sehr klein. ITP-Patienten wiesen gegenüber Gesunden und AIHA-Patienten eine Vermehrung des löslichen CD47 um weniger als zehn Prozent auf. Ob eine Veränderung in dieser Größenordnung überhaupt einen Effekt hätte, bleibt fraglich. Zumal die Erhöhung der CD47-Menge in der ITP-Patientengruppe am ehesten als Kompensationsmechanismus einzuordnen wäre. In diesem Fall erwiese sich die kompensatorische Steigerung allerdings als insuffizient, da die Patientensubgruppe mit aktiver ITP trotz gleichermaßen erhöhter CD47-Menge eine gesteigerte Thrombozyteneliminierung aufweist. Darüber hinaus fehlen Anhaltspunkte für einen entsprechenden Kompensationsmechanismus in der Gruppe der AIHA-Patienten, die sich hinsichtlich der Menge an löslichem CD47 nicht von Gesunden unterscheiden.

Obwohl sich also Gesunde und ITP-Patienten hinsichtlich ihrer CD47-Menge im Plasma unterscheiden, bleibt es dennoch unwahrscheinlich, dass dieser Unterschied pathophysiologisch maßgebliche Auswirkungen hat. Insgesamt konnten damit anhand der vorliegenden Untersuchungen keine Hinweise dafür gefunden werden, dass Verlauf und Schweregrad von AIHA oder ITP in klinisch relevantem Maße mit der Menge an löslichem CD47 im Blutplasma betroffener Patienten zusammenhängen.

4.4 Ausblick: Therapeutische Anwendung von CD47

Auch wenn die Funktion von CD47 in der Pathophysiologie von AIHA und ITP noch nicht abschließend geklärt ist, fanden sich neben dem bereits beschriebenen phagozytoseinhibierenden Effekt auch Hinweise auf die Nutzbarkeit künstlicher CD47-Expression auf der Zelloberfläche zur Verbesserung der Biokompatibilität. Discher et al. konnten in einem Modellversuch zeigen, dass Hefezellen, die auf ihrer Oberfläche die extrazelluläre Domäne von CD47 tragen, zu 80% von der Phagozytose durch Neutrophile verschont bleiben, während Wildtyp-Hefezellen ohne CD47 durchweg innerhalb kürzester Zeit vernichtet werden [87].

Sollte sich diese Wirkung in weiterführenden Experimenten bestätigen, ergäbe sich für künstlich exprimiertes CD47 ein breites Anwendungsspektrum auf dem Gebiet der Medikamentenverfügbarkeit und implantierbaren Medizinprodukte bis hin zur Gewebsimplantation.

Selbst auf dem Gebiet der Xenotransplantation erweist sich CD47 inzwischen als möglicher Ansatzpunkt zur Verbesserung der Gewebetoleranz durch den Empfänger. Wang et al. wiesen anhand von Mäusen und Schweinen zunächst nach, dass die CD47-SIRP α -Interaktion speziesspezifisch ist und eine Crossreaktion von CD47 mit SIRP α zwischen beiden Spezies nicht stattfindet. Durch genetische Manipulation des CD47 im Spendergewebe des Schweins mittels Transfektion eines murinen CD47-Plasmids kann jedoch eine Abstoßung des Gewebes im Empfängerorganismus der Maus verhindert werden [88].

4.5 Fazit

Patienten mit AIHA und ITP weisen normale CD47-Expressionslevel auf. Es findet sich somit keine Reduktion des oberflächengebundenen CD47 als Ursache der gesteigerten Zerstörung von Blutzellen.

Erwartungen, nach denen die Quantifizierung von CD47 möglicherweise Rückschlüsse auf Schweregrad und Verlauf von AIHA oder ITP erlaubt und somit als diagnostisches Kriterium einsetzbar ist, lassen sich anhand der Ergebnisse dieser Arbeit nicht bestätigen.

Angesichts der geringen Stichprobengröße der untersuchten Patientengruppen und Subgruppen sind die vorliegenden Ergebnisse dabei im Sinne einer Pilotstudie zu betrachten, in deren Rahmen erstmals menschliche Blutzellen auf einen Zusammenhang zwischen CD47-Expression und Ausprägung einer hämatologischen Autoimmunerkrankung untersucht wurden.

Es ist nicht auszuschließen, dass weitere Studien mit deutlich größerem Stichprobenumfang dennoch kleinere, statistisch signifikante Abweichungen der CD47-Expression aufdecken würden, die hier aufgrund eben jener kleinen Patientenzahlen nicht nachgewiesen werden konnten. Nutzen und Aussagekraft solcher Untersuchungen blieben allerdings fraglich, da die Existenz eines großen und damit bedeutsamen Unterschiedes aufgrund der hier bereits vorliegenden Ergebnisse nicht zu erwarten ist. CD47-Defizite in Größenordnungen von 50 bis 100%, die für murine Zellen zur sicheren Phagozytosesteigerung führen, lassen sich bei Patienten mit AIHA oder ITP offensichtlich nicht nachweisen.

Zukünftige Untersuchungen müssen nun zunächst herausfinden, inwiefern die für den murinen Organismus gewonnenen Erkenntnisse trotz der speziesspezifischen Eigenschaften von CD47 auf den Menschen übertragen werden können und ob sich humanes CD47 tatsächlich ebenfalls als Phagozytoseinhibitor und Signalprotein der Selbsttoleranz erweist. Gegebenenfalls sind darüber hinaus Analysen notwendig, die die bisher offene Frage klären, welcher Grad der Reduktion von zellgebundenem CD47 ausreicht, um die Phagozytoserate menschlicher Zellen maßgeblich zu steigern.

Nach dem derzeitigen Erkenntnisstand schließen die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse nicht gänzlich aus, dass humanes CD47 dennoch eine Rolle in der Regulation der Phagozytoseprozesse im Rahmen von AIHA und ITP spielt. Im komplexen Zusammenspiel einer Vielzahl von Einflussfaktoren auf Schweregrad und Verlauf der Autoimmunerkrankungen scheint CD47 allerdings keine so dominierende Stellung einzunehmen wie bisher vermutet.

Dennoch ist selbst die therapeutische Anwendbarkeit von CD47-Mimetika oder künstlich exprimiertem CD47 bei AIHA und ITP nicht undenkbar, sofern entsprechende Untersuchungen Klarheit über den tatsächlichen Einfluss und die quantitativen Voraussetzungen als phagozytoseinhibierendes Protein verschaffen.

5 Zusammenfassung

Die Autoimmunhämolytische Anämie (AIHA) und die Immunthrombozytopenie (ITP) gehen in variablem Ausmaß mit der Zerstörung körpereigener Erythrozyten beziehungsweise Thrombozyten einher. Die Ursache für diese Erkrankungen ist die Bildung von Autoantikörpern, auf deren Nachweis und Klassifizierung sich die Diagnostik derzeit hauptsächlich stützt. Weder die bloße Existenz von Autoantikörpern noch deren Klassen- und Subklassenzugehörigkeit oder Titer lassen jedoch immer eindeutige Rückschlüsse auf den Schweregrad der Hämolyse oder Thrombozytopenie zu.

CD47, das als ubiquitäres Oberflächenprotein eine Vielzahl unterschiedlicher biologischer Funktionen ausübt, hat sich in einigen wenigen Studien als Phagozytoseinhibitor und potentiell Protein der Selbsttoleranz erwiesen. In Experimenten an Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass zielzellgebundenes CD47 in der Lage ist, die Phagozytose von Blutzellen durch Makrophagen zu hemmen und den Schweregrad von Autoimmunzytopenien zu vermindern.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob CD47 auch beim Menschen Einfluss auf das Ausmaß von Hämolyse und Thrombozytenzerstörung hat. Mittels quantitativer Durchflusszytometrie wurden AIHA-Patienten, ITP-Patienten und Gesunde hinsichtlich ihrer CD47-Mengen auf Erythrozyten, Thrombozyten, Lymphozyten und Granulozyten miteinander verglichen. Dabei ergab sich, dass AIHA-Patienten und ITP-Patienten normale CD47-Expressionslevel aufweisen und dass auch Patienten mit aktiver Hämolyse oder Thrombozytenzerstörung nicht weniger CD47 exprimieren als Patienten in Remission. Eine Reduktion des oberflächengebundenen CD47 als Ursache der gesteigerten Zerstörung fand sich selbst auf den von der autoimmunen Phagozytose betroffenen Zellen nicht.

Darüber hinaus konnte CD47 in löslicher Form im Blutplasma aller Probanden nachgewiesen werden, ohne dass die Menge des Proteins in Beziehung zur Diagnose oder zum Ausmaß der Zellzerstörung stand.

Ein Zusammenhang zwischen CD47-Expression und Schweregrad einer Autoimmunzytopenie, der für den murinen Organismus bereits nachgewiesen wurde, ließ sich somit beim Menschen anhand der Ergebnisse dieser Arbeit nicht belegen.

Speziesspezifische Eigenschaften des Oberflächenproteins CD47 und seiner Interaktionspartner sind möglicherweise dafür verantwortlich, dass die für den murinen Organismus gewonnenen Erkenntnisse nicht uneingeschränkt auf den Menschen übertragen werden können.

Ein Einfluss von CD47 auf die Phagozytoseprozesse im Rahmen von AIHA und ITP ist dennoch nicht ausgeschlossen, auch wenn CD47 offensichtlich eine weitaus weniger dominierende Rolle spielt, als zunächst angenommen werden konnte.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Salama A, Ahrens N, Kiesewetter H. Serological and Clinical Aspects of Autoimmune Hemolytic Anemias. *Infus Ther Transfus Med* 2002;29:206-17.
- [2] Cines DB, Blanchette VS. Immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 2002;346:995-1008.
- [3] Semple JW, Freedman J. Autoimmune pathogenesis and autoimmune hemolytic anemia. *Semin Hematol* 2005;42:122-30.
- [4] Coopamah MD, Garvey MB, Freedman J, Semple JW. Cellular immune mechanisms in autoimmune thrombocytopenic purpura: An update. *Transfus Med Rev* 2003;17:69-80.
- [5] Oldstone MB. Molecular mimicry and immune-mediated diseases. *Faseb J* 1998;12:1255-65.
- [6] Wright JF, Blanchette VS, Wang H, et al. Characterization of platelet-reactive antibodies in children with varicella-associated acute immune thrombocytopenic purpura (ITP). *Br J Haematol* 1996;95:145-52.
- [7] Klein H, Anstee D. *Mollison's Blood Transfusion in Clinical Medicine*. 11th ed. Oxford, Blackwell, 2005.
- [8] Wadenvik H, Stockelberg D, Hou M. Platelet proteins as autoantibody targets in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Acta Paediatr Suppl* 1998;424:26-36.
- [9] He R, Reid DM, Jones CE, Shulman NR. Spectrum of Ig classes, specificities, and titers of serum antiglycoproteins in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 1994;83:1024-32.

-
- [10] Silberstein L. CD47 and the control of immune hemolysis 10.1182 / blood.V99.10.3491. Blood 2002;99:3491-.
- [11] Gehrs BC, Friedberg RC. Autoimmune hemolytic anemia. Am J Hematol 2002;69:258-71.
- [12] Peghini PE, Fehr J. Anämieabklärung (Teil 2). Schweiz Med Forum 2002;38:880-8.
- [13] Sokol RJ, Booker DJ, Stamps R. Erythrocyte autoantibodies, autoimmune haemolysis, and carcinoma. J Clin Pathol 1994;47:340-3.
- [14] Clark DA, Dessypris EN, Jenkins DE, Jr., Krantz SB. Acquired immune hemolytic anemia associated with IgA erythrocyte coating: investigation of hemolytic mechanisms. Blood 1984;64:1000-5.
- [15] Salama A. Erworbene immunhämolytische Anämien. Ther Umsch 2004;61:178-86.
- [16] King KE, Ness PM. Treatment of autoimmune hemolytic anemia. Semin Hematol 2005;42:131-6.
- [17] Berentsen S, Ulvestad E, Gjertsen BT, et al. Rituximab for primary chronic cold agglutinin disease: a prospective study of 37 courses of therapy in 27 patients. Blood 2004;103:2925-8.
- [18] Lee EJ, Kueck B. Rituxan in the treatment of cold agglutinin disease. Blood 1998;92:3490-1.
- [19] George J, Rizvi M. Thrombocytopenia. In: Beutler E, Lichtmann M, Coller B, Kipps T, Seligsohn U, eds. Williams hematology. 6th ed. New York: McGraw-Hill, 2001:1495-539.

-
- [20] Frederiksen H, Schmidt K. The incidence of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults increases with age. *Blood* 1999;94:909-13.
- [21] George JN. Platelet immunoglobulin G: its significance for the evaluation of thrombocytopenia and for understanding the origin of alpha-granule proteins. *Blood* 1990;76:859-70.
- [22] Cines DB, Wilson SB, Tomaski A, Schreiber AD. Platelet antibodies of the IgM class in immune thrombocytopenic purpura. *J Clin Invest* 1985;75:1183-90.
- [23] Emmons RV, Reid DM, Cohen RL, et al. Human thrombopoietin levels are high when thrombocytopenia is due to megakaryocyte deficiency and low when due to increased platelet destruction. *Blood* 1996;87:4068-71.
- [24] Ballem PJ, Segal GM, Stratton JR, Gernsheimer T, Adamson JW, Slichter SJ. Mechanisms of thrombocytopenia in chronic autoimmune thrombocytopenic purpura. Evidence of both impaired platelet production and increased platelet clearance. *J Clin Invest* 1987;80:33-40.
- [25] McMillan R, Wang L, Tomer A, Nichol J, Pistillo J. Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP. *Blood* 2004;103:1364-9.
- [26] Bennett CM, de Jong JL, Neufeld EJ. Targeted ITP strategies: do they elucidate the biology of ITP and related disorders? *Pediatr Blood Cancer* 2006;47:706-9.
- [27] Olsson B, Andersson PO, Jernas M, et al. T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Nat Med* 2003;9:1123-4.
- [28] Zhang F, Chu X, Wang L, et al. Cell-mediated lysis of autologous platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol* 2006;76:427-31.

-
- [29] George JN, Woolf SH, Raskob GE, et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood* 1996;88:3-40.
- [30] Packman C. Acquired hemolytic anemia due to warm-reacting autoantibodies. In: Beutler E, Lichtmann M, Coller B, Kipps T, Seligsohn U, eds. *Williams hematology*. 6th ed. New York: McGraw-Hill, 2001:639-48.
- [31] Tomer A. Autoimmune thrombocytopenia: determination of platelet-specific autoantibodies by flow cytometry. *Pediatr Blood Cancer* 2006;47:697-700.
- [32] Portielje JE, Westendorp RG, Kluin-Nelemans HC, Brand A. Morbidity and mortality in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 2001;97:2549-54.
- [33] Brown E, Hooper L, Ho T, Gresham H. Integrin-associated protein: a 50-kD plasma membrane antigen physically and functionally associated with integrins. *J Cell Biol* 1990;111:2785-94.
- [34] Lindberg FP, Lublin DM, Telen MJ, et al. Rh-related antigen CD47 is the signal-transducer integrin-associated protein. *J Biol Chem* 1994;269:1567-70.
- [35] Knapp W, Rieber P, Dorken B, Schmidt RE, Stein H, vd Borne AE. Towards a better definition of human leucocyte surface molecules. *Immunol Today* 1989;10:253-8.
- [36] Lindberg FP, Gresham HD, Schwarz E, Brown EJ. Molecular cloning of integrin-associated protein: an immunoglobulin family member with multiple membrane-spanning domains implicated in alpha v beta 3-dependent ligand binding. *J Cell Biol* 1993;123:485-96.
- [37] Daniels G. A century of human blood groups. *Wien Klin Wochenschr* 2001;113:781-6.
- [38] Brown EJ, Frazier WA. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends Cell Biol* 2001;11:130-5.

-
- [39] Reinhold MI, Lindberg FP, Plas D, Reynolds S, Peters MG, Brown EJ. In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47). *J Cell Sci* 1995;108 (Pt 11):3419-25.
- [40] Rebres RA, Vaz LE, Green JM, Brown EJ. Normal ligand binding and signaling by CD47 (integrin-associated protein) requires a long range disulfide bond between the extracellular and membrane-spanning domains. *J Biol Chem* 2001;276:34607-16.
- [41] Oldenborg PA. Role of CD47 in erythroid cells and in autoimmunity. *Leuk Lymphoma* 2004;45:1319-27.
- [42] Bruce LJ, Beckmann R, Ribeiro ML, et al. A band 3-based macrocomplex of integral and peripheral proteins in the RBC membrane. *Blood* 2003;101:4180-8.
- [43] Bruce LJ, Ghosh S, King MJ, et al. Absence of CD47 in protein 4.2-deficient hereditary spherocytosis in man: an interaction between the Rh complex and the band 3 complex. *Blood* 2002;100:1878-85.
- [44] Dahl KN, Westhoff CM, Discher DE. Fractional attachment of CD47 (IAP) to the erythrocyte cytoskeleton and visual colocalization with Rh protein complexes. *Blood* 2003;101:1194-9.
- [45] Brown EJ. Integrin-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 2002;14:603-7.
- [46] Chung J, Gao AG, Frazier WA. Thrombospondin acts via integrin-associated protein to activate the platelet integrin α IIb β 3. *J Biol Chem* 1997;272:14740-6.
- [47] Rebres RA, Green JM, Reinhold MI, Ticchioni M, Brown EJ. Membrane raft association of CD47 is necessary for actin polymerization and protein kinase C θ translocation in its synergistic activation of T cells. *J Biol Chem* 2001;276:7672-80.

-
- [48] Drbal K, Cerny J, Angelisova P, et al. CDw149 antibodies recognize a clustered subset of CD47 molecules associated with cytoplasmic signaling molecules. *Tissue Antigens* 2000;56:258-67.
- [49] Rebres RA, Kajihara K, Brown EJ. Novel CD47-dependent intercellular adhesion modulates cell migration. *J Cell Physiol* 2005;205:182-93.
- [50] Wang XQ, Frazier WA. The thrombospondin receptor CD47 (IAP) modulates and associates with alpha2 beta1 integrin in vascular smooth muscle cells. *Mol Biol Cell* 1998;9:865-74.
- [51] Lindberg FP, Bullard DC, Caver TE, Gresham HD, Beaudet AL, Brown EJ. Decreased resistance to bacterial infection and granulocyte defects in IAP-deficient mice. *Science* 1996;274:795-8.
- [52] Pettersen RD, Hestdal K, Olafsen MK, Lie SO, Lindberg FP. CD47 signals T cell death. *J Immunol* 1999;162:7031-40.
- [53] Schwartz MA, Brown EJ, Fazeli B. A 50-kDa integrin-associated protein is required for integrin-regulated calcium entry in endothelial cells. *J Biol Chem* 1993;268:19931-4.
- [54] Numakawa T, Ishimoto T, Suzuki S, et al. Neuronal roles of the integrin-associated protein (IAP/CD47) in developing cortical neurons. *J Biol Chem* 2004;279:43245-53.
- [55] Oldenborg PA, Gresham HD, Lindberg FP. CD47-signal regulatory protein alpha (SIRPalpha) regulates Fcgamma and complement receptor-mediated phagocytosis. *J Exp Med* 2001;193:855-62.
- [56] Vernon-Wilson EF, Kee WJ, Willis AC, Barclay AN, Simmons DL, Brown MH. CD47 is a ligand for rat macrophage membrane signal regulatory protein SIRP (OX41) and human SIRPalpha 1. *Eur J Immunol* 2000;30:2130-7.

-
- [57] Long EO. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol* 1999;17:875-904.
- [58] Oldenborg PA, Zheleznyak A, Fang YF, Lagenaur CF, Gresham HD, Lindberg FP. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science* 2000;288:2051-4.
- [59] Oldenborg PA, Gresham HD, Chen Y, Izui S, Lindberg FP. Lethal autoimmune hemolytic anemia in CD47-deficient nonobese diabetic (NOD) mice. *Blood* 2002;99:3500-4.
- [60] Fossati-Jimack L, Azeredo da Silveira S, Moll T, et al. Selective increase of auto-immune epitope expression on aged erythrocytes in mice: implications in anti-erythrocyte autoimmune responses. *J Autoimmun* 2002;18:17-25.
- [61] Anniss AM, Sparrow RL. Expression of CD47 (integrin-associated protein) decreases on red blood cells during storage. *Transfus Apher Sci* 2002;27:233-8.
- [62] Stewart A, Urbaniak S, Turner M, Bessos H. The application of a new quantitative assay for the monitoring of integrin-associated protein CD47 on red blood cells during storage and comparison with the expression of CD47 and phosphatidylserine with flow cytometry. *Transfusion* 2005;45:1496-503.
- [63] Bessos H, Seghatchian J. Red cell storage lesion: the potential impact of storage-induced CD47 decline on immunomodulation and the survival of leucofiltered red cells [Abstract]. *Transfus Apher Sci* 2005;32:227-32.
- [64] Avent N, Judson PA, Parsons SF, et al. Monoclonal antibodies that recognize different membrane proteins that are deficient in Rhnull human erythrocytes. One group of antibodies reacts with a variety of cells and tissues whereas the other group is erythroid-specific. *Biochem J* 1988;251:499-505.
- [65] Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. *Blood* 2000;95:375-87.

-
- [66] Mouro-Chanteloup I, Delaunay J, Gane P, et al. Evidence that the red cell skeleton protein 4.2 interacts with the Rh membrane complex member CD47. *Blood* 2003;101:338-44.
- [67] Olsson M, Bruhns P, Frazier WA, Ravetch JV, Oldenborg PA. Platelet homeostasis is regulated by platelet expression of CD47 under normal conditions and in passive immune thrombocytopenia. *Blood* 2005;105:3577-82.
- [68] Blazar BR, Lindberg FP, Ingulli E, et al. CD47 (integrin-associated protein) engagement of dendritic cell and macrophage counterreceptors is required to prevent the clearance of donor lymphohematopoietic cells. *J Exp Med* 2001;194:541-9.
- [69] Hsu YC, Acuna M, Tahara SM, Peng CA. Reduced phagocytosis of colloidal carriers using soluble CD47. *Pharm Res* 2003;20:1539-42.
- [70] Raffael A, Nebe CT, Valet G. Grundlagen der Durchflußzytometrie. In: Schmitz G, Rothe G, eds. *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. Stuttgart: Schattauer-Verlag, 1994:3-49.
- [71] Kantor A, Roederer M. FACS analysis of leukocytes. In: Weir D, Herzenberg L, Herzenberg L, eds. *Weir's Handbook of Experimental Immunology*. 5th ed. Blackwell Science, 1996:49.1-.13.
- [72] Diehl J, Arbinger R. *Einführung in die Inferenzstatistik*. 3rd ed. Eschborn, Verlag Dietmar Klotz, 2001.
- [73] Gratama JW, D'Hautcourt J L, Mandy F, et al. Flow cytometric quantitation of immunofluorescence intensity: problems and perspectives. European Working Group on Clinical Cell Analysis. *Cytometry* 1998;33:166-78.
- [74] Rosales C, Gresham HD, Brown EJ. Expression of the 50-kDa integrin-associated protein on myeloid cells and erythrocytes. *J Immunol* 1992;149:2759-64.

-
- [75] Dahl KN, Parthasarathy R, Westhoff CM, Layton DM, Discher DE. Protein 4.2 is critical to CD47-membrane skeleton attachment in human red cells. *Blood* 2004;103:1131-6.
- [76] Arndt PA, Garratty G. Rh(null) red blood cells with reduced CD47 do not show increased interactions with peripheral blood monocytes. *Br J Haematol* 2004;125:412-4.
- [77] Olsson M, Nilsson A, Oldenborg PA. Dose-dependent inhibitory effect of CD47 in macrophage uptake of IgG-opsonized murine erythrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;352:193-7.
- [78] Tada K, Tanaka M, Hanayama R, et al. Tethering of apoptotic cells to phagocytes through binding of CD47 to Src homology 2 domain-bearing protein tyrosine phosphatase substrate-1. *J Immunol* 2003;171:5718-26.
- [79] Olsson M, Nilsson A, Oldenborg PA. Target cell CD47 regulates macrophage activation and erythrophagocytosis. *Transfus Clin Biol* 2006;13:39-43.
- [80] Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, et al. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 2005;123:321-34.
- [81] Pettersen RD. CD47 and death signaling in the immune system. *Apoptosis* 2000;5:299-306.
- [82] Olsson B, Andersson PO, Jacobsson S, Carlsson L, Wadenvik H. Disturbed apoptosis of T-cells in patients with active idiopathic thrombocytopenic purpura. *Thromb Haemost* 2005;93:139-44.
- [83] Subramanian S, Parthasarathy R, Sen S, Boder ET, Discher DE. Species- and cell-type specific interactions between CD47 and human SIRP{alpha}. *Blood* 2005;

-
- [84] Subramanian S, Tsai R, Discher DE. The 'metabolon,' CD47, and the 'phagocytic synapse': molecular co-localization and species divergence. *Transfus Clin Biol* 2006;13:31-8.
- [85] Barry OP, Pratico D, Savani RC, FitzGerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest* 1998;102:136-44.
- [86] Knowles DW, Tilley L, Mohandas N, Chasis JA. Erythrocyte membrane vesiculation: model for the molecular mechanism of protein sorting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:12969-74.
- [87] Discher DE, Dahl KN, Photos PJ, Boder ET, Parthasarathy R. Molecular basis of biocompatibility: cellular engineering analyses. In: Summer Bioengineering Conference. Sonesta Beach Resort in Key Biscayne, Florida, 2003.
- [88] Wang H, VerHalen J, Madariaga ML, et al. Attenuation of phagocytosis of xenogeneic cells by manipulating CD47. *Blood* 2007;109:836-42.

Erklärung

„Ich, Claudia Pagenkopf, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „CD47-Expression auf Blutzellen und im Blutplasma bei Autoimmunhämolytischer Anämie und Immunthrombozytopenie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

29.05.2007

Claudia Pagenkopf

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Abdulgabar Salama möchte ich mich ganz herzlich für die Ermöglichung dieser Arbeit und das freundliche Überlassen des Themas bedanken.

Mein Dank gilt weiterhin Dr. Norbert Ahrens für die kontinuierliche und stets motivierte Betreuung sowie tatkräftige Unterstützung meiner Arbeit auch über seine Zeit an der Charité hinaus.

Ich danke den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Immunhämatologie-Labors für die herzliche Aufnahme und die stets angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern und Großeltern, die mir durch ihre uneingeschränkte Unterstützung und den Rückhalt während meines gesamten Studiums diesen Weg überhaupt erst ermöglicht haben.

Ich danke Steffen Hartz für den Wochenend-Arbeitseinsatz, der mich in einer Phase des Rückschlags so weit vorangebracht hat.

Nicht zuletzt danke ich meinen Freunden und meiner Familie für die Geduld, das Verständnis und die vielen aufmunternden Worte.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.