

Aus dem  
CharitéCentrum für Tumormedizin  
Institut für Transfusionsmedizin  
Campus Virchow-Klinikum  
Direktor: Prof. Dr. A. Salama

**Habilitationsschrift**

**Entwicklung von Partikel-Agglutinationstesten zum Nachweis  
thrombozytärer Antigene und Antikörper**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Transfusionsmedizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. med. Oliver Meyer**  
**geboren am 7. Januar 1965 in Osnabrück**

Eingereicht am:	10. November 2008
öffentlich wissenschaftlicher Vortrag am:	19. Oktober 2009
Dekanin:	Univ.-Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich
1. Gutachter:	Prof. Dr. Hubert Schrezenmeier, Ulm
2. Gutachter:	Prof. Dr. Harald Klüter, Mannheim

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINFÜHRUNG .....</b>	<b>6</b>
1.1. Antigene auf Thrombozyten.....	7
1.1.1. Blutgruppenantigene .....	7
1.1.2. HLA-Antigene .....	7
1.1.3. Thrombozytenrelevante Antigene .....	7
1.2. Thrombozytenrelevante Antikörper.....	9
1.3. Immunthrombozytopenien .....	10
1.3.1. Autoimmunthrombozytopenie.....	10
1.3.2. Alloimmunthrombozytopenie .....	10
1.3.3. Refraktärzustand gegenüber Thrombozytentransfusionen .....	12
1.4. Testsysteme zum Nachweis von Antikörpern gegen Thrombozyten.....	12
1.4.1. Antikörperbindungstests.....	12
1.4.2. Glykoprotein-spezifische Tests .....	13
1.5. Typisierung thrombozytärer Alloantigene .....	15
1.6. Heparin-induzierte Thrombozytopenie.....	17
<b>2. ZIELSTELLUNG.....</b>	<b>19</b>
<b>3. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE .....</b>	<b>20</b>
3.1. Nachweis Heparin-induzierter Antikörper gegen Thrombozyten im Partikel- Gel-Immunoassay (ID-HPF4) .....	20
3.2. Nachweis thrombozytärer Auto- und Alloantikörper .....	24
3.2.1. Antigen-spezifischer Partikel-Agglutinationstest (ASPA) .....	24
3.2.2. Antigen-spezifischer Capture Test (ASCA).....	34
3.3. Typisierung von Alloantigenen.....	44
3.3.1. Genotypisierung thrombozytärer Alloantigene .....	44
3.3.2. Phänotypisierung des thrombozytären Alloantigens HPA-1a sowie der HLA-Antigene HLA-A2, -B7 und B27.....	51
<b>4. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>57</b>

<b>5. TABELLEN</b> .....	<b>59</b>
5.1. Thrombozytenspezifische Antigene.....	59
5.2. Vergleich der Ergebnisse (n=135) des neuen ID-HPF4 mit denen des Heparin-induzierten Plättchenaktivierungstest (HIPA) und denen des kommerziellen Heparin/Plättchenfaktor 4-ELISA Asserachrom HPIA.....	60
5.3. Monoklonale Antikörper, die zum Glykoprotein-spezifischen Nachweis thrombozytenreaktiver Antikörper verwendet wurden.....	60
5.4. Antigen-spezifischer Nachweis von gebundenen Autoantikörpern gegen die thrombozytären Glykoproteinkomplexe GPIIb-IIIa, GPIb-IX und GPIa-IIa im MAIPA und im ASPA.....	61
5.5. Antigen-spezifischer Nachweis von freien Autoantikörpern gegen die thrombozytären Glykoproteinkomplexe GPIIb-IIIa, GPIb-IX und GPIa-IIa im MAIPA und im ASPA.....	62
5.6. Antigen-spezifischer Nachweis von freien Alloantikörpern gegen HPA-1a und HPA-5b im MAIPA und im ASPA.....	63
5.7. Antigen-spezifischer Nachweis von thrombozytenspezifischen Alloantikörpern im MAIPA und im ASCA.....	64
5.8. Nachweis von thrombozytenreaktiven Autoantikörpern im direkten und indirekten MAIPA im Vergleich zum ASCA.....	65
5.9. Sequenz-spezifische Primer für die Genotypisierung von thrombozytären Alloantigenen.....	66
5.10. Ergebnisse der HPA-Typisierung mittels Standard PCR-SSP und Partikel-Agglutinationsmethode.....	67
5.11. Ergebnisse der HPA-1a Phänotypisierung im Partikel-Agglutinationstest.....	67
5.12. Ergebnisse der HLA-A2, -B7 und -B27 Phänotypisierung im Partikel-Agglutinationstest.....	68
<b>6. ABBILDUNGEN</b> .....	<b>69</b>
6.1. Pathophysiologie der Heparin-induzierten Thrombozytopenie.....	69
6.2. Vergleich positiver und negativer Reaktionen mit Heparin/Plättchenfaktor 4-beladenen Polystyrenpartikeln.....	70

6.3. Reaktivität der verwendeten Polystyrenpartikel nachdem sie mit solubilisierten Thrombozyten gesunder Blutspender und verschiedenen Patienten-Serumproben inkubiert wurden. ....	70
6.4. Reaktivität ansteigender Volumina verdünnter Serumproben, die Autoantikörper gegen GPIIb-IIa enthalten und mit biotinylierten monoklonalen Antikörpern gegen GPIIb-IIIa und superparamagnetischen Streptavidin-Partikeln inkubiert wurden. ....	71
6.5. HPA-Genotypisierung und Visualisierung der PCR-Produkte mittels Partikel-Agglutinationsreaktion .....	72
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>73</b>
<b>8. DANKSAGUNG .....</b>	<b>81</b>

## **Widmung**

Ich widme diese Arbeit meiner Frau Barbara, die mich immer unterstützt hat und ohne deren Geduld, Motivation und kritische Diskussionsbereitschaft diese Arbeit undenkbar gewesen wäre

## 1. EINFÜHRUNG

Immunthrombozytopenien sind inzwischen die am besten charakterisierten Immunerkrankungen. Sie werden durch die Bildung spezifischer Antikörper erworben, die an der Thrombozytenoberfläche haften und zu deren Elimination über Fc-Rezeptoren der Makrophagen führen können. Thrombozyten-spezifische Antikörper können nur in seltenen Fällen das Komplement-System aktivieren und eine intravasale Thrombozytolyse verursachen. Die klinische Relevanz einer Immunthrombozytopenie wird durch die damit verbundene Störung der primären Hämostase als häufigste Ursache für eine Blutungsneigung reflektiert.

Klinisch und serologisch werden Immunthrombozytopenien in Autoimmunthrombozytopenien (ITP), Alloimmunthrombozytopenien und Medikament-induzierte Immunthrombozytopenien unterteilt. Die Diagnose lässt sich häufig nur durch den Nachweis der ursächlichen Antikörper klären. Der immunhämatologische Nachweis dieser Antikörper ist jedoch durch die morphologische Beschaffenheit der Thrombozyten schwierig und kann daher bislang nur in Speziallabors durchgeführt werden. In der Vergangenheit wurden zahlreiche Testmethoden entwickelt und dennoch ist es bisher nicht gelungen, ein routinefreundliches und gleichzeitig sensitives Testverfahren auf diesem Gebiet zu entwickeln. Unsere Arbeitsgruppe befasst sich mit allen Aspekten der Immunthrombozytopenien und in der vorliegenden Schrift wird eine neue Nachweistchnik thrombozytärer Antigene und Antikörper beschrieben.

## 1.1. Antigene auf Thrombozyten

### 1.1.1. *Blutgruppenantigene*

AB0-Antigene werden sowohl passiv aus dem Plasma an die Thrombozytenmembran adsorbiert [1] als auch als intrinsische Determinanten der thrombozytären Glykoproteine Ib<sub>α</sub> [2, 3], IIa, IIIa [3], IIb [4] und CD31 [5] exprimiert. Neben den AB0-Merkmalen konnte auch das Le<sup>a</sup>-Antigen auf der Thrombozytenmembran nachgewiesen werden [6]. Weitere erythrozytäre Antigene wie Rhesus, Kell, Duffy, Kidd und Lutheran konnten auf Thrombozyten bisher nicht nachgewiesen werden [7].

### 1.1.2. *HLA-Antigene*

HLA-Klasse-I-Antigene des Locus A und B sind auf der Thrombozytenmembran in großer Dichte nachweisbar. Dagegen sind Antigene des Locus C nur in sehr geringer Dichte vorhanden. HLA-Klasse-II-Antigene werden auf Thrombozyten nicht exprimiert. Die Expression der HLA-Antigene weist eine große Variabilität auf, die vermutlich genetisch determiniert ist [8]. Thrombozyten enthalten HLA-Klasse-I spezifische mRNA [9], so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese Antigene von den Thrombozyten synthetisiert werden und HLA-Klasse-I-Antigene daher als integraler Bestandteil der Thrombozytenmembran zu betrachten sind.

### 1.1.3. *Thrombozytenrelevante Antigene*

Als thrombozytenspezifische Antigene werden verschiedene Glykoproteine

bzw. Glykoproteinkomplexe (GP) bezeichnet, die ursprünglich nur auf Thrombozyten nachgewiesen wurden. Nachdem die genaue Lokalisation dieser Antigene näher untersucht wurde, kann man streng genommen nicht mehr von „thrombozytenspezifischen“ Antigenen sprechen, da die meisten dieser Antigene auch auf anderen Zellen nachweisbar sind [10-13]. Dennoch wird dieser Begriff zur Benennung einer bestimmten Gruppe von Antigenen, die im Rahmen von immunologisch bedingten Thrombozytopenien von Bedeutung sind, weiter verwendet. Hierbei handelt es sich im wesentlichen um die Glykoproteinkomplexe (GP) GPIIb-IIIa, GPIb-IX, GPIa-IIa, GPV und CD109 (Tabelle 4.1). Darüber hinaus weisen die Glykoproteine GPIa, GPIb, GPIIb, GPIIIa und CD109 Polymorphismen auf, die als humane Plättchenantigene (HPA) bezeichnet werden [14]. Diese Polymorphismen basieren auf einer einfachen Basensubstitution auf DNA-Ebene, die wiederum zu einer Aminosäuresubstitution auf Proteinebene und damit zu einer Veränderung der tertiären Glykoproteinstruktur führt. Eine Ausnahme bildet das Antigen HPA-14bw (Oe<sup>a</sup>), welches durch eine Aminosäuredeletion charakterisiert ist [15]. Eine weitere antigene Struktur ist das Glykoprotein GPIV (CD36). Individuen, die dieses Glykoprotein nicht auf Thrombozyten exprimieren, findet man vor allem in Japan, so dass diese Personen Isoantikörper, z.B. nach Transfusionen, bilden können [16]. Es bestehen weiterhin Hinweise auf das Vorkommen bisher nicht charakterisierter Antigene. Diese Vermutung beruht auf Einzelbeobachtungen bei Patienten, die keinen Anstieg auf HLA- und HPA-kompatible Thrombozytensubstitutionen zeigen, sowie bei Neugeborenen mit unklarer Thrombozytopenie.



## 1.2. Thrombozytenrelevante Antikörper

Blutgruppen-Isoagglutinine (Anti-A und Anti-B) können gelegentlich zu einem verminderten Inkrement nach ABO-inkompatibler Thrombozytentransfusion führen [17-19]. Da dieser Effekt in der Regel mild ist, stellen ABO-inkompatible Thrombozytentransfusionen keine Kontraindikation für eine Thrombozytensubstitution dar. Dagegen verursachen Antikörper gegen HLA-Klasse I-Antigene eine vorzeitige Elimination inkompatibler Thrombozyten. In diesen Fällen ist es daher erforderlich HLA-Klasse I-kompatible- Thrombozytenkonzentrate zur Verfügung zu stellen [20].

Thrombozytenreaktive Autoantikörper richten sich vor allem gegen Membran-Glykoproteine, wie die Glykoproteinkomplexe GPIIb-IIIa [21, 22], GPI-IX-V [23] und selten gegen GPIa-IIa [24, 25]. Autoantikörper gegen andere Glykoproteine, wie z.B. GPV, sind sehr selten [26].

Die meisten Alloimmunthrombozytopenien werden durch Alloantikörper gegen die Alloantigene HPA-1a und HPA-5b verursacht (Tabelle 4.1). Weiterhin werden, vor allem bei der Fetalen bzw. Neonatalen Alloimmunthrombozytopenie (FAIT/NAIT) auch immer wieder Alloantikörper und ihre korrespondierenden Antigene identifiziert, die sich nur bei den betroffenen Patienten und im engeren Familienkreis nachweisen lassen. Diese Antigene werden in der Regel als „private“ oder „low frequency“ Antigene bezeichnet [27].

Medikament-abhängige Antikörper richten sich, wie Autoantikörper, gegen dieselben Glykoproteine (vor allem GPIIb-IIIa und GPIb-IX-V). Sie reagieren aber nur in Anwesenheit der ursächlichen Substanz mit den Glykoproteinen und führen zu schweren, z.T. lebensbedrohlichen Thrombozytopenien. Bisher wurde eine Vielzahl von Substanzen beschrieben, die Thrombozytopenien verursachen. Dennoch sind die korrespondierenden Antigene in den meisten Fällen nicht bekannt. Eine

Ausnahme hiervon bilden Chinidin-abhängige Antikörper, die vor allem an die Glykoproteine GPIX und GPIIIa binden [28, 29]. Vor kurzem wurde auch CD31 (PECAM-1) als Zielantigen von medikament-abhängigen Antikörpern beschrieben [30].

### 1.3. Immunthrombozytopenien

#### 1.3.1. *Autoimmunthrombozytopenie*

Bei der Autoimmunthrombozytopenie (ITP) binden die ursächlichen Antikörper an autologe thrombozytäre Glykoproteine, und die sensibilisierten Thrombozyten können über die Fc-Rezeptoren der Makrophagen, vor allem in der Milz, phagozytiert werden [31]. Im Allgemeinen wird die Diagnose der ITP durch den Ausschluss anderer Ursachen für die Thrombozytopenie gestellt [32, 33]. Da der Nachweis thrombozytärer Autoantikörper schwierig ist und differentialdiagnostisch zahlreiche andere Erkrankungen in Betracht gezogen werden müssen, bleibt es oft unklar ob eine ITP vorliegt oder nicht.

#### 1.3.2. *Alloimmunthrombozytopenie*

Der Alloimmunthrombozytopenie geht eine Immunisierung gegen Alloantigene auf Thrombozyten voraus [34]. Die wohl bekannteste Alloimmunthrombozytopenie ist die Fetale bzw. Neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FAIT, NAIT) [35]. Vergleichbar mit dem Morbus Hämolyticus Neonatorum (Mhn) wird die Schwangere gegen thrombozytäre Alloantigene immunisiert, die auf den fetalen Thrombozyten exprimiert sind. Im Gegensatz zum Mhn führen diese Alloantikörper schon während der ersten

Schwangerschaft zu einer Thrombozytopenie des Kindes. Sie gehören zur IgG-Klasse und können bereits in utero (FAIT) und/oder postnatal (NAIT) zu einer Thrombozytopenie mit mehr oder weniger starker Blutungssymptomatik bei dem Kind führen. Nur durch rechtzeitige Identifikation der verantwortlichen Antikörper kann die Diagnose gesichert werden und eine adäquate Behandlung eingeleitet werden [36].

Weitere alloimmunthrombozytopenische Syndrome sind die Posttransfusionelle Purpura (PTP), die passive Alloimmunthrombozytopenie und die transplantations-assoziierte Immunthrombozytopenie. Die PTP betrifft vor allem Frauen, die älter als 40 Jahre sind und die sich zu einem früheren Zeitpunkt gegen ein thrombozytäres Alloantigen (meist HPA-1a) immunisiert haben [37]. Nach Transfusion eines thrombozytenhaltigen Blutprodukts kommt es zu einer sekundären Immunantwort. Die Patientinnen entwickeln nach 7 – 10 Tagen einen hochtitrigen Antikörper gegen HPA-1a, welcher paradoxerweise auch mit den autologen Thrombozyten der (HPA-1a negativen) Patientinnen reagiert. Die Folge ist eine schwere therapiepflichtige Thrombozytopenie mit Blutungsneigung. Die PTP wird bisher häufig fehl- oder zu spät diagnostiziert [38].

Bei der passiven Alloimmunthrombozytopenie (PAT) kommt es durch die Transfusion eines Blutproduktes, welches thrombozytenreaktive Antikörper enthält, zu einer Thrombozytopenie bei dem Transfusionsempfänger [39]. Es handelt sich hier meistens um milde und reversible Thrombozytopenien.

Transplantations-assoziierte Alloimmunthrombozytopenien kommen sowohl bei Knochenmarkstransplantation als auch bei der Transplantation solider Organe vor. Die Transplantations-assoziierte Alloimmunthrombozytopenie kann entweder durch eine Immunisierung des Patienten gegen das Transplantat [40], oder einen

bereits gegen thrombozytäre Antigene immunisierten Knochenmark- [41] bzw. Organspender [42] bedingt sein.

### 1.3.3. *Refraktärzustand gegenüber Thrombozytentransfusionen*

Eine gewisse Sonderstellung bei den Alloimmunthrombozytopenien nimmt der Refraktärzustand gegenüber Thrombozytentransfusionen ein. Hier kann eine Immunisierung gegen thrombozytäre Antigene zu erfolglosen Thrombozytentransfusionen führen. In Wirklichkeit jedoch ist diese Refraktärität meistens auf die klinische Gesamtsituation des Patienten (z.B. Fieber oder Blutungen) und seltener auf eine Immunisierung zurückzuführen. Vor der Einführung der Leukozytendepletion von Blutprodukten ließen sich nur bei ca. 45 % der Patienten, die regelmäßig zelluläre Bluttransfusionen erhielten, thrombozytenreaktive Antikörper nachweisen [43]. In ca. 43 % der Fälle konnten Antikörper gegen HLA-Klasse I-Antigene nachgewiesen werden und in nur 8 % dieser Fälle gegen thrombozytenspezifische Alloantigene. Neuere Daten zeigen, dass das Immunisierungsrisiko durch Einführung der Leukozytendepletion deutlich abgenommen hat [44].

## 1.4. Testsysteme zum Nachweis von Antikörpern gegen Thrombozyten

### 1.4.1. *Antikörperbindungstests*

Die ältesten Methoden zum Nachweis von Antikörpern gegen Thrombozyten, beruhen auf der Bestimmung von Antikörpern auf intakten Thrombozyten. Der erste hierzu verwendete Test ist der Komplement Fixations Test [45, 46]. Da dieser Test nur Komplement-aktivierende Antikörper nachweist und auch nur eine geringe Sensitivität aufweist, spielt er in der modernen Diagnostik thrombozytenreaktiver

Antikörper keine Rolle mehr. Heute ist der Plättchenimmunfluoreszenztest [47, 48] weit verbreitet. Bei diesem Testsystem handelt es sich um einen Antiglobulintest, der fluoreszenz-markierte anti-human-Antikörper verwendet. Alternativ lassen sich auch Enzym- [49] oder radioaktiv- [50] markierte Sekundärantikörper verwenden. In neuerer Zeit wird auch zunehmend die Durchflusszytometrie zum Nachweis von Antikörpern gegen Thrombozyten eingesetzt [51, 52]. Alle oben beschriebenen Testsysteme sind mit wesentlichen Nachteilen verbunden. Es ist mit ihnen nicht möglich, thrombozytenspezifische Antikörper von HLA-Antikörpern zu differenzieren. Somit lässt sich die Spezifität der Antikörper nicht immer aufklären, und die Auswahl antigen-kompatibler Thrombozytenkonzentrate zur Transfusion ist praktisch nicht möglich.

Die Sensitivität der beschriebenen Testsysteme hinsichtlich des Nachweises thrombozytärer Autoantikörper ist sehr hoch, die Spezifität ist jedoch äußerst gering. Dies liegt vor allem daran, dass diese Tests sowohl unspezifisch an die Thrombozytenmembran angelagerte als auch an thrombozytäre Fc-Rezeptoren gebundene IgG-Moleküle (sog. Plättchen-assoziiertes IgG, Pa-IgG) detektieren können. Gerade bei Patienten mit nicht-immunologischer Thrombozytopenie lässt sich ein erhöhtes Pa-IgG nachweisen [53, 54]. Für den Nachweis Medikament-abhängiger Antikörper gegen Thrombozyten spielen diese Testsysteme nach wie vor eine große Rolle [55].

#### *1.4.2. Glykoprotein-spezifische Tests*

Erst durch die Einführung Glykoprotein-spezifischer Testverfahren konnten thrombozytäre Antikörper Antigen-spezifisch nachgewiesen werden. Zunächst

wurden Immunoblotting- und Radioimmunopräzipitationstests verwendet [56-58]. Die Durchführung dieser Testsysteme ist an die Durchführung einer Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE) gebunden. Daher sind sie technisch nicht nur sehr komplex und zeitaufwendig, sondern es können auch nur Antikörper gegen Antigene nachgewiesen werden, deren korrespondierendes Antigen durch die Behandlung mit SDS nicht denaturiert wird. Die Einführung des Immunobead Assays [59] und des Monoclonal antibody-specific immobilisation of platelet antigens (MAIPA) Assays [60, 61] erlaubte es schließlich ein Glykoprotein-spezifisches Testsystem für die Routinediagnostik einzusetzen. Bei diesem Testsystem werden die autologen Thrombozyten des Patienten bzw. Thrombozyten bekannter Spender, die zuvor mit Patientenserum inkubiert wurden, mit einem monoklonalen Mausantikörper inkubiert, der spezifisch an Regionen der zu untersuchenden Glykoproteine bindet. Nach Lyse der Thrombozyten werden die Glykoproteine über die monoklonalen Mausantikörper an eine mit polyklonalen Ziege-anti-Maus IgG Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte immobilisiert. Als Detektionsantikörper wird ein enzymmarkierter (Peroxidase) Ziege-anti-Human IgG Antikörper eingesetzt, welcher in einer chromogenen Enzym-Substrat Reaktion den Nachweis der gebundenen Humanantikörper ermöglicht. Die Spezifität des MAIPAs beim Nachweis antithrombozytärer Autoantikörper wird mit bis zu 95% angegeben [54, 62]. Verglichen mit den oben beschriebenen Testsystemen liegt die Sensitivität des MAIPA beim Nachweis von Autoantikörpern nur zwischen 50 und 70 % [54]. Ein wesentlicher Grund hierfür ist, dass nur Antikörper nachgewiesen werden können, wenn für das korrespondierende Antigen auch die entsprechenden monoklonalen Antikörper verfügbar sind. Darüber hinaus haben ITP-Patienten eine deutliche verminderte Thrombozytenzahl, so dass überhaupt nur wenige Glykoproteine auf eine Beladung mit Autoantikörpern untersucht werden können. Da hierfür je

Glykoprotein mindestens  $20 \times 10^6$  autologe Thrombozyten benötigt werden, ist es nötig, dem Patienten Blutproben mit einem Volumen von mindestens 40 – 50 ml Vollblut zu entnehmen.

Neben der großen Thrombozytenmenge für eine adäquate Autoantikörperdiagnostik ist der MAIPA sehr personal- und zeitaufwendig. Somit ist eine rasche und zeitnahe Untersuchung auf thrombozytäre Antikörper, insbesondere auf Medikament-abhängige Antikörper unmöglich. Zusätzlich wird dieser Test bisher nur in wenigen spezialisierten Laboren angeboten, was die Verfügbarkeit einer thrombozytären Antikörperdiagnostik gerade für periphere Kliniken deutlich einschränkt.

Vor kurzem wurde der Simultaneous analysis of platelet-specific antibodies (SASPA) assay zum Glykoprotein-spezifischen Nachweis von thrombozytenreaktiven Antikörpern beschrieben [63]. Dieser durchflusszytometrische Test verwendet Partikel mit unterschiedlicher Fluoreszenzintensität, welche mit monoklonalen Antikörpern gegen Mausimmunglobuline beladen sind. Hierdurch ist es möglich, simultan Antikörper gegen die verschiedenen thrombozytären Antigene nachzuweisen. Allerdings benötigt der SASPA viel Erfahrung in der Durchflusszytometrie und einen hohen apparativen Aufwand. Hinsichtlich Sensitivität und Spezifität ist der SASPA dem MAIPA vergleichbar.

#### 1.5. Typisierung thrombozytärer Alloantigene

Um Alloimmunthrombozytopenien (siehe 1.1.) korrekt behandeln zu können, ist es nicht nur erforderlich, die ursächlichen Antikörper zu erkennen, sondern auch die thrombozytären Alloantigene der Patienten und u.U. der Thrombozytenspender

zu bestimmen. Grundsätzlich können die oben beschriebenen Techniken zum Nachweis thrombozytenreaktiver Antikörper (siehe 1.4.) auch für die Alloantigentypisierung eingesetzt werden. Allerdings ist die Anwendung zur Antigenbestimmung an die Verfügbarkeit entsprechender Typisierungs-Seren gebunden. Darüber hinaus enthalten diese Seren nicht selten auch Antikörper gegen HLA-Klasse I-Antigene, so dass die Anwendung von Techniken, die mit intakten Thrombozyten arbeiten, z.B. der Plättchenimmunfluoreszenztest (PIFT) [47, 48], nicht in Frage kommt. Die Anwendung des MAIPA [60, 61] wiederum bedarf eines hohen technischen und personellen Aufwands, so dass zum einen die Ergebnisse nach frühestens einem Tag vorliegen und der Test zum anderen nicht immer zur Verfügung steht. Die Verwendung monoklonaler Typisierungs-Seren würde eine Phänotypisierung mittels eines einfachen Tests, wie des PIFT, zwar ermöglichen, doch stehen solche Antikörper derzeit nicht kommerziell zur Verfügung.

Aus den o.g. Gründen ist die Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung Sequenz-spezifischer Primer derzeit wohl die am weitesten verbreitete Methode für die Typisierung thrombozytärer Alloantigene [64, 65]. Da für die Darstellung der PCR-Produkte verschiedene Techniken, wie Gel-Elektrophorese, Ethidiumbromid-Färbung und UV-Photographie erforderlich sind, ist auch diese Technik in der Regel auf spezialisierte Labore beschränkt. Neue PCR-Methoden wie die LightCycler-Technik [66, 67] oder die TaqMan Technik [65] benötigen für die Ergebnisdarstellung zwar keine weitere Bearbeitung der Proben, die erforderlichen Geräte sind jedoch sehr teuer und stehen daher meist auch nur in Referenzlaboren zur Verfügung.



## 1.6. Heparin-induzierte Thrombozytopenie

Eine Sonderform der immunologisch bedingten Thrombozytopenien stellt die Heparin-induzierte Thrombozytopenie Typ II (HIT II) dar. Bei ca. 3 % der Patienten, die mit unfraktionierten Heparinen behandelt werden, kommt es zwischen dem 5. und 14. Tag der Heparinisierung zu einem abrupten Abfall ( $\geq 50\%$ ) der Thrombozyten. Bei diesen Patienten kommt es aber nicht zu Blutungsereignissen, sondern sie entwickeln häufig thromboembolische Komplikationen [68].

Das korrespondierende Antigen bei der HIT II ist der Plättchenfaktor 4 (PF4). Dieser ist positiv geladen und hat daher eine hohe Affinität zum Heparin, welches auf Grund seiner Sulfatierung sehr stark negativ geladen ist. Bei einer Heparinisierung wird PF4 aus seiner physiologischen Bindung mit Heparansulfat gelöst und geht eine Bindung mit Heparin ein. Bei einer festen stöchiometrischen Konzentration (27 IU Heparin und 1 mg PF4) bilden sich multimolekulare Komplexe aus Heparin und PF4 (H-PF4). Durch diese Komplexbildung werden Neoantigene des PF4-Moleküls freigesetzt [69-72], die zur Immunisierung bzw. zur Antikörperbildung führen können (Abbildung 5.1).

Die Heparin/PF4/Antikörper-Komplexe binden mit dem Fc-Stück der Antikörper an die Fc-gamma IIA Rezeptoren der Thrombozyten [73, 74] und führen zur Thrombozytenaktivierung und damit auch zu einer weiteren Freisetzung von PF4 [75] und erneut zur Bildung weiterer Heparin/PF4/Antikörper-Komplexe. Durch die Thrombozytenaktivierung kommt es zur Bildung von prokoagulatorischen Mikropartikeln [76, 77] und zur Thrombinbildung [68]. Die Thrombinbildung wird schließlich durch die thrombozytären Mikropartikel, die Aktivierung der plasmatischen Gerinnungskaskade, der Alteration von Endothelzellen [78] und die Aktivierung von Monozyten verstärkt [79]. Durch diese komplexe Aktivierung des Gerinnungssystems

gerät der Patient in einen prokoagulatorischen Zustand, der schließlich zur Bildung thromboembolischer Komplikationen führen kann.

Für den Nachweis Heparin-induzierter Antikörper stehen grundsätzlich zwei verschiedene Testprinzipien zur Verfügung: Die so genannten funktionellen Tests und die Immunoassays.

Bei den funktionellen Tests erfolgt der Nachweis der Antikörper über die in vitro Aktivierung von gewaschenen Testthrombozyten durch das verdächtige Serum in Anwesenheit von Heparin. Der  $^{14}\text{C}$ -Serotonin-Freisetzungstest ( $^{14}\text{C}$ -SRA) stellt hinsichtlich Sensitivität und Spezifität hier den Goldstandard dar [80]. Da dieser Test an die Verwendung radioaktiven Serotonins gebunden und technisch sehr kompliziert ist, kommt ihm in der Routinediagnostik der HIT II praktisch keine Bedeutung zu. Inzwischen werden neue Tests, wie der Plättchen-Aggregationstest (PAT) [81] und der Heparin-induzierte Plättchen-Aktivierungstest (HIPA) [82] verwendet. Allerdings sind diese funktionellen Testsysteme in ihrer Durchführung sehr anspruchsvoll und werden daher nur in wenigen Speziallaboren eingesetzt.

Die Immunoassays weisen IgG, IgM und IgA Antikörper gegen Heparin-PF4-Komplexe [83] bzw. Polyvinylsulfonat-PF4-Komplexe [84] nach, die auf dem Boden von Mikrotiterplatten gebunden sind. Diese Tests sind kommerziell erhältlich und daher weit verbreitet. Sie erlauben die Bearbeitung einer großen Anzahl von Blutproben, sind aber für die Untersuchung einzelner Proben nicht geeignet.

## **2. ZIELSTELLUNG**

Das Ziel dieses Projektes war es, ein universell einsetzbares Testsystem zu entwickeln, welches es erlaubt, thrombozytäre Antikörper einfach und schnell nachzuweisen. Hierzu sollte die schnelle und einfache Agglutinationstechnik verwendet werden. Diese Technik wird seit mehr als 100 Jahren in der Blutgruppenserologie erfolgreich zum Nachweis erythrozytärer Antikörper eingesetzt. Die Methode ist sehr einfach, schnell durchführbar und zeichnet sich sowohl durch eine hohe Sensitivität als auch eine hohe Spezifität aus. Da die Thrombozyten farblos und relativ klein sind und spontan agglutinieren, ist die Agglutinationstechnik für den Nachweis thrombozytärer Antikörper nicht geeignet. Daher sollten die klinisch relevanten Antigene an Erythrozyten bzw. synthetische Partikel gekoppelt werden, um eine spezifische Agglutination durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion zu ermöglichen. Für den Nachweis von thrombozytenreaktiven Antikörpern ist es dann nur noch erforderlich, die mit den verschiedenen Glykoproteinen beschichteten Partikel einfach mit dem zu untersuchenden Serum zu inkubieren. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Methoden zum Nachweis thrombozytenreaktiver Antikörper sollte das neue Testsystem deutlich weniger arbeits- und zeitaufwendig sein, so dass das Resultat innerhalb kurzer Zeit zur Verfügung stehen kann.

### 3. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

#### 3.1. Nachweis Heparin-induzierter Antikörper gegen Thrombozyten im Partikel-Gel-Immunoassay (ID-HPF4)

*Meyer O, Salama A, Pittet N, Schwind P: Rapid detection of heparin-induced platelet antibodies with particle gel immunoassay (ID-HPF4). Lancet. 1999;354: 1525-6.*

Um den Nachweis Heparin-induzierter thrombozytenreaktiver Antikörper zu vereinfachen, wurden rote Polystyrenpartikel, an die Heparin/Plättchenfaktor 4-Komplexe gekoppelt (ID-HPF4) waren, und die Gel-Agglutinationstechnik verwendet [85-87]. Für die Testdurchführung wurden 50 µl der gebrauchsfertigen Partikel-Suspension mit 10 µl Patientenserum für 5 Minuten bei Raumtemperatur in der Reaktionskammer einer ID-Gelkarte inkubiert. Anschließend wurde die Gelkarte für 10 Minuten bei 85 x g in einer ID-Zentrifuge zentrifugiert. Die Bindung von Antikörpern gegen Heparin/Plättchenfaktor 4-Komplexe an die verwendeten Partikel führte in Anwesenheit eines Sekundärantikörpers gegen humane Immunglobuline in der Gel-Matrix (IgG, IgM und IgA) zu einer Agglutination der Partikel (Abbildung 5.2).

Zunächst wurden 135 Serumproben von Patienten mit klinischem Verdacht auf eine Heparin-induzierte Thrombozytopenie Typ II mit dem oben beschriebenen ID-HPF4 und parallel dazu im Heparin-induzierten Plättchenaktivierungstest (HIPA) [82] und einem kommerziell erhältlichen Heparin/Plättchenfaktor 4-ELISA (Asserachrom HPIA, Diagnostica Stago, Asnières, Frankreich) [83] untersucht.

Von den 135 Serumproben reagierten 116 (86 %) übereinstimmend im ID-HPF4 und im Asserachrom HPIA, 93 (69 %) stimmten im ID-HPF4 und im HIPA überein, aber nur 88 (65 %) Proben führten im Asserachrom HPIA und im HIPA zu übereinstimmenden Ergebnissen (Tabelle 4.2). Im HIPA reagierten 26 Proben unspezifisch, d.h., es kam zu Heparin-unabhängigen Thrombozytenaktivierungen. Dies erklärt möglicherweise die geringe Übereinstimmung von ID-HPF4/ELISA und

HIPA.

Von insgesamt 56 der 135 untersuchten Patienten lagen verwertbare klinische Informationen vor. Bei 12 dieser 56 Patienten kam es unter der Heparin-Therapie zu einem abrupten Abfall der Thrombozyten um > 50 % und/oder thromboembolischen Komplikationen. Bei acht dieser Patienten reagierten alle drei untersuchten Tests positiv. Bei einem Patienten reagierte der HIPA unspezifisch, der ELISA und der ID-HPF4 waren dagegen eindeutig positiv. Bei zwei weiteren Patienten reagierte lediglich der HIPA positiv und bei einem Patienten reagierten alle Tests negativ. Unklar ist, ob die beiden Proben, die ausschließlich im HIPA positiv reagierten, Antikörper enthielten, die gegen andere Antigene als Heparin/Plättchenfaktor 4 gerichtet waren. In Frage kommende Antigene sind z.B. Interleukin-8 oder das Neutrophilen-aktivierende Protein 2 (NAP-2), welche eine große Homologie zu Plättchenfaktor 4 aufweisen [88].

Mittlerweile ist der ID-HPF4 weit verbreitet [89-92] und stellt ein Standardwerkzeug bei der Diagnostik der HIT II dar.

Siehe:

Meyer O, Salama A, Pittet N, Schwind P: Rapid detection of heparin-induced platelet antibodies with particle gel immunoassay (ID-HPF4). *Lancet*. 1999;**354**: 1525-6.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10551503](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10551503)



### 3.2. Nachweis thrombozytärer Auto- und Alloantikörper

#### 3.2.1. *Antigen-spezifischer Partikel-Agglutinationstest (ASPA)*

*Meyer O, Agaylan A, Borchert HH, Aslan T, Bombard S, Kiesewetter H, Salama A: A simple and practical assay for the antigen-specific detection of platelet antibodies. Transfusion. 2006;46: 1226-31.*

Ähnlich wie beim ID-HPF4 (siehe 3.1) sollte ein Testsystem zum schnellen und einfachen Nachweis thrombozytenreaktiver Auto- und Alloantikörper entwickelt werden. Um dies zu ermöglichen, war es erforderlich, thrombozytäre Glykoproteinkomplexe an Partikel zu binden. Da gerade thrombozytenreaktive Autoantikörper selten frei im Serum, sondern hauptsächlich auf den autologen Thrombozyten der Patienten nachweisbar sind [59, 93], musste das Testsystem gewährleisten, sowohl freie als auch gebundene Antikörper nachweisen zu können. Aus diesem Grund wurden monoklonale Antikörper, die gegen die thrombozytären Glykoproteinkomplexe GPIIb-IIIa, GPIb-IX und GPIa-IIa gerichtet sind, an rote Polystyrenpartikel gekoppelt (Tabelle 4.3). Die monoklonalen Antikörper P2 und SZ1 wurden kovalent an Aldehyd-Partikel gekoppelt [94, 95], während der monoklonale Antikörper AK7 mit Sulfo-NHS-Biotin gemäß der Arbeitsvorschrift des Herstellers biotinyliert (Perbio Science, Bonn) und dann an Streptavidin-Partikel gekoppelt wurde. Nach der Kopplung wurden die Partikel in einer Konzentration von 0,0075 w/v in einem Partikelpuffer, der Proteine und nicht-ionische Detergenzien enthält, (DiaMed Cressier s/Morat, Schweiz) resuspendiert und gelagert.

Für den Nachweis gebundener Autoantikörper wurden Patiententhrombozyten aus EDTA-antikoaguliertem Vollblut mittels Differentialzentrifugation isoliert und solubilisiert. Anschließend wurden 40 µl des Solubilisats mit 50 µl Partikelsuspension für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, einmal mit Partikelpuffer gewaschen und in 50 µl Partikelpuffer resuspendiert. Zum



Nachweis freier Antikörper im Serum wurden Thrombozyten gesunder, HPA- und HLA-typisierter Blutspender wie oben beschrieben isoliert. Anschließend wurden die Thrombozyten 30 Minuten bei 37°C mit Patientenserum inkubiert und danach gewaschen. Diese Thrombozyten wurden dann solubilisiert und mit Partikeln inkubiert.

Die so hergestellte Partikel-Suspension wurde dann in die Reaktionskammer einer ID-Gelkarte pipettiert, deren Gel ein anti-human IgG (Dianova, Hamburg) enthielt. Anschließend wurden die Gelkarten für 10 Minuten bei 85 x g zentrifugiert und danach konnten die Partikel-Agglutinationen makroskopisch beurteilt werden (Abbildung 5.3). Alle Serumproben und Thrombozytenpräparationen wurden auch parallel im MAIPA untersucht. Im Gegensatz zum ASPA wurden im MAIPA die monoklonalen Antikörper FMC-25 zum Nachweis von Antikörpern gegen GPIb-IX und Gi9 zum Nachweis von Antikörpern gegen GPIa-IIa verwendet (Tabelle 4.3).

Um die Sensitivität des ASPA zu evaluieren, wurden die Partikel mit WHO-Referenzreagenzien des National Institute for Biological Standards and Controls Bristol, Großbritannien (NIBSC) zum Nachweis von Antikörpern gegen HPA-1a (human antibody against HPA-1a, NIBSC code 93/710) und HPA-5b (human antibody against HPA-5b, NIBSC code 99/666) untersucht. Beide Referenzproben reagierten sowohl im Partikel-Agglutinationstest als auch im MAIPA spezifisch positiv. Darüber hinaus reagierten Serumproben gesunder Blutspender (n=100) in beiden Testsystemen eindeutig negativ.

Von acht Patienten mit klinisch nachgewiesener ITP wurden Thrombozytenpräparationen parallel im ASPA und im MAIPA auf eine Beladung mit Autoantikörpern untersucht. Bei sechs Patienten waren die Ergebnisse des ASPA

und des MAIPA übereinstimmend. Bei zwei Patienten konnten im ASPA zwar Autoantikörper gegen GPIIb-IIIa und GPIb-IX nachgewiesen werden, nicht aber die Autoantikörper gegen GPIa-IIa, welche im MAIPA nachweisbar waren (Tabelle 4.4).

Insgesamt wurden 33 Blutproben von Patienten mit klinisch nachgewiesener ITP auf freie thrombozytenreaktive Autoantikörper untersucht. In 21 Fällen waren die Ergebnisse des MAIPA und des ASPA komplett übereinstimmend. In acht Fällen konnten im ASPA zusätzliche Antikörper nachgewiesen werden, die im MAIPA nicht nachweisbar waren (1 GPIIb-IIIa und GPIb-IX, 1 GPIIb-IIIa und GPIa-IIa, 1 GPIIb-IIIa, 3 GPIb-IX, 2 GPIa-IIa). In drei Fällen konnten nur im ASPA freie Autoantikörper gegen Thrombozyten nachgewiesen werden. In vier Fällen konnten im MAIPA Autoantikörper nachgewiesen werden, die im ASPA nicht nachweisbar waren. Allerdings waren in drei dieser Fälle im ASPA Autoantikörper gegen andere Glykoproteinkomplexe nachweisbar (Tabelle 4.5).

Weiterhin wurden neun Blutproben, die Alloantikörper (4 anti-HPA-1a und 5 anti-HPA-5b) enthielten, im ASPA untersucht. Alle diese Alloantikörper waren im ASPA eindeutig nachweisbar (Tabelle 4.6). Die Verwendung des Klon AK-7 zum Nachweis von Antikörpern gegen GPIa-IIa bzw. HPA-5b erbrachte darüber hinaus keine Unterschiede zu den Ergebnissen des MAIPA.

Bei der Untersuchung von Blutproben von Patienten mit nachgewiesener ITP konnte gezeigt werden, dass es mit dem ASPA möglich ist, thrombozytenreaktive Autoantikörper, seien sie frei oder gebunden, zuverlässig nachzuweisen. In einigen Fällen waren die Ergebnisse des ASPA und des MAIPA diskrepant. Dies liegt möglicherweise an den intensiven Waschschritten, die für den MAIPA erforderlich sind und die u.U. zu einer verminderten Sensitivität führen können. Es kann auch

ausgeschlossen werden, dass es zu Kompetitionen zwischen den verwendeten monoklonalen Antikörpern und den Auto- bzw. Alloantikörpern kommt. Darüber hinaus erfolgt die Inkubation mit monoklonalen Antikörpern im MAIPA an intakten Thrombozyten, während im ASPA die bereits solubilisierten Thrombozyten mit den Antikörper-beladenen Partikeln inkubiert werden.

Insgesamt erscheint die Spezifität des ASPA beim Nachweis von thrombozytenreaktiven Autoantikörpern der des MAIPA vergleichbar zu sein, während die Sensitivität des ASPA etwas höher zu sein scheint als die des MAIPA. Neben dem Nachweis von thrombozytenreaktiven Autoantikörpern erlaubt der ASPA auch den Nachweis von anti-thrombozytären Alloantikörpern. Der ASPA ist sehr viel einfacher und schneller durchzuführen als der MAIPA. Der Test erlaubt sowohl die Untersuchung einzelner Proben als auch die Bearbeitung großer Probenmengen.

Inzwischen wurde die ASPA Technik auch für den Nachweis von Antikörpern gegen die erythrozytären Antigene Lutheran B und JMh [96, 97] und gegen das thrombozytäre Alloantigen HPA-1a [98] eingesetzt.

Siehe:

Meyer O, Agaylan A, Borchert HH, Aslan T, Bombard S, Kiesewetter H, Salama A: A simple and practical assay for the antigen-specific detection of platelet antibodies. *Transfusion*. 2006;**46**: 1226-31.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16836571](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16836571)













### 3.2.2. Antigen-spezifischer Capture Test (ASCA)

*Meyer O, Agaylan A, Bombard S, Kiesewetter H, Salama A: A novel antigen-specific capture assay for the detection of platelet antibodies and HPA-1a phenotyping. Vox Sang. 2006;91: 324-30.*

Mit dem ASPA (siehe 3.2.1) konnte gezeigt werden, dass sich die Partikel-Agglutinationstechnik zum Nachweis von Antikörpern gegen Thrombozyten eignet. Die Technik ist schnell und einfach durchführbar und erlaubt einen Antikörpernachweis auch in weniger spezialisierten Laboren. Allerdings ist die Sensitivität des ASPA nicht wesentlich höher als die des MAIPA, welche in der Literatur zwischen 50 und 70 % angegeben wird [54]. Um die Sensitivität des Testsystems zu erhöhen, wurden für den Antigen-spezifischen Capture Test (ASCA) die Polystyrenpartikel durch superparamagnetische Partikel ersetzt. Dies erlaubte es, freie Autoantikörper aus großen Serummengen anzureichern.

Thrombozyten von gesunden, HLA- und HPA-typisierten Blutspendern wurden mit biotinylierten (Sulfo-NHS Biotin, Perbio Science, Bonn) monoklonalen Antikörpern gegen die thrombozytären Glykoproteinkomplexe GPIIb-IIIa (Klon P2) GPIb-IX (Klon FMC-25) und GPIa-IIa (Klon AK-7, Tabelle 4.3) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert, gewaschen und anschließend solubilisiert. Danach wurden 50 µl des Solubilisats für 30 Minuten bei 37°C mit 10 µl superparamagnetischen Streptavidin-Partikeln (Dynabeads M-280 Streptavidin, Invitrogen GmbH Karlsruhe) inkubiert, zweimal mit Partikelpuffer (DiaMed Cressier s/Morat, Schweiz) gewaschen, in 50 µl Partikelpuffer resuspendiert und dann für 30 Minuten bei 37°C mit verschiedenen Volumina Serum in Glasröhrchen in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Glasröhrchen in einen Magneten gestellt (Magnetic Particle Concentrator, MPC, Invitrogen GmbH Karlsruhe), das Serum vorsichtig aspiriert und die Partikel zweimal mit Partikelpuffer gewaschen. Nach dem Waschen wurden die

Partikel in 50 µl Partikelpuffer resuspendiert und dann in die Reaktionskammer einer ID-Gelkarte pipettiert, deren Gel ein anti-human IgG enthielt (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, Großbritannien). Nach dem Zentrifugieren (10 Minuten bei 85 x g) konnten die Partikel-Agglutinationen makroskopisch beurteilt werden.

Um die Sensitivität des ASCA zu untersuchen, wurden Serumproben von Patienten, die Autoantikörper gegen GPIIb-IIIa, GPIb-IX und GPIa-IIa enthielten, sowie ein Serum, das Alloantikörper gegen HPA-1a enthielt in Serum gesunder Blutspender verdünnt, bis sie im MAIPA nicht mehr nachweisbar waren. Anschließend wurden ansteigende Volumina (20 µl bis 3000 µl) dieser Verdünnungen wie oben beschrieben mit den Partikeln inkubiert. Bei dieser Untersuchung zeigte sich, dass mit zwei Milliliter Serum die Antikörper am besten nachweisbar waren (Abbildung 5.4).

Um die Spezifität des Testsystems zu evaluieren, wurden Serumproben von insgesamt 70 gesunden Blutspendern untersucht. Darüber hinaus wurden Serumproben untersucht, die genau charakterisierte Alloantikörper gegen HPA-1a, HPA-2b, HPA-3a und HPA-5b enthielten. Auf Grund der starken Reaktivität der Alloantikörper, wurden diese Serumproben in einem Volumen von 20 µl untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Serumproben von den gesunden Blutspendern im ASCA eindeutig negativ reagierten, während die Serumproben, die Alloantikörper enthielten, ausnahmslos spezifisch positiv reagierten, also nur mit solchen Testthrombozyten reagierten, die das korrespondierende Antigen trugen (Tabelle 4.7). Es fiel allerdings auf, dass Auto- und Alloantikörper gegen GPIa-IIa bzw. HPA-5b bei Verwendung des monoklonalen Antikörpers Gi9 nur sehr schwache Reaktivitäten zeigten. Daher wurden die gleichen Versuche mit dem Klon AK-7 durchgeführt. Unter Verwendung dieses Klons konnten eindeutig spezifisch positive

Agglutinationen beobachtet werden. Aus diesem Grunde wurden alle weiteren Untersuchungen mit diesem Klon durchgeführt. Möglicherweise ist diese Beobachtung darauf zurückzuführen, dass die Antigenbindungsstelle des monoklonalen Antikörpers Gi9 durch die Biotinylierung inaktiviert wird [99]. Da der Klon Gi9 im MAIPA den Nachweis von Antikörpern gegen GPIa-IIa problemlos erlaubt, erscheint es unwahrscheinlich, dass es zu einer Competition zwischen Auto- bzw. Alloantikörper und monoklonalem Antikörper im ASCA kommt.

Insgesamt wurden Serumproben von 39 Patienten mit klinisch nachgewiesener ITP im ASCA und parallel dazu im MAIPA untersucht. Von 28 dieser Patienten konnten ausreichend Thrombozyten gewonnen werden, um diese im MAIPA auch auf Thrombozyten-gebundene Autoantikörper zu untersuchen. Bei 14 (50 %) dieser Patienten waren solche gebundenen Autoantikörper nachweisbar. In insgesamt nur sieben Fällen (18 %) waren im MAIPA freie Autoantikörper nachweisbar. Dagegen waren im ASCA in insgesamt 77 % der Seren Autoantikörper nachweisbar. Bei vier Patienten waren im MAIPA Autoantikörper nachweisbar, die im ASCA nicht nachweisbar waren. Allerdings konnten bei diesen Patienten im ASCA Autoantikörper gegen andere Glykoproteinkomplexe nachgewiesen werden. Bei insgesamt neun Patienten waren weder im MAIPA, noch im ASCA Autoantikörper nachweisbar. Selbst wenn bei diesen Proben die Serummenge auf 5 ml gesteigert wurde, konnte damit kein positives Resultat im ASCA gezeigt werden (Tabelle 4.8).

Der ASCA hat gegenüber den bisher zur Verfügung stehenden Methoden zum Glykoprotein-spezifischen Nachweis von Autoantikörpern wesentliche Vorteile. Die Sensitivität des Tests ist mit 77 % deutlich höher als die des MAIPA bzw. anderer vergleichbarer Methoden. Weiterhin ist der Test sehr viel einfacher durchzuführen und, da der Antikörpernachweis ausschließlich im Serum durchgeführt wird, völlig

unabhängig von der Thrombozytenzahl der zu untersuchenden Patienten.

Durch den Einsatz dieser Technik konnte die Sensitivität des Nachweises von Autoantikörpern gegen das Tumorsuppressorprotein p53 im Vergleich zu den Standardverfahren deutlich gesteigert werden [100].

Siehe:

Meyer O, Agaylan A, Bombard S, Kiesewetter H, Salama A: A novel antigen-specific capture assay for the detection of platelet antibodies and HPA-1a phenotyping. *Vox Sang.* 2006;**91**: 324-30.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17105608](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17105608)













### 3.3. Typisierung von Alloantigenen

#### 3.3.1. *Genotypisierung thrombozytärer Alloantigene*

*Meyer O, Abou-Chaker K, Heymann G, Bombard S, Kieseewetter H, Salama A: Human platelet antigen genotyping by using sequence-specific primers and the particle gel agglutination assay. Vox Sang. 2005;88: 271-4.*

Da bei der Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung Sequenz-spezifischer Primer (PCR-SSP) für die Ergebnisdarstellung weitere post-PCR Bearbeitungsschritte (Ethidiumbromid-Färbung, Elektrophorese, UV-Photographie) erforderlich sind, die nicht in allen Laboren verfügbar sind, wurde ein Partikel-Agglutinationstest zur Visualisierung von PCR-Produkten entwickelt.

Für die PCR-SSP wurden Sequenz-spezifische Primer verwendet, die die Genotypisierung der Alloantigensysteme HPA-1, -2, -3, -4, -5, -6 und -15 erlauben (Tabelle 3.12.). Diese Primer waren an ihrem 5'-Ende biotinyliert (TIB-Molbiol, Berlin). Als interne Kontrolle wurden Primer verwendet, die ein Fragment des humanen Wachstumshormons amplifizieren (Tabelle 3.12.). Diese Primer waren an ihrem 5'-Ende FITC-markiert (TIB-Molbiol, Berlin).

Die PCR wurde in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. Die Primermixe für ein Antigen enthielten jeweils 20 pmol des entsprechenden Sequenz-spezifischen und des Antisense-Primers, sowie 10 pmol des internen Kontroll-Primers. Die übrigen Komponenten des Primermixes waren 200 µM jedes dNTPs, 1,25 U AmpliTaq Gold, PCR-Puffer (alle Applied Biosystems, Darmstadt) und 250 ng DNA, die aus EDTA-antikoaguliertem Vollblut mit Hilfe magnetischer Partikel automatisiert isoliert wurde (GenoPrep, Wien, Österreich). Für die Typisierung von HPA-5 und HPA-15 wurden 30 pmol der Sequenz-spezifischen Primer und 3mM MgCl<sub>2</sub> verwendet. Die PCR erfolgte in drei Schritten in einem Thermocycler vom Typ GeneAmp PCR-System 9700 (Applied Biosystems, Darmstadt). Nach einer initialen

Denaturierung (10 Minuten, 95°C) erfolgten 10 Zyklen bestehend aus Denaturierung (30 Sekunden, 95°C), Annealing (60 Sekunden, 65°C) und Extension (30 Sekunden, 72°C). Darauf folgten 22 Zyklen bestehend aus Denaturierung (30 Sekunden, 95°C), Annealing (50 Sekunden, 61°C) und Extension (30 Sekunden, 72°C).

Für die Visualisierung der PCR-Produkte der Sequenz-spezifischen Primer wurden jeweils 20 µl der PCR-Produkte mit 5 µl Streptavidin-Partikeln (Dynabeads M-280 Streptavidin, Invitrogen GmbH Karlsruhe) in die Reaktionskammer einer neutralen ID-Gelkarte (DiaMed AG, Cressier s/Morat) pipettiert. Für die Visualisierung der PCR-Produkte der internen Kontroll-Primer wurden 20 µl der PCR-Produkte zusammen mit Carboxyl-Partikeln (Dynabeads M-270 Carboxylic acid, Invitrogen GmbH Karlsruhe), die über eine Carbodiimid vermittelte Amin-Bindung mit einem Antikörper gegen FITC (Dianova, Hamburg) gekoppelt waren [101, 102], in einer weiteren Reaktionskammer der ID-Gelkarte inkubiert. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei 37°C wurden die ID-Gelkarten für 10 Minuten bei 85 x g zentrifugiert. Die Amplifikation eines HPA-Antigens bzw. des internen Kontroll-Primers führte zu einer Agglutination der Partikel, die makroskopisch beurteilt werden konnte (Abbildung 4.5).

Insgesamt wurden 104 Blutproben von gesunden Blutspendern mit der o.g. Methode HPA-typisiert. Die Ergebnisse des Partikel-Agglutinationstestes wurde mit einer Standard PCR-SSP überprüft [64], die um die Sequenz-spezifischen Primer für HPA-15 ergänzt wurde. Die Ergebnisse der Partikel-Agglutinationsmethode und der Standard PCR-SSP waren in allen Fällen übereinstimmend (Tabelle 3.13.). Darüber hinaus reagierte die interne Kontrolle in allen Ansätzen positiv.

Im Vergleich zur Visualisierung der PCR-Produkte über Elektrophorese und

UV-Photographie war die Partikel-Agglutinationsmethode sehr viel einfacher und schneller durchzuführen. Darüber hinaus konnte auf toxische Substanzen wie Ethidiumbromid verzichtet werden. Insgesamt bietet die Partikel-Agglutinationsmethode die Möglichkeit, eine PCR-SSP durchzuführen ohne dafür eine teure Laborausstattung anschaffen zu müssen. In neueren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass sich die Methode auch als „Check Gel Assay“ eignet [103].

Siehe:

Meyer O, Abou-Chaker K, Heymann G, Bombard S, Kiesewetter H, Salama A: Human platelet antigen genotyping by using sequence-specific primers and the particle gel agglutination assay. *Vox Sang.* 2005;**88**: 271-4.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15877649](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15877649)









### 3.3.2. *Phänotypisierung des thrombozytären Alloantigens HPA-1a sowie der HLA-Antigene HLA-A2, -B7 und B27*

*Meyer O, Agaylan A, Schonemann C, Kiesewetter H, Salama A: Application of the particle gel agglutination assay in the typing of single human leucocyte antigens. Tissue Antigens. 2008;71: 157-9.*

Durch die Verfügbarkeit von monoklonalen Antikörpern, die spezifisch gegen ein Alloantigen gerichtet sind, ergibt sich die Möglichkeit einfache und schnell durchzuführende Techniken zur Phänotypisierung von Alloantigenen anzuwenden. Derzeit stellt die Durchflusszytometrie den Standard bei der Phänotypisierung einzelner HLA-Antigene dar [104-106], die mit verschiedenen Erkrankungen, wie z.B. HLA-B27 und der Spondylitis ankylans [107] oder HLA-A2 und Vitiligo, Autismus oder Morbus Alzheimer [108-110] assoziiert sind. Allerdings stehen die entsprechend nötigen Geräte nur spezialisierten Laboren zur Verfügung.

Zur Vereinfachung der Phänotypisierung einzelner Antigene wurden monoklonale Antikörper gegen HPA-1a (Klon CAMTRAN007, DiaMed AG, Cressier s/Morat, Schweiz) [111], HLA-A2 (Klon BB7.2, BD Biosciences, Heidelberg), HLA-B7 (Klon BB7.1, Morphosys AbD GmbH, Düsseldorf) und HLA-B27 (Klon HLA-ABC-m3, Morphosys AbD GmbH, Düsseldorf) mit Sulfo-NHS-Biotin (Perbio Science, Bonn) nach Vorgabe des Herstellers biotinyliert. Anschließend wurden 10 µl der biotinylierten Antikörper mit 10 µl Streptavidin-Partikeln (Dynabeads M-280 Streptavidin, Invitrogen GmbH Karlsruhe) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und zweimal mit Partikelpuffer gewaschen. Danach wurden die Partikel in 50 µl Diluent 2 (DiaMed AG, Cressier s/Morat, Schweiz) resuspendiert. Für die Phänotypisierung wurden 100 µl EDTA-antikoaguliertes Vollblut in 350 µl Diluent 2 verdünnt und die Partikel darin resuspendiert. Diese Suspension wurde dann unter ständiger Agitation für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend in einen Magneten gestellt (Magnetic Particle Concentrator, MPC, Invitrogen GmbH

Karlsruhe), das verdünnte Vollblut vorsichtig aspiriert und die Partikel so zweimal mit Partikelpuffer gewaschen. Danach wurde die Partikel-Suspension in die Reaktionskammer einer neutralen ID-Gelkarte pipettiert und 10 Minuten bei 85 x g zentrifugiert. Die Agglutinationsreaktionen konnten dann makroskopisch beurteilt werden. Da der monoklonale Antikörper gegen HLA-B27 eine bekannte Kreuzreaktion gegen das Antigen HLA-B7 hat, mussten durch diese Kreuzreaktion bedingte falsch positive Ergebnisse bei HLA-B7 positiven Proben vermieden werden. Dies wurde durch die Zugabe von 0,8 µg anti-HLA-B7 zur Partikel/Vollblut-Suspension erreicht.

Insgesamt wurden 139 Blutproben gesunder Blutspender, von denen der HPA-1 Genotyp bekannt war, HPA-1a phänotypisiert. Alle Reaktionen des Partikel-Agglutinationstestes stimmten mit den bekannten Genotypen der Blutspender überein. Vier (2,9 %) der Blutproben waren HPA-1a negativ, alle anderen HPA-1a positiv (Tabelle 3.15.). Für die Phänotypisierung von HLA-A2, -B7 und -B27 wurden Blutproben von 118 gesunden Blutspendern untersucht, deren HLA-Muster bekannt war. Zweiundsiebzig (48 %) dieser Proben waren im Partikel-Agglutinationstest HLA-A2, 26 (22 %) HLA-B7 und fünf (4 %) HLA-B27 positiv (Tabelle 3.16.). Auch diese Ergebnisse stimmten komplett mit den bekannten HLA-Mustern der Blutspender überein. Darüber hinaus wurden keine falsch positiven Ergebnisse durch Kreuzreaktionen der verwendeten monoklonalen Antikörper mit anderen Antigenen beobachtet.

Der Partikel-Agglutinationstest zur Phänotypisierung einzelner Antigene ist sehr einfach durchführbar. Darüber hinaus ist er, soweit monoklonale Antikörper zur Verfügung stehen, um weitere Antigene erweiterbar. Der Test ergänzt ideal die oben dargestellten Testsysteme, da keine weiteren technischen Voraussetzungen für die

Durchführung des Testes erforderlich sind.

Die beschriebene Technik konnte auch für den Nachweis fetomaternaler Hämorrhagien im Rahmen Rhesus-inkompatibler Schwangerschaften [112] adaptiert werden. Darüber hinaus arbeitet unsere Arbeitsgruppe derzeit daran, dieses Testsystem um die Phänotypisierung neutrophiler Alloantigene und um den Nachweis von disseminierten Tumorzellen im peripheren Blut zu erweitern.

Siehe:

Meyer O, Agaylan A, Schonemann C, Kieseewetter H, Salama A: Application of the particle gel agglutination assay in the typing of single human leucocyte antigens. *Tissue Antigens*. 2008;**71**: 157-9.

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18005089](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18005089)







#### **4. ZUSAMMENFASSUNG**

Im Gegensatz zur Erythrozytenserologie war die Thrombozytenserologie bzw. der Nachweis thrombozytärer Antigene und Antikörper durch die morphologische Gegebenheit der Thrombozyten schwierig und praktisch nur in Speziallaboren möglich. Trotz der Entwicklung zahlreicher Testsysteme zu diesem Zweck, ließ sich die Vorstellung, die Thrombozytenserologie zu vereinfachen, bisher nicht realisieren. Die Bestimmung von Antikörpern auf intakten Thrombozyten mit Hilfe von Komplement-Fixations- oder Immunfluoreszenztesten zeichnet sich zwar durch eine hohe Sensitivität aus, doch die Spezifität dieser Testsysteme ist sehr unbefriedigend. Die letzte praktische Erneuerung auf dem Gebiet der Thrombozytenserologie geht auf die Einführung des MAIPA im Jahre 1987 zurück. Die Ergebnisse dieses Testsystems sind hochspezifisch. Allerdings ist der Einsatz des MAIPA zur Diagnostik der Autoimmunthrombozytopenie auf Grund seiner geringen Sensitivität umstritten. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Nachweis thrombozytenreaktiver Antikörper durch die Anwendung der Partikel-Agglutinationstechnik nicht nur vereinfacht, sondern dass auch die Sensitivität des Antikörpernachweises deutlich gesteigert werden konnte.

Über den Nachweis thrombozytenreaktiver Antikörper hinaus konnte gezeigt werden, dass sich das dargestellte System nicht nur zur Phänotypisierung von HPA- und HLA-Antigenen eignet, sondern auch zur Genotypisierung eingesetzt werden kann. Dies wurde nicht nur anhand der HPA-Genotypisierung demonstriert, sondern auch durch den Einsatz als Check Gel Assay [103]. In weiterführenden Untersuchungen konnte unsere Arbeitsgruppe die Anwendung des Partikel-Agglutinationstests um den Nachweis von Autoantikörpern gegen das Tumorsuppressor-Protein p53 [100], von Antikörpern gegen das thrombozytäre

Alloantigen HPA-1a [98], die erythrozytären Alloantigene Lutheran B und JMh [96, 97], und um den Nachweis fetomaternalen Hämorrhagien im Rahmen Rhesusinkompatibler Schwangerschaften [112] erweitern. Derzeit arbeiten wir daran, die Phänotypisierung des neutrophilen Alloantigens HNA-1a und den Nachweis disseminierter Tumorzellen im peripheren Blut zu etablieren.

In seiner hier dargestellten Form ist der Partikel-Agglutinationstest ein hochflexibles Werkzeug, welches das Untersuchungsspektrum immunhämatologischer Routinelabors deutlich erweitern kann, ohne zusätzliche Investitionen in neue Geräte vorauszusetzen.

## 5. TABELLEN

### 5.1. Thrombozytenspezifische Antigene

Alloantigen	Glykoprotein GP	CD	Genfrequenz Kaukasier	Alloimmunsyndrom
<b>GPIIb-IIIa (häufige Antigene)</b>				
HPA-1a	IIIa	CD61	0,85	FAIT/NAIT, PTP, PAT, TAT, TR
HPA-1b	IIIa	CD41	0,15	NAIT/FAIT, PTP, TR
HPA-3a	IIb	CD41	0,61	NAIT/FAIT, PTP, TR
HPA-3b	IIb	CD41	0,39	NAIT/FAIT, PTP, TR
HPA-4a	IIIa	CD61	>0,99	NAIT/FAIT, PTP, TR
<b>GPIIb-IIIa (private Antigene)</b>				
HPA-4b	IIIa	CD61	<0,01	FAIT/NAIT
HPA-6w	IIIa	CD61	0,003	FAIT/NAIT
HPA-7w	IIIa	CD61	0,001	FAIT/NAIT
HPA-8w	IIIa	CD61	<0,003	FAIT/NAIT
HPA-9w	IIb	CD41	0,003	FAIT/NAIT
HPA-10w	IIIa	CD61	<0,01	FAIT/NAIT
HPA-11w	IIIa	CD61	<0,001	FAIT/NAIT
HPA-14w	IIIa	CD61	unbekannt	FAIT/NAIT
HPA-16w	IIIa	CD61	unbekannt	FAIT/NAIT
<b>GPIb-IX (häufige Antigene)</b>				
HPA-2a	Ib $\alpha$	CD42b	0,89	TR
HPA-2b	Ib $\alpha$	CD42b	0,11	FAIT/NAIT
<b>GPIb-IX (private Antigene)</b>				
HPA-12w	Ib $\beta$	CD42c	0,002	FAIT/NAIT
<b>GPIa-IIa (häufige Antigene)</b>				
HPA-5a	Ia	CD49b	0,89	FAIT/NAIT, TR
HPA-5b	Ia	C49b	0,11	FAIT/NAIT, PTP, TR
<b>GPIa-IIa (private Antigene)</b>				
HPA-13w	GPIa	CD49b	unbekannt	FAIT/NAIT
<b>CD109 (häufige Antigene)</b>				
HPA-15a		CD109	0,47	
HPA-15b		CD109	0,53	FAIT/NAIT, PTP
<b>Nicht-thrombozytenspezifische Alloantigene</b>				
ABH				(TR)
HLA-Klasse I				TR

FAIT/NAIT = Fetale bzw. Neonatale Alloimmunthrombozytopenie, PTP = Posttransfusionelle Purpura, PAT = Passive Alloimmunthrombozytopenie, TAT = Transplantations- assoziierte Alloimmunthrombozytopenie, TR = Refraktärzustand auf Thrombozytentransfusionen

5.2. Vergleich der Ergebnisse (n=135) des neuen ID-HPF4 mit denen des Heparin-induzierten Plättchenaktivierungstest (HIPA) und denen des kommerziellen Heparin/Plättchenfaktor 4-ELISA Asserachrom HPIA

Testvergleich	Anzahl der Proben				Übereinstimmende Proben
	neg/neg	pos/pos	neg/pos	pos/neg	
ID-HPF4/ELISA	94	22	9	10	116 (86 %)
ID-HPF4/HIPA	77	16	9	10	93 (69 %)
HIPA/ELISA	73	15	11	10	88 (65 %)

5.3. Monoklonale Antikörper, die zum Glykoprotein-spezifischen Nachweis thrombozytenreaktiver Antikörper verwendet wurden

Glykoproteinkomplex	Antigen	Klon	Konzentration (µg/mg Partikel)	Vertrieb
GPIIb-IIIa	CD41	P2	10	Beckman Coulter, Krefeld
GPIb-IX	CD42a	FMC-25	-*)	Morphosys AbD GmbH, Düsseldorf
	CD42a	SZ1	5	Beckman Coulter, Krefeld
GPIa-IIa	CD49b	Gi9	-*)	Beckman Coulter, Krefeld
	CD49b	AK-7	10	BD Biosciences, Heidelberg

\*) = keine stabile Kopplung an Partikel erreicht

5.4. Antigen-spezifischer Nachweis von gebundenen Autoantikörpern gegen die thrombozytären Glykoproteinkomplexe GPIIb-IIIa, GPIb-IX und GPIa-IIa im MAIPA und im ASPA.

Proben Nr.	GPIIb-IIIa	GPIb-IX	GPIa-IIa
	MAIPA / ASPA	MAIPA / ASPA	MAIPA / ASPA
1	neg./neg.	neg./neg.	neg./neg.
2	pos./pos.	neg./neg.	neg./neg.
3	pos./pos.	pos./pos.	neg./neg.
4	pos./pos.	pos./pos.	pos./pos.
5	pos./pos.	neg./neg.	neg./neg.
6	pos./pos.	pos./pos.	neg./neg.
7	pos./pos.	pos./pos.	<b>pos./neg.</b>
8	pos./pos.	pos./pos.	<b>pos./neg.</b>

pos. = positiv, neg. = negativ

5.5. Antigen-spezifischer Nachweis von freien Autoantikörpern gegen die thrombozytären Glykoproteinkomplexe GPIIb-IIIa, GPIb-IX und GPIa-IIa im MAIPA und im ASPA.

	Proben Nr.	GPIIb-IIIa	GPIb-IX	GPIa-IIa
		MAIPA / ASPA	MAIPA / ASPA	MAIPA / ASPA
<i>Übereinstimmende Ergebnisse</i>	1	pos./pos.	pos./pos.	pos./pos.
	2	pos./pos.	pos./pos.	pos./pos.
	3	pos./pos.	pos./pos.	pos./pos.
	4	pos./pos.	pos./pos.	pos./pos.
	5	pos./pos.	pos./pos.	pos./pos.
	6	pos./pos.	pos./pos.	pos./pos.
	7	pos./pos.	pos./pos.	pos./pos.
	8	pos./pos.	pos./pos.	pos./pos.
	9	pos./pos.	pos./pos.	pos./pos.
	10	pos./pos.	pos./pos.	pos./pos.
	11	pos./pos.	pos./pos.	neg./neg.
	12	pos./pos.	pos./pos.	neg./neg.
	13	pos./pos.	pos./pos.	neg./neg.
	14	pos./pos.	pos./pos.	neg./neg.
	15	pos./pos.	pos./pos.	neg./neg.
	16	pos./pos.	neg./neg.	neg./neg.
	17	pos./pos.	neg./neg.	neg./neg.
	18	neg./neg.	pos./pos.	neg./neg.
	19	neg./neg.	pos./pos.	neg./neg.
	20	neg./neg.	pos./pos.	neg./neg.
	21	neg./neg.	pos./pos.	neg./neg.
<i>nicht-übereinstimmende Ergebnisse (MAIPA negativ/ASPA positive)</i>	22	<b>neg./pos.</b>	<b>neg./pos.</b>	<b>neg./neg.</b>
	23	<b>neg./pos.</b>	<b>neg./neg.</b>	<b>neg./pos.</b>
	24	neg./pos.	pos./pos.	neg./neg.
	25	pos./pos.	neg./pos.	neg./neg.
	26	pos./pos.	neg./pos.	neg./neg.
	27	<b>neg./neg.</b>	<b>neg./pos.</b>	<b>neg./neg.</b>
	28	neg./neg.	pos./pos.	neg./pos.
	29	pos./pos.	pos./pos.	neg./pos.
	<i>nicht-übereinstimmende Ergebnisse (ASPA negativ/MAIPA positive)</i>	30	<b>pos./neg.</b>	<b>neg./neg.</b>
31		pos./neg.	pos./pos.	neg./neg.
32		pos./pos.	pos./pos.	pos./neg.
33		pos./pos.	pos./pos.	pos./neg.

5.6. Antigen-spezifischer Nachweis von freien Alloantikörpern gegen HPA-1a und HPA-5b im MAIPA und im ASPA.

	Proben Nr.	GPIIb-IIIa	GPIb-IX	GPIa-IIa
		MAIPA / ASPA	MAIPA / ASPA	MAIPA / ASPA
<u>Anti-HPA-1a</u>				
HPA-1a positive Thrombozyten	1	2.999 / +++++	0.052 / neg	0.011 / neg
	2	0.937 / +++++	0.052 / neg	0.042 / neg
	3	2.081 / +++++	0.096 / neg	0.025 / neg
	4	0.871 / +++++	0.009 / neg	0.021 / neg
HPA-1a negative Thrombozyten	1	0.163 / neg	0.139 / neg	0.166 / neg
	2	0.124 / neg	0.156 / neg	0.178 / neg
	3	0.099 / neg	0.110 / neg	0.123 / neg
	4	0.103 / neg	0.122 / neg	0.156 / neg
<u>Anti-HPA-5b</u>				
HPA-5b positive Thrombozyten	1	0.122 / neg	0.035 / neg	1.082 / +++
	2	0.109 / neg	0.119 / neg	1.873 / +++++
	3	0.120 / neg	0.108 / neg	2.999 / +++++
	4	0.156 / neg	0.100 / neg	1.353 / +++++
	5	0.082 / neg	0.064 / neg	0.075 / ++
HPA-5b negative Thrombozyten	1	0.149 / neg	0.108 / neg	0.156 / neg
	2	0.120 / neg	0.140 / neg	0.098 / neg
	3	0.146 / neg	0.138 / neg	0.113 / neg
	4	0.102 / neg	0.122 / neg	0.115 / neg
	5	0.132 / neg	0.097 / neg	0.160 / neg

MAIPA cut off = O.D.  $\geq 0,200$ ; neg. = negativ

5.7. Antigen-spezifischer Nachweis von thrombozytenspezifischen Alloantikörpern im MAIPA und im ASCA

<b>Spezifität</b>	<b>Test-Thrombozyten</b>	<b>Probenumfang [N]</b>	<b>MAIPA</b>	<b>ASCA</b>
<b>Anti-HPA-1a</b>	HPA-1a pos	6	pos	pos
	HPA-1a neg		neg	neg
<b>Anti-HPA-2b</b>	HPA-2b pos	1	pos	pos
	HPA-2b neg		neg	neg
<b>Anti-HPA-3a</b>	HPA-3a pos	1	pos	pos
	HPA-3a neg		neg	neg
<b>Anti-HPA-5b</b>	HPA-5b pos	6	pos	pos
	HPA-5b neg		neg	neg

pos = positiv; neg = negativ



5.8. Nachweis von thrombozytenreaktiven Autoantikörpern im direkten und indirekten MAIPA im Vergleich zum ASCA

Proben Nr.	GPIIb-IIIa			GPIb-IX			GPIa-IIa		
	direct MAIPA	indirect MAIPA	ASCA	direct MAIPA	indirect MAIPA	ASCA	direct MAIPA	indirect MAIPA	ASCA
1	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
2	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
3	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
4	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
5	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
7	neg	neg	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg
8	pos	pos	pos	neg	neg	pos	neg	neg	pos
9	pos	pos	pos	pos	neg	pos	neg	neg	neg
10	pos	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	pos
11	pos	neg	pos	pos	neg	pos	pos	neg	neg
12	pos	neg	pos	neg	neg	pos	neg	neg	neg
13	pos	neg	pos	pos	neg	neg	pos	neg	neg
14	pos	neg	pos	pos	neg	pos	pos	neg	neg
15	pos	neg	pos	pos	neg	pos	pos	neg	pos
16	pos	neg	pos	pos	neg	pos	neg	neg	pos
17	pos	neg	pos	pos	neg	pos	pos	neg	pos
18	pos	neg	neg	pos	pos	pos	neg	neg	neg
19	pos	neg	neg	pos	neg	pos	neg	neg	neg
20	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg
21	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg
22	neg	neg	pos	neg	neg	pos	neg	neg	neg
23	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg
24	neg	neg	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg
25	neg	neg	pos	pos	neg	pos	neg	neg	neg
26	neg	neg	pos	neg	neg	pos	neg	neg	neg
27	neg	neg	pos	neg	neg	pos	neg	neg	pos
28	neg	neg	pos	neg	neg	pos	neg	neg	pos
29	n.t.	neg	neg	n.t.	neg	pos	n.t.	neg	neg
30	n.t.	neg	neg	n.t.	neg	neg	n.t.	neg	neg
31	n.t.	neg	pos	n.t.	neg	pos	n.t.	neg	neg
32	n.t.	neg	neg	n.t.	neg	neg	n.t.	neg	pos
33	n.t.	neg	neg	n.t.	neg	neg	n.t.	neg	neg
34	n.t.	neg	pos	n.t.	neg	neg	n.t.	neg	neg
35	n.t.	neg	neg	n.t.	neg	neg	n.t.	neg	neg
36	n.t.	neg	pos	n.t.	neg	neg	n.t.	neg	neg
37	n.t.	neg	pos	n.t.	pos	pos	n.t.	neg	neg
38	n.t.	pos	pos	n.t.	neg	pos	n.t.	neg	pos
39	n.t.	pos	pos	n.t.	neg	neg	n.t.	neg	neg
	<b>n=12</b>	<b>n=4</b>	<b>n=25</b>	<b>n=11</b>	<b>n=3</b>	<b>n=19</b>	<b>n=5</b>	<b>n=0</b>	<b>n=9</b>

n.t. = nicht getestet; pos = positiv, neg = negativ

5.9. Sequenz-spezifische Primer für die Genotypisierung von thrombozytären Alloantigenen

Alloantigen	Primer-Sequenz (5'-3')	Länge (mers)
HPA-1a	<b>Bio</b> *-ACT TAC Agg CCC TgC CTC T	19
HPA-1b	<b>Bio</b> -ACT TAC Agg CCC TgC CTC C	19
HPA-1 AS <sup>†</sup>	<b>Bio</b> -AgC Cgg AgT gCA ATC CTC Tg	20
HPA-2a	<b>Bio</b> -CCC CCA ggg CTC CTg AC	17
HPA-2b	<b>Bio</b> -CCC CCA ggg CTC CTg AT	17
HPA-2 AS	<b>Bio</b> -gCC AgC gAC gAA AAT AgA gg	20
HPA-3a	<b>Bio</b> -ggg ggA ggg gCT ggg gA	17
HPA-3b	<b>Bio</b> -ggg ggA ggg gCT ggg gC	17
HPA-3 AS	<b>Bio</b> -ggC CCT ggg ACT gTg AAT g	19
HPA 4a	<b>Bio</b> -CTg gCC ACC CAg ATg Cg	17
HPA 4b	<b>Bio</b> -CTg gCC ACC CAg ATg CA	17
HPA 4 AS	<b>Bio</b> -ggT AgA AAg GAg CTA TAg TTT ggC	24
HPA-5a	<b>Bio</b> -ATT AgT TTA TTT TTT TTT TTT TAC CTC	27
HPA-5b	<b>Bio</b> -TAT Tag TTT ATT TTT TTT TTT TTA CCT T	28
HPA-5 AS	<b>Bio</b> -ATT ggC TCC TAT TTT ggT AgT g	22
HPA 6a	<b>Bio</b> -gAC gAg TgC AgC CCC Cg	17
HPA 6b	<b>Bio</b> -ggA CgA gTg CAg CCC CCA	18
HPA 6 AS	<b>Bio</b> -CCT ATg TTT CCC AgT ggT TgC A	22
HPA-15a	<b>Bio</b> -TTC AAA TTC TTg gTA AAT CCT gT	23
HPA-15b	<b>Bio</b> -TTC AAA TTC TTg gTA AAT CCT gg	23
HPA-15 AS	<b>Bio</b> -ATg ACC TTA TgA TgA CCT ATT C	22
HGH-S	<b>FITC</b> <sup>‡</sup> -TgC CTT CCC AAC CAT TCC CTT A	22
HGH-AS	<b>FITC</b> -CCA CTC ACg gAT TTC TgT TgT gTT TC	26

\* Bio = Biotin-markiert, † AS = Antisense, ‡ = FITC markiert

5.10. Ergebnisse der HPA-Typisierung mittels Standard PCR-SSP und Partikel-Agglutinationsmethode

<b>HPA-Typ</b>	<b>Anzahl der Proben</b>
HPA 1 a/a	75
HPA 1 a/b	24
HPA 1 b/b	1
HPA 2 a/a	84
HPA 2 a/b	16
HPA 2 b/b	0
HPA 3 a/a	37
HPA 3 a/b	45
HPA 3 b/b	18
HPA 4 a/a	100
HPA 4 a/b	0
HPA 4 b/b	0
HPA 5 a/a	80
HPA 5 a/b	19
HPA 5 b/b	1
HPA 6 a/a	100
HPA 6 a/b	0
HPA 6 b/b	0
HPA 15 a/a	25
HPA 15 a/b	48
HPA 15 b/b	27

5.11. Ergebnisse der HPA-1a Phänotypisierung im Partikel-Agglutinationstest

<b>HPA-1a Genotyp</b>	<b>Gestestete Blutproben</b>	<b>Ergebnis Partikel-Agglutinationstest</b>
a/a	96	positiv
a/b	39	positiv
b/b	4	negativ

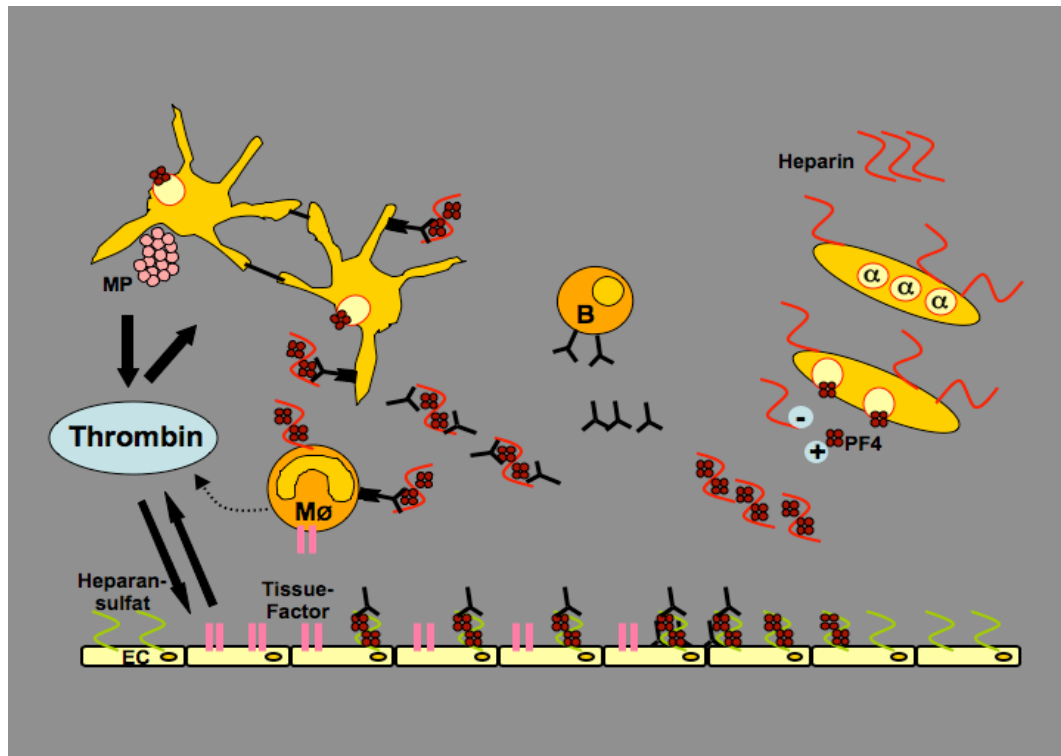
5.12. Ergebnisse der HLA-A2, -B7 und -B27 Phänotypisierung im Partikel-Agglutinationstest

HLA-A		HLA-B		Proben (n)	HLA-		
					A2	B7	B27
A1	A1	B7	B8	2	-	pos	-
A1	A2	B7	B8	2	pos	pos	-
A1	A2	B7	B52	1	pos	pos	-
A1	A2	B8	B62	1	pos	-	-
A1	A2	B8	B51	1	pos	-	-
A1	A2	B8	B8	1	pos	-	-
A1	A2	B8	B27	1	pos	-	pos
A1	A2	B8	B40	1	pos	-	-
A1	A2	B18	B61	1	pos	-	-
A1	A2	B39	B51	1	pos	-	-
A1	A2	B57	B8	1	pos	-	-
A1	A2	B58	B35	1	pos	-	-
A1	A3	B7	B50	1	-	pos	-
A1	A3	B7	B8	1	-	pos	-
A1	A24	B40	B44	1	-	-	-
A1	A68	B8	B35	2	-	-	-
A1	A68	B35	B62	1	-	-	-
A1	A68	B44	B61	1	-	-	-
A2	A2	B7	B57	1	pos	pos	-
A2	A2	B15	B18	1	pos	-	-
A2	A2	B27	B35	1	pos	-	pos
A2	A2	B44	B51	1	pos	-	-
A2	A2	B44	B62	2	pos	-	-
A2	A2	B49	B51	1	pos	-	-
A2	A2	B62	B62	1	pos	-	-
A2	A3	B7	B44	2	pos	pos	-
A2	A3	B7	B55	1	pos	pos	-
A2	A3	B7	B41	1	pos	pos	-
A2	A3	B7	B60	1	-	pos	-
A2	A3	B7	B55	1	pos	-	-
A2	A3	B7	B56	1	pos	-	-
A2	A3	B35	B62	1	pos	-	-
A2	A3	B44	B62	1	pos	-	-
A2	A11	B13	B62	1	pos	-	-
A2	A11	B13	B44	1	pos	-	-
A2	A11	B14	B62	1	pos	-	-
A2	A11	B15	B51	1	pos	-	-
A2	A23	B13	B49	1	pos	-	-
A2	A24	B18	B44	2	pos	-	-
A2	A24	B44	B60	1	pos	-	-

HLA-A		HLA-B		Proben (n)	HLA-		
					A2	B7	B27
A2	A24	B62	B61	1	pos	-	-
A2	A25	B13	B56	1	pos	-	-
A2	A25	B18	B57	1	pos	-	-
A2	A25	B57	B60	1	pos	-	-
A2	A27	B35	B35	1	pos	-	-
A2	A28	B8	B73	1	pos	-	-
A2	A29	B39	B60	1	pos	-	-
A2	A29	B60	B70	1	pos	-	-
A2	A30	B18	B35	1	pos	-	-
A2	A30	B35	B35	1	pos	-	-
A2	A31	B51	B51	1	pos	-	-
A2	A32	B14	B18	1	pos	-	-
A2	A32	B39	B44	1	pos	-	-
A2	A32	B39	B61	1	pos	-	-
A2	A33	B14	B27	1	pos	-	pos
A2	A68	B8	B62	1	pos	-	-
A2	A68	B18	B38	1	pos	-	-
A2	A68	B37	B62	1	pos	-	-
A2	A68	B44	B44	1	pos	-	-
A2	A68	B44	B51	1	pos	-	-
A2	A68	B44	B51	1	pos	-	-
A3	A11	B7	B35	1	-	pos	-
A3	A11	B7	B8	1	-	pos	-
A3	A24	B7	B51	1	-	pos	-
A3	A24	B7	B62	1	-	-	-
A3	A24	B7	B15	1	-	pos	-
A3	A25	B13	B18	1	-	-	-
A3	A26	B7	B38	1	-	pos	-
A3	A26	B7	B27	1	-	pos	pos
A3	A31	B7	B35	1	-	pos	-
A3	A68	B7	B18	1	-	pos	-
A23	A32	B7	B44	1	-	pos	-
A23	A32	B7	B44	1	-	pos	-
A24	A24	B7	B61	2	-	pos	-
A24	A33	B13	B14	1	-	-	-
A24	A68	B7	B61	1	-	pos	-
A24	A68	B27	B55	1	-	-	pos
A30	A32	B13	B44	1	-	-	-
andere-HLA-Muster				33			

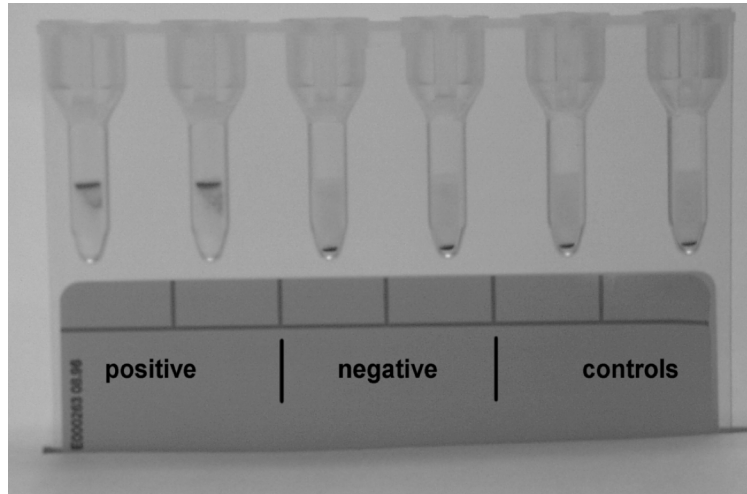
## 6. ABBILDUNGEN

### 6.1. Pathophysiologie der Heparin-induzierten Thrombozytopenie



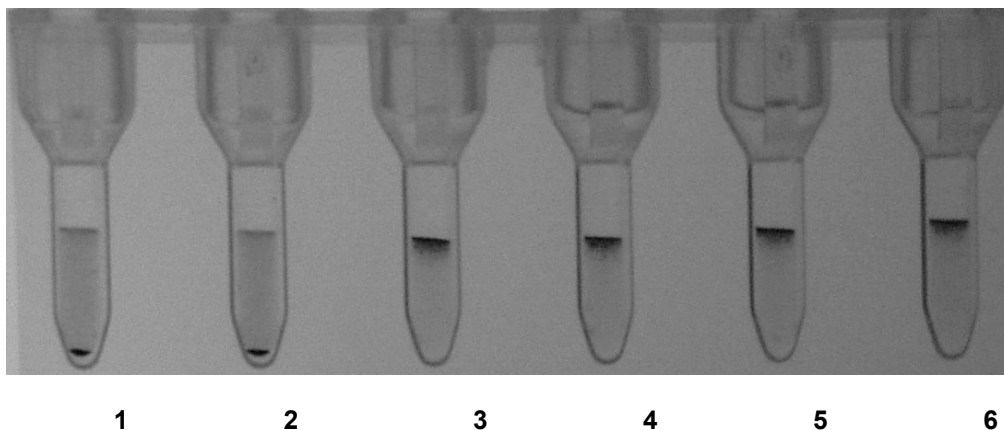
Die Gabe von Heparin führt zur Freisetzung von Plättchenfaktor 4 (PF4) aus den thrombozytären Granula und es bilden sich multimolekulare Heparin-PF4 (H-PF4) Komplexe. Diese Komplexbildung führt zur Bildung von immunogenen Neoantigenen des PF4 und es kommt zur Bildung von Immunkomplexen aus Heparin, PF4 und den Anti-Heparin/PF4-Antikörpern. Diese binden mit ihrem Fc-Stück an den Fc-gamma IIa Rezeptor der Thrombozyten. Diese Bindung führt zur Aktivierung der Thrombozyten und damit auch zu einer weiteren Freisetzung von PF4, die wiederum zur Bildung weiterer Heparin/PF4/Antikörper-Komplexe führt. Durch die Aktivierung der Thrombozyten kommt es zur Bildung von prokoagulatorischen Micropartikeln und zur Thrombinbildung. Die Thrombinbildung wird schließlich durch die thrombozytären Micropartikel, die Aktivierung der plasmatischen Gerinnungskaskade, der Alteration von Endothelzellen und die Aktivierung von Monozyten verstärkt.

6.2. Vergleich positiver und negativer Reaktionen mit Heparin/Plättchenfaktor 4-beladenen Polystyrenpartikeln



positive = Serumproben, die Antikörper gegen Heparin/Plättchenfaktor 4-Komplexe enthielten;  
negative = Serumproben, die keine Antikörper gegen Heparin/Plättchenfaktor 4-Komplexe enthielten;  
controls = Partikel ohne Serum inkubiert  
Abbildung entnommen aus [113]

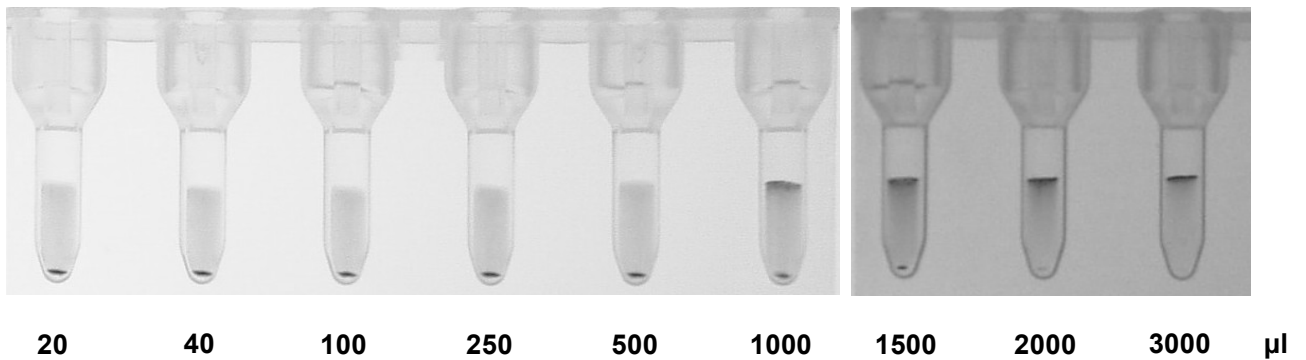
6.3. Reaktivität der verwendeten Polystyrenpartikel nachdem sie mit solubilisierten Thrombozyten gesunder Blutspender und verschiedenen Patienten-Serumproben inkubiert wurden.



- 1 = Partikel mit anti-GPIIb-IIIa inkubiert mit Serum eines gesunden Blutspenders
- 2 = Partikel mit anti-GPIa-IIa inkubiert mit Serum eines gesunden Blutspenders
- 3 = Partikel mit anti-GPIIb-IIIa inkubiert mit Serum, das Autoantikörper gegen GPIIb-IIIa enthält
- 4 = Partikel mit anti-GPIIb-IIIa inkubiert mit Serum, das Autoantikörper gegen GPIIb-IIIa, GPIb-IX und GPIa-IIa enthält
- 5 = Partikel mit anti-GPIb-IX inkubiert mit Serum, das Autoantikörper gegen GPIIb-IIIa, GPIb-IX und GPIa-IIa enthält
- 6 = Partikel mit anti-GPIa-IIa inkubiert mit Serum, das Autoantikörper gegen GPIIb-IIIa, GPIb-IX und GPIa-IIa enthält

Abbildung entnommen aus [114]

- 6.4. Reaktivität ansteigender Volumina verdünnter Serumproben, die Autoantikörper gegen GPIIb-IIIa enthalten und mit biotinylierten monoklonalen Antikörpern gegen GPIIb-IIIa und superparamagnetischen Streptavidin-Partikeln inkubiert wurden.



Vergleichbare Ergebnisse wurden mit verdünnten Seren erzielt, die Alloantikörper gegen HPA-1a enthielten.

Abbildung entnommen aus [115]

6.5. HPA-Genotypisierung und Visualisierung der PCR-Produkte mittels Partikel-Agglutinationsreaktion

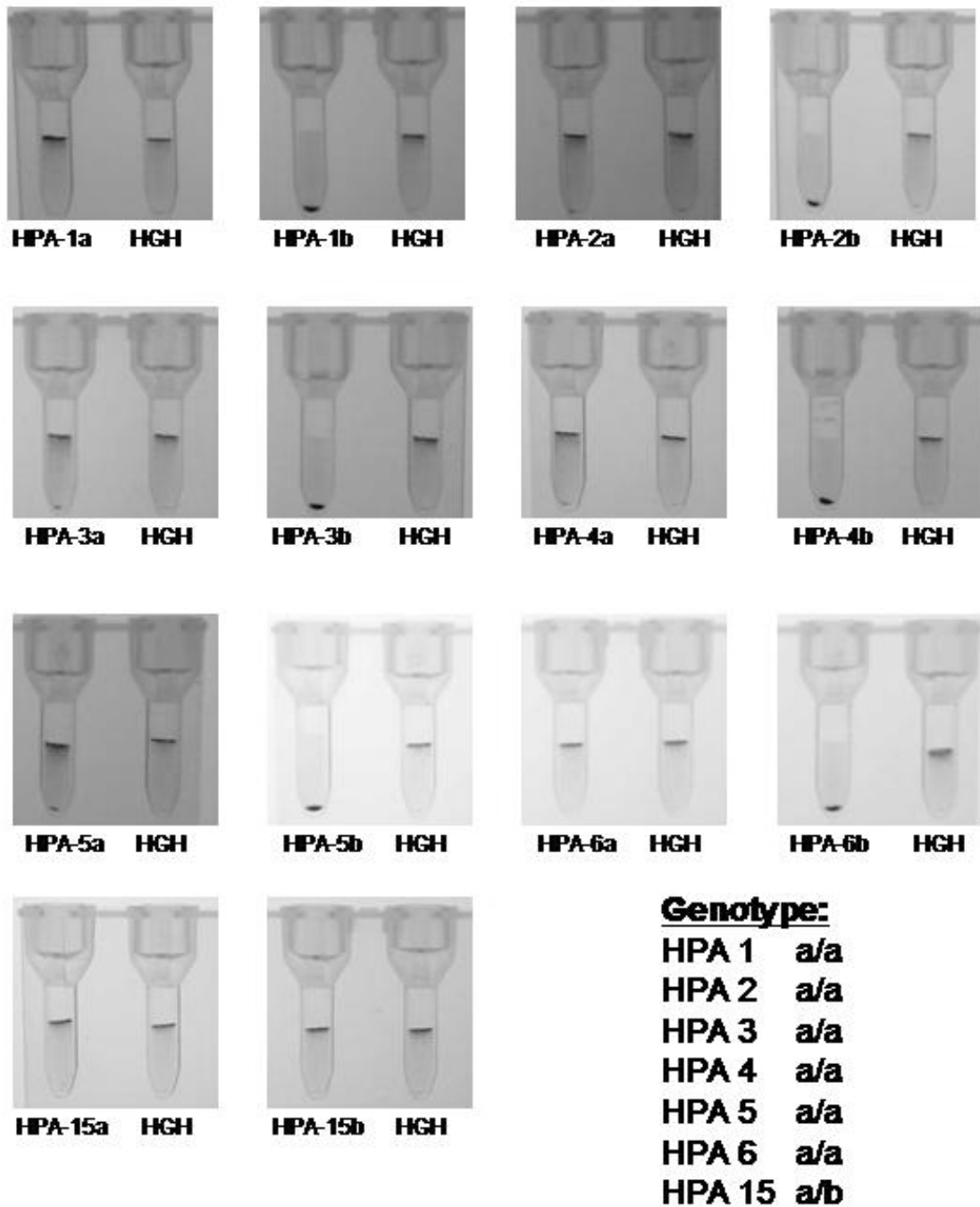


Abbildung entnommen aus [116]



## 7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Dunstan RA, Mansbach CM, 2nd: Biochemical characterisation of A blood group activity on human platelets. *Vox Sang.* 1985;**49**: 149-53.
2. Le Pendu J, Caillard T, Mollicone R, Couillin P, Oriol R: Expression of ABH and X (Lex) antigens in various cells. *Biochimie.* 1988;**70**: 1613-8.
3. Santoso S, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C: Blood group A and B determinants are expressed on platelet glycoproteins IIa, IIIa, and Ib. *Thromb Haemost.* 1991;**65**: 196-201.
4. Ogasawara K, Ueki J, Takenaka M, Furihata K: Study on the expression of ABH antigens on platelets. *Blood.* 1992;**82**: 993.
5. Santoso S, Santoso S, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C: PEACAM is the major glycoprotein on platelets carrying blood group antigens. *Thromb Haemost.* 1993;**69**: 1191.
6. Ando B, Ibayashi H: Identification of anti-Lea by platelet complement fixation. *Vox Sang.* 1986;**50**: 169-73.
7. Dunstan RA, Simpson MB, Rosse WF: Erythrocyte antigens on human platelets. Absence of Rh, Duffy, Kell, Kidd, and Lutheran antigens. *Transfusion.* 1984;**24**: 243-6.
8. Kao KJ, Riley WJ: Genetic predetermination of quantitative expression of HLA antigens in platelets and mononuclear leukocytes. *Hum Immunol.* 1993;**38**: 243-50.
9. Santoso S, Kalb R, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C: The presence of messenger RNA for HLA class I in human platelets and its capability for protein biosynthesis. *Br J Haematol.* 1993;**84**: 451-6.
10. Giltay JC, Brinkman HJ, Vlekke A, Kiefel V, van Mourik JA, von dem Borne AE: The platelet glycoprotein Ia-IIa-associated Br-alloantigen system is expressed by cultured endothelial cells. *Br J Haematol.* 1990;**75**: 557-60.
11. Giltay JC, Brinkman HJ, von dem Borne AE, van Mourik JA: Expression of the alloantigen Zwa (or P1A1) on human vascular smooth muscle cells and foreskin fibroblasts: a study on normal individuals and a patient with Glanzmann's thrombasthenia. *Blood.* 1989;**74**: 965-70.
12. Giltay JC, Leeksa OC, von dem Borne AE, van Mourik JA: Alloantigenic composition of the endothelial vitronectin receptor. *Blood.* 1988;**72**: 230-3.
13. Santoso S, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C: Human platelet alloantigens Bra/Brb are expressed on the very late activation antigen 2 (VLA-2) of T lymphocytes. *Hum Immunol.* 1989;**25**: 237-46.
14. Metcalfe P, Watkins NA, Ouwehand WH, Kaplan C, Newman P, Kekomaki R, De Haas M, Aster R, Shibata Y, Smith J, Kiefel V, Santoso S: Nomenclature of human platelet antigens. *Vox Sang.* 2003;**85**: 240-5.
15. Santoso S, Kiefel V, Richter IG, Sachs UJ, Rahman A, Carl B, Kroll H: A functional platelet fibrinogen receptor with a deletion in the cysteine-rich repeat region of the beta(3) integrin: the Oe(a) alloantigen in neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Blood.* 2002;**99**: 1205-14.

16. Ikeda H, Mitani T, Ohnuma M, Haga H, Ohtzuka S, Kato T, Nakase T, Sekiguchi S: A new platelet-specific antigen, Naka, involved in the refractoriness of HLA-matched platelet transfusion. *Vox Sang.* 1989;**57**: 213-7.
17. Aster RH: Effect of anticoagulant and ABO incompatibility on recovery of transfused human platelets. *Blood.* 1965;**26**: 732-43.
18. Dugesnoy RJ, Anderson AJ, Tomasulo PA, Aster RH: ABO compatibility and platelet transfusions of alloimmunized thrombocytopenic patients. *Blood.* 1979;**54**: 595-9.
19. Brand A, Sintnicolaas K, Claas FH, Eernisse JG: ABH antibodies causing platelet transfusion refractoriness. *Transfusion.* 1986;**26**: 463-6.
20. Duquesnoy RJ: Structural epitope matching for HLA-alloimmunized thrombocytopenic patients: a new strategy to provide more effective platelet transfusion support? *Transfusion.* 2008;**48**: 221-7.
21. van Leeuwen EF, van der Ven JT, Engelfriet CP, von dem Borne AE: Specificity of autoantibodies in autoimmune thrombocytopenia. *Blood.* 1982;**59**: 23-6.
22. Woods VL, Jr., Oh EH, Mason D, McMillan R: Autoantibodies against the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex in patients with chronic ITP. *Blood.* 1984;**63**: 368-75.
23. Woods VL, Jr., Kurata Y, Montgomery RR, Tani P, Mason D, Oh EH, McMillan R: Autoantibodies against platelet glycoprotein Ib in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood.* 1984;**64**: 156-60.
24. Castaldi PA, Maehrabani PA, Fournier DJ, Berndt MC: Autoimmune thrombocytopenia associated with B-CLL and an IgG autoantibody directed against platelet GP Ia-IIa complex (VLA-2). *Thromb Haemost.* 1989;**62**: 151 (abstract).
25. Deckmyn H, Chew SL, Vermeylen J: Lack of platelet response to collagen associated with an autoantibody against glycoprotein Ia: a novel cause of acquired qualitative platelet dysfunction. *Thromb Haemost.* 1990;**64**: 74-9.
26. Mayer JL, Beardsley DS: Varicella-associated thrombocytopenia: autoantibodies against platelet surface glycoprotein V. *Pediatr Res.* 1996;**40**: 615-9.
27. Santoso S: Human platelet alloantigens. *Transfus Apher Sci.* 2003;**28**: 227-36.
28. Asvadi P, Ahmadi Z, Chong BH: Drug-induced thrombocytopenia: localization of the binding site of GPIX-specific quinine-dependent antibodies. *Blood.* 2003;**102**: 1670-7.
29. Peterson JA, Nelson TN, Kanack AJ, Aster RH: Fine specificity of drug-dependent antibodies reactive with a restricted domain of platelet GPIIIA. *Blood.* 2008;**111**: 1234-9.
30. Kroll H, Sun QH, Santoso S: Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) is a target glycoprotein in drug-induced thrombocytopenia. *Blood.* 2000;**96**: 1409-14.
31. Cines DB, Blanchette VS: Immune thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 2002;**346**: 995-1008.

32. George JN, Woolf SH, Raskob GE, Wasser JS, Aledort LM, Ballem PJ, Blanchette VS, Bussel JB, Cines DB, Kelton JG, Lichtin AE, McMillan R, Okerbloom JA, Regan DH, Warrier I: Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood*. 1996;**88**: 3-40.
33. Guidelines for the investigation and management of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults, children and in pregnancy. *Br J Haematol*. 2003;**120**: 574-96.
34. Warkentin TE, Smith JW: The alloimmune thrombocytopenic syndromes. *Transfus Med Rev*. 1997;**11**: 296-307.
35. Kaplan C: Platelet alloimmunity: the fetal/neonatal alloimmune thrombocytopenia. *Vox Sang*. 2002;**83 Suppl 1**: 289-91.
36. Kanhai HH, Porcelijn L, Engelfriet CP, Reesink HW, Panzer S, Ulm B, Goldman M, Bonacossa I, Richard L, David M, Taaning E, Hedegaard M, Kaplan C, Kiefel V, Meyer O, Salama A, Morelati F, Greppi N, Marconi M, Tassis B, Tsuno NH, Takahashi K, Oepkes D, Kanhai H, Osnes LT, Husebekk A, Killie MK, Kjeldsen-Kragh J, Zupanska B, Muniz-Diaz E, Nogues N, Parra J, Urbaniak SJ, Cameron A: Management of alloimmune thrombocytopenia. *Vox Sang*. 2007;**93**: 370-85.
37. Mueller-Eckhardt C: Post-transfusion purpura. *Br J Haematol*. 1986;**64**: 419-24.
38. Lubenow N, Eichler P, Albrecht D, Carlsson LE, Kothmann J, Rossocha WR, Hahn M, Quitmann H, Greinacher A: Very low platelet counts in post-transfusion purpura falsely diagnosed as heparin-induced thrombocytopenia. Report of four cases and review of literature. *Thromb Res*. 2000;**100**: 115-25.
39. Ballem PJ, Buskard NA, Decary F, Doubroff P: Post-transfusion purpura secondary to passive transfer of anti-P1A1 by blood transfusion. *Br J Haematol*. 1987;**66**: 113-4.
40. Panzer S, Kiefel V, Bartram CR, Haas OA, Hinterberger W, Mueller-Eckhardt C, Lechner K: Immune thrombocytopenia more than a year after allogeneic marrow transplantation due to antibodies against donor platelets with anti-PIA1 specificity: evidence for a host-derived immune reaction. *Br J Haematol*. 1989;**71**: 259-64.
41. Bierling P, Pignon JM, Kuentz M, Mitjavila MT, Fromont P, Barbu V, Goossens M, Duedari N, Vainchenker W, Vernant JP: Thrombocytopenia after bone marrow transplantation caused by a recipient origin Br(a) allo-antibody: presence of mixed chimerism 3 years after the graft without hematologic relapse. *Blood*. 1994;**83**: 274-9.
42. West KA, Anderson DR, McAlister VC, Hewlett TJ, Belitsky P, Smith JW, Kelton JG: Alloimmune thrombocytopenia after organ transplantation. *N Engl J Med*. 1999;**341**: 1504-7.
43. Kiefel V, Konig C, Kroll H, Santoso S: Platelet alloantibodies in transfused patients. *Transfusion*. 2001;**41**: 766-70.
44. Pruss A, Kalus U, Radtke H, Koscielny J, Baumann-Baretti B, Balzer D, Dorner T, Salama A, Kiesewetter H: Universal leukodepletion of blood

- components results in a significant reduction of febrile non-hemolytic but not allergic transfusion reactions. *Transfus Apher Sci.* 2004;**30**: 41-6.
45. Majsky A, Zikova R: The use of formalinized thrombocytes as antigens for the demonstration of thrombocyte antibodies by means of the agglutination test, the complement fixation reaction and the anti-human globulin deviation method. *Z Gesamte Inn Med.* 1960;**15**: 1117-22.
  46. Colombani J, D'Amaro J, Gabb B, Smith G, Svejgaard A: International agreement on a microtechnique of platelet complement fixation (Pl. C fix.). *Transplant Proc.* 1971;**3**: 121-6.
  47. von dem Borne AE, Verheugt FW, Oosterhof F, von Riesz E, de la Riviere AB, Engelfriet CP: A simple immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies. *Br J Haematol.* 1978;**39**: 195-207.
  48. Schneider W, Schnaidt M: The platelet adhesion immunofluorescence test: a modification of the platelet suspension immunofluorescence test. *Blut.* 1981;**43**: 389-92.
  49. Taaning E: Microplate enzyme immuno-assay for detection of platelet antibodies. *Tissue Antigens.* 1985;**25**: 19-27.
  50. Mueller-Eckhardt C, Schulz G, Sauer KH, Dienst C, Mahn I: Studies on the platelet radioactive anti-immunoglobulin test. *J Immunol Methods.* 1978;**19**: 1-11.
  51. Tazzari PL, Ricci F, Vianelli N, Tassi C, Belletti D, Pierri I, Gugliotta L, Gobbi M, Conte R: Detection of platelet-associated antibodies by flow cytometry in hematological autoimmune disorders. *Ann Hematol.* 1995;**70**: 267-72.
  52. Janisiw M, Eichelberger B, Koren D, Panzer S: Screening for platelet auto-antibodies by flow cytometry and their evaluation by the MAIPA technique. *Wien Klin Wochenschr.* 1998;**110**: 531-4.
  53. Sinha RK, Kelton JG: Current controversies concerning the measurement of platelet-associated IgG. *Transfus Med Rev.* 1990;**4**: 121-35.
  54. Warner MN, Moore JC, Warkentin TE, Santos AV, Kelton JG: A prospective study of protein-specific assays used to investigate idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 1999;**104**: 442-7.
  55. Curtis BR, McFarland JG, Wu GG, Visentin GP, Aster RH: Antibodies in sulfonamide-induced immune thrombocytopenia recognize calcium-dependent epitopes on the glycoprotein IIb/IIIa complex. *Blood.* 1994;**84**: 176-83.
  56. Huisman JG: Immunoblotting: an emerging technique in immunohematology. *Vox Sang.* 1986;**50**: 129-36.
  57. Mulder A, van Leeuwen EF, Veenboer GJ, Tetteroo PA, von dem Borne AE: Immunochemical characterization of platelet-specific alloantigens. *Scand J Haematol.* 1984;**33**: 267-74.
  58. Santoso S, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C: Immunochemical characterization of the new platelet alloantigen system Bra/Brb. *Br J Haematol.* 1989;**72**: 191-8.
  59. McMillan R, Tani P, Millard F, Berchtold P, Renshaw L, Woods VL, Jr.: Platelet-associated and plasma anti-glycoprotein autoantibodies in chronic ITP. *Blood.* 1987;**70**: 1040-5.

60. Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, Mueller-Eckhardt C: Monoclonal antibody--specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood*. 1987;**70**: 1722-6.
61. Kiefel V: The MAIPA assay and its applications in immunohaematology. *Transfus Med*. 1992;**2**: 181-8.
62. Kiefel V: Platelet antibodies and diagnosis of immune-mediated thrombocytopenia. *Infusionsther Transfusionsmed*. 2001;**28**: 209-17.
63. Nguyen XD, Dugrillon A, Beck C, Kerowgan M, Kluter H: A novel method for simultaneous analysis of specific platelet antibodies: SASPA. *Br J Haematol*. 2004;**127**: 552-60.
64. Meyer O, Hildebrandt M, Schulz B, Blasczyk R, Salama A: Simultaneous genotyping of human platelet antigens (HPA) 1 through 6 using new sequence-specific primers for HPA-5. *Transfusion*. 1999;**39**: 1256-8.
65. Hurd CM, Cavanagh G, Schuh A, Ouwehand WH, Metcalfe P: Genotyping for platelet-specific antigens: techniques for the detection of single nucleotide polymorphisms. *Vox Sang*. 2002;**83**: 1-12.
66. Nauck MS, Gierens H, Nauck MA, Marz W, Wieland H: Rapid genotyping of human platelet antigen 1 (HPA-1) with fluorophore-labelled hybridization probes on the LightCycler. *Br J Haematol*. 1999;**105**: 803-10.
67. Kretzschmar E, Von Ahsen N, Trobisch H: Rapid genotyping of human platelet antigen 5 with fluorophore-labelled hybridization probes on the LightCycler. *Br J Haematol*. 2001;**114**: 397-9.
68. Warkentin TE: Heparin-induced thrombocytopenia: pathogenesis and management - Response to Rasheed Saad. *Br J Haematol*. 2003;**123**: 374-5.
69. Suh JS, Aster RH, Visentin GP: Antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis recognize different epitopes on heparin: platelet factor 4. *Blood*. 1998;**91**: 916-22.
70. Ziporen L, Li ZQ, Park KS, Sabnekar P, Liu WY, Arepally G, Shoenfeld Y, Kieber-Emmons T, Cines DB, Poncz M: Defining an antigenic epitope on platelet factor 4 associated with heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 1998;**92**: 3250-9.
71. Li ZQ, Liu W, Park KS, Sachais BS, Arepally GM, Cines DB, Poncz M: Defining a second epitope for heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis antibodies using KKO, a murine HIT-like monoclonal antibody. *Blood*. 2002;**99**: 1230-6.
72. Newman PM, Chong BH: Further characterization of antibody and antigen in heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol*. 1999;**107**: 303-9.
73. Greinacher A, Potzsch B, Amiral J, Dummel V, Eichner A, Mueller-Eckhardt C: Heparin-associated thrombocytopenia: isolation of the antibody and characterization of a multimolecular PF4-heparin complex as the major antigen. *Thromb Haemost*. 1994;**71**: 247-51.
74. Visentin GP, Ford SE, Scott JP, Aster RH: Antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia/thrombosis are specific for platelet factor 4 complexed with heparin or bound to endothelial cells. *J Clin Invest*. 1994;**93**: 81-8.

75. Newman PM, Chong BH: Heparin-induced thrombocytopenia: new evidence for the dynamic binding of purified anti-PF4-heparin antibodies to platelets and the resultant platelet activation. *Blood*. 2000;**96**: 182-7.
76. Lee DH, Warkentin TE, Denomme GA, Hayward CP, Kelton JG: A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia: detection of platelet microparticles using flow cytometry. *Br J Haematol*. 1996;**95**: 724-31.
77. Hughes M, Hayward CP, Warkentin TE, Horsewood P, Chorneyko KA, Kelton JG: Morphological analysis of microparticle generation in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 2000;**96**: 188-94.
78. Cines DB, Tomaski A, Tannenbaum S: Immune endothelial-cell injury in heparin-associated thrombocytopenia. *N Engl J Med*. 1987;**316**: 581-9.
79. Arepally GM, Mayer IM: Antibodies from patients with heparin-induced thrombocytopenia stimulate monocytic cells to express tissue factor and secrete interleukin-8. *Blood*. 2001;**98**: 1252-4.
80. Sheridan D, Carter C, Kelton JG: A diagnostic test for heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. 1986;**67**: 27-30.
81. Chong BH, Eisbacher M: Pathophysiology and laboratory testing of heparin-induced thrombocytopenia. *Semin Hematol*. 1998;**35**: 3-8.
82. Greinacher A, Michels I, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C: A rapid and sensitive test for diagnosing heparin-associated thrombocytopenia. *Thromb Haemost*. 1991;**66**: 734-6.
83. Amiral J, Bridey F, Dreyfus M, Vissoc AM, Fressinaud E, Wolf M, Meyer D: Platelet factor 4 complexed to heparin is the target for antibodies generated in heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost*. 1992;**68**: 95-6.
84. Visentin GP, Moghaddam M, Collins JL, McFarland JG, Aster RH: Antibodies associated with heparin-induced thrombocytopenia (HIT) report conformational changes in platelet factor 4 (PF4) induced by linear polyanionic compounds. *Blood*. 1997;**90**: 460a.
85. Lapierre Y, Rigal D, Adam J, Josef D, Meyer F, Greber S, Drot C: The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions. *Transfusion*. 1990;**30**: 109-13.
86. Salama A, Berghofer H, Mueller-Eckhardt C: Detection of cell-drug (hapten)-antibody complexes by the gel test. *Transfusion*. 1992;**32**: 554-6.
87. Schwind P, Bashforth D, Hobbs R, Margetts G, Marschall M, Roberts MJJ: Use of synthetic particles as reagents in agglutination reaction. *Patentblatt*. 2001;**2001/19**: EP0849595.
88. Amiral J, Marfaing-Koka A, Wolf M, Alessi MC, Tardy B, Boyer-Neumann C, Vissac AM, Fressinaud E, Poncz M, Meyer D: Presence of autoantibodies to interleukin-8 or neutrophil-activating peptide-2 in patients with heparin-associated thrombocytopenia. *Blood*. 1996;**88**: 410-6.
89. Meyer O, Aslan T, Koster A, Kiesewetter H, Salama A: Report of a patient with heparin-induced thrombocytopenia type II associated with IgA antibodies only. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2006;**12**: 373-5.
90. Antonijevic N, Stanojevic M, Perunicic J, Djokic M, Mikovic D, Kovac M, Miljic P, Milosevic R, Terzic B, Vasiljevic Z: [Thrombocytopenia induced by type II

- heparin and myocardial infarct: 2 case reports]. *Srp Arh Celok Lek.* 2004;**132**: 33-7.
91. Risch L, Bertschmann W, Heijnen IA, Huber AR: A differentiated approach to assess the diagnostic usefulness of a rapid particle gel immunoassay for the detection of antibodies against heparin-platelet factor 4 in cardiac surgery patients. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2003;**14**: 99-106.
  92. Warkentin TE, Sheppard JA: Testing for heparin-induced thrombocytopenia antibodies. *Transfus Med Rev.* 2006;**20**: 259-72.
  93. Berchtold P, Wenger M: Autoantibodies against platelet glycoproteins in autoimmune thrombocytopenic purpura: their clinical significance and response to treatment. *Blood.* 1993;**81**: 1246-50.
  94. Sanderson CJ, Wilson DV: A simple method for coupling proteins to insoluble polysaccharides. *Immunology.* 1971;**20**: 1061-5.
  95. Peng L, Calton GJ, Burnett JW: Effect of borohydride reduction on antibodies. *Appl Biochem Biotechnol.* 1987;**14**: 91-9.
  96. Seltsam A, Agaylan A, Grueger D, Meyer O, Blasczyk R, Salama A: Rapid detection of anti-Lu(b) with recombinant Lu(b) protein and the particle gel immunoassay. *Transfusion.* 2008;**48**: 731-4.
  97. Seltsam A, Agaylan A, Grueger D, Meyer O, Blasczyk R, Salama A: Rapid detection of JMH antibodies with recombinant Sema7A (CD108) protein and the particle gel immunoassay. *Transfusion.* 2008.
  98. Bakchoul T, Meyer O, Agaylan A, Bombard S, Bein G, Sachs UJ, Salama A, Santoso S: Rapid detection of HPA-1 alloantibodies by platelet antigens immobilized onto microbeads. *Transfusion.* 2007;**47**: 1363-8.
  99. Diamandis EP, Christopoulos TK: The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clin Chem.* 1991;**37**: 625-36.
  100. Agaylan A, Binder D, Sauer M, Neuweiler H, Meyer O, Kiesewetter H, Salama A: A highly sensitive particle agglutination assay for the detection of P53 autoantibodies in patients with lung cancer. *Cancer.* 2007;**110**: 2502-6.
  101. Maxime AG, Hudson AQ, Borders CL: Stability of water-soluble carbodiimides in aqueous solution. *Analytical Biochemistry.* 1990;**184**: 244-8.
  102. Sehgal D, Vijay IK: A method for the high efficiency of water soluble carbodiimide-mediated amidation. *Analytical Biochemistry.* 1994;**218**: 87-91.
  103. Schonemann C, Abou-Chaker K, Bombard S, Meyer O, Salama A: Application of the particle gel agglutination system as a new check gel assay for PCR products. *Int J Immunogenet.* 2007;**34**: 337-9.
  104. Eastman PJ, Baier KA, Bryan CF: HLA-B27 typing. A comparative evaluation between the standard NIH method and flow cytometry. *Ann N Y Acad Sci.* 1993;**677**: 402-3.
  105. Hulstaert F, Albrecht J, Hannel I, Lancaster P, Buchner L, Kunz J, Falkenrodt A, Tongio M, De Keyser F, Veys EM, et al.: An optimized method for routine HLA-B27 screening using flow cytometry. *Cytometry.* 1994;**18**: 21-9.
  106. Orr K, Thomson GT, Alfa M: Utilization of commercial antisera and flow cytometry in HLA-B27 typing. *Cytometry.* 1994;**18**: 17-20.

107. Khan MA: Update on spondyloarthropathies. *Ann Intern Med.* 2002;**136**: 896-907.
108. Listi F, Candore G, Balistreri CR, Grimaldi MP, Orlando V, Vasto S, Colonna-Romano G, Lio D, Licastro F, Franceschi C, Caruso C: Association between the HLA-A2 allele and Alzheimer disease. *Rejuvenation Res.* 2006;**9**: 99-101.
109. Torres AR, Sweeten TL, Cutler A, Bedke BJ, Fillmore M, Stubbs EG, Odell D: The association and linkage of the HLA-A2 class I allele with autism. *Hum Immunol.* 2006;**67**: 346-51.
110. Liu JB, Li M, Chen H, Zhong SQ, Yang S, Du WD, Hao JH, Zhang TS, Zhang XJ, Zeegers MP: Association of vitiligo with HLA-A2: a meta-analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2007;**21**: 205-13.
111. Griffin HM, Ouwehand WH: A human monoclonal antibody specific for the leucine-33 (P1A1, HPA-1a) form of platelet glycoprotein IIIa from a V gene phage display library. *Blood.* 1995;**86**: 4430-6.
112. Agaylan A, Meyer O, Ahrens N, Dudenhausen J, Bombard S, Salama A: A rapid gel agglutination test for the determination of fetomaternal haemorrhage. *Transfus Med.* 2007;**17**: 395-8.
113. Meyer O, Salama A, Pittet N, Schwind P: Rapid detection of heparin-induced platelet antibodies with particle gel immunoassay (ID-HPF4). *Lancet.* 1999;**354**: 1525-6.
114. Meyer O, Agaylan A, Borchert HH, Aslan T, Bombard S, Kiesewetter H, Salama A: A simple and practical assay for the antigen-specific detection of platelet antibodies. *Transfusion.* 2006;**46**: 1226-31.
115. Meyer O, Agaylan A, Bombard S, Kiesewetter H, Salama A: A novel antigen-specific capture assay for the detection of platelet antibodies and HPA-1a phenotyping. *Vox Sang.* 2006;**91**: 324-30.
116. Meyer O, Abou-Chaker K, Heymann G, Bombard S, Kiesewetter H, Salama A: Human platelet antigen genotyping by using sequence-specific primers and the particle gel agglutination assay. *Vox Sang.* 2005;**88**: 271-4.



## **8. DANKSAGUNG**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Salama, der mich zu dieser Arbeit motivierte, ständig diskussionsbereit war und mich immer mit aller Kraft unterstützt hat.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. H. Kiesewetter, der mir mit seiner konstruktiven Diskussionsbereitschaft immer hilfreich zur Seite stand.

Großer Dank gilt den Mitarbeitern des Instituts für Transfusionsmedizin, insbesondere Frau C. Busse, Frau D. Elsner, Frau M. Möckel, Frau Schwarzat, Herrn Dr. Z. Abdallah, Herrn Dipl.-Ing Abou-Chaker, Herrn Dr. A. Agaylan und Herrn Dipl.-Ing. A. Alyasouri, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Ehefrau Barbara und meinen Kindern Katharina und Jakob, die diese Arbeit mit unglaublich viel Geduld, Verständnis und Verzicht ermöglicht haben.

## ERKLÄRUNG

§ 4 Abs 3 (k) HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 10. November 2008

Dr. Oliver Meyer