

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin der Universität Rostock
(ehemaliger Institutsleiter: Prof. Dr. med. V. Kiefel)

**Ein glykoproteinspezifischer Enzymimmuntest zum Nachweis von
thrombozytären Allo- und Autoantikörpern: Optimierung der
Testbedingungen**



Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)
der Universitätsmedizin Rostock

vorgelegt von
Anne Svea Rank
geboren am 24.02.1989 in Rostock

Rostock, April 2021

Gutachter:

Prof. Dr. med. Volker Kiefel, Universitätsmedizin Rostock, ehemaliger Leiter des Instituts für Transfusionsmedizin

Prof. Dr. med. Marek Lommatzsch, Universitätsmedizin Rostock, Abteilung für Pneumologie

Dr. med. Hartmut Kroll, DRK-Blutspendedienst NSTOB Dessau

Jahr der Einreichung: 2021

Jahr der Verteidigung: 2022

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Abbildungsverzeichnis	III
III	Tabellenverzeichnis	V
IV	Abkürzungsverzeichnis	VI

1	Einleitung	1
1.1	Das hämatopoetische System	1
1.2	Thrombozytopoese	1
1.3	Thrombozytenmorphologie	2
1.4	Hämostase	3
1.4.1	Primäre Hämostase	4
1.4.2	Sekundäre Hämostase	4
1.5	Thrombozytäre Adhäsionsmoleküle	5
1.5.1	Die thrombozytären Glykoproteinkomplexe IIb/IIIa und Ia/IIa	5
1.5.2	Der thrombozytäre Glykoproteinkomplex Ib/IX	6
1.5.3	Das thrombozytäre Glykoprotein CD109	8
1.6	Differenzierung zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen	8
1.7	Antigene auf Thrombozyten	8
1.8	Klinische Relevanz thrombozytärer Antikörper	11
1.9	Indikation zur immunologischen Typisierung von Thrombozyten	13
2	Ziel der Arbeit	15
3	Material und Methoden	16
3.1	Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien	16
3.1.1	Geräte	16
3.1.2	Verbrauchsmaterialien, gebrauchsfertige Reagenzien und Antikörper	16
3.1.3	Puffer und Lösungen	18
3.1.4	Patienten- und Blutspendermaterial	18
3.2	Isolierung von Thrombozyten	18
3.3	Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigens (MAIPA)-Assay	19

3.3.1	Indirekter MAIPA-Assay	19
3.3.2	Direkter MAIPA-Assay	21
3.4	Modifizierungen des MAIPA-Assay	22
3.4.1	MAIPA-Assay mit variablen Thrombozytenzahlen	22
3.4.2	Modifizierte Inkubationsbedingungen	23
3.4.3	Lagerung von Thrombozyten für den Anti-HPA-2b-Ak-Nachweis	25
3.4.4	Lagerung von Thrombozyten für den Anti-HPA-15b-Ak-Nachweis	26
3.4.5	Modifikation nach Hou	26
4	Ergebnisse	30
4.1	MAIPA-Assay mit variablen Thrombozytenzahlen	30
4.2	Modifizierte Inkubationsbedingungen	32
4.3	Lagerung von Testthrombozyten für den Anti-HPA-2b-Ak-Nachweis ohne und mit Zusatz von Leupeptin	36
4.4	Lagerung von Thrombozyten für den Anti-HPA-15b-Ak-Nachweis	39
4.5	Modifikation nach Hou	40
5	Diskussion	43
5.1	Teilschritte und zugehörige Inkubationsbedingungen des MAIPA-Assays	48
5.1.1	Modifizierte Inkubation der humanen und murinen Antikörper	49
5.1.2	Modifizierte Inkubation des trimolekularen Komplexes und Sekundär-Antikörpers	50
5.2	Einsatz und Lagerung der Testthrombozyten	51
5.2.1	Nachweis von Anti-HPA-2b-Ak	53
5.2.2	Nachweis von Anti-HPA-15b-Ak	54
5.3	Limitationen	55
5.4	Ausblick	56
6	Zusammenfassung	58
7	Thesen	59
8	Literaturverzeichnis	61
9	Anhang	73
10	Danksagung	77
11	Curriculum Vitae	78
12	Eidesstattliche Erklärung	79

II **Abbildungsverzeichnis**

- Abb. 1: Übersicht der Hämatopoese
- Abb. 2: Schematische Darstellung der Ultrastruktur ruhender Thrombozyten
- Abb. 3: Thrombozytenadhäsion, -aktivierung und -aggregation im Rahmen der primären Hämostase
- Abb. 4: vWF-Rezeptor (GPIb/IX) und Fibrinogen-Rezeptor (GPIIb/IIIa) auf der Thrombozytenmembran
- Abb. 5: Die thrombozytären Glykoproteine GPIa/IIa, GPIIb/IIIa, CD109 und GPIb/IX/V-Komplex mit Lokalisation der korrespondierenden HPA
- Abb. 6: Schematische Darstellung des MAIPA-Assays
- Abb. 7: Variation der Testthrombozytenzahl und der Inkubationsbedingungen
- Abb. 8: Alter der Testthrombozyten beim Zusatz von Leupeptin
- Abb. 9: Schematische Darstellung des MAIPA-Assays nach Hou
- Abb. 10: Signalintensität in Abhängigkeit von der Zahl der Testthrombozyten zum Nachweis von Anti-HPA-1a- und -HPA-5b-Ak im Serum
- Abb. 11: Signalintensität in Abhängigkeit von der Zahl der Testthrombozyten mit Auto-Ak-haltigen Seren
- Abb. 12: Veränderte Inkubationsbedingungen des trimolekularen Komplexes mit dem Fängerantikörper
- Abb. 13: Veränderte Inkubationsbedingungen des trimolekularen Komplexes mit dem Fängerantikörper mit Auto-Ak-haltigen Seren
- Abb. 14: Veränderte Inkubationsbedingungen des Peroxidase-konjugierten Antikörpers mit den humanen plättchenreaktiven Antikörpern

- Abb. 15: Veränderte Inkubationsbedingungen des Peroxidase-konjugierten Antikörpers mit den humanen plättchenreaktiven Antikörpern mit Auto-Ak-haltigen Seren
- Abb. 16: Lagerung der Testthrombozyten für den Nachweis von Anti-HPA-2b-Ak
- Abb. 17: Abhängigkeit des Alters der Testthrombozyten für den Anti-HPA-2b-Ak-Nachweis
- Abb. 18: Lagerung der Testthrombozyten für den Nachweis von Anti-HPA-15b-Ak
- Abb. 19: Standard- und nach Hou modifiziertes Protokoll zum Nachweis von Anti-HPA-1-Ak und Anti-HPA-5-Ak
- Abb. 20: Standard- und nach Hou modifiziertes Protokoll für den Nachweis von Anti-HLA-I-Ak und Anti-HPA-15b-Ak
- Abb. 21: Standard- und nach Hou modifiziertes Protokoll zur Analyse Auto-Ak-haltiger Seren
- Abb. 22: Schematische Übersicht zur Evolution der Methoden zum Nachweis thrombozytärer Antikörper
- Abb. 23: Extinktion als Resultat des mehrschrittigen MAIPA-Assays
- Abb. 24: Standard- und nach Hou modifiziertes Protokoll für den Nachweis von Anti-HPA-1a-Ak mit allen eingesetzten Seren
- Abb. 25: Standard- und nach Hou modifiziertes Protokoll zum Nachweis von HLA-I-Ak mit dem HLA-Pool und den einzelnen HLA-I-Thrombozyten

III Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Die häufigsten HPA
Tab. 2:	Variable Zahl der Testthrombozyten/well
Tab. 3:	Verwendete Seren im Rahmen dieser Arbeit
Tab. 4:	Ergebnisse der Ringversuche zum Nachweis thrombozytärer Antikörper
Tab. 5:	Zahl der Testthrombozyten in ausgewählten Arbeiten
Tab. 6:	Verwendete Seren für die Teilschritte des MAIPA-Assay
Tab. 7:	MAIPA-Assay mit variablen Testthrombozytenzahlen: Negativkontrollen mit Anti-HPA-1a-Ak-haltigen Seren
Tab. 8:	MAIPA-Assay mit variablen Testthrombozytenzahlen: Negativkontrollen mit Anti-HPA-5b-Ak-haltigen Seren

IV Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
AS	Aminosäure
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FNAIT	Fetale/Neonatale Alloimmunthrombozytopenie
GP	Glykoprotein
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
HLA	human leukocyte antigen
HPA	human platelet antigen
ISBT	International Society of Blood Transfusion
ITP	Immunthrombozytopenie
MAIPA	Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigens
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	major histocompatibility complex
MR-MAIPA	Modified-Rapid MAIPA-Assay
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MT-Platte	Mikrotiter-Platte
OPD	ortho-Phenylendiamin-dihydrochlorid
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PTP	Posttransfusionelle Purpura
RT	Raumtemperatur
SASPA	Simultaneous Analysis of Specific Platelet Antibodies
SDS-PAGE	Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
SPR	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

TBS	Tris-Buffered Saline
VLA-2	Very Late Antigen 2
vWF	von-Willebrand-Faktor

Meiner kleinen und großen Familie.

1 Einleitung

1.1 Das hämatopoetische System

Die zellulären Elemente des Blutes differenzieren sich im Knochenmark aus pluripotenten Stammzellen über lymphatische bzw. myeloische Vorläuferzellen in Lymphozyten, Thrombozyten, Erythrozyten, Monozyten und Granulozyten (Abb. 1).

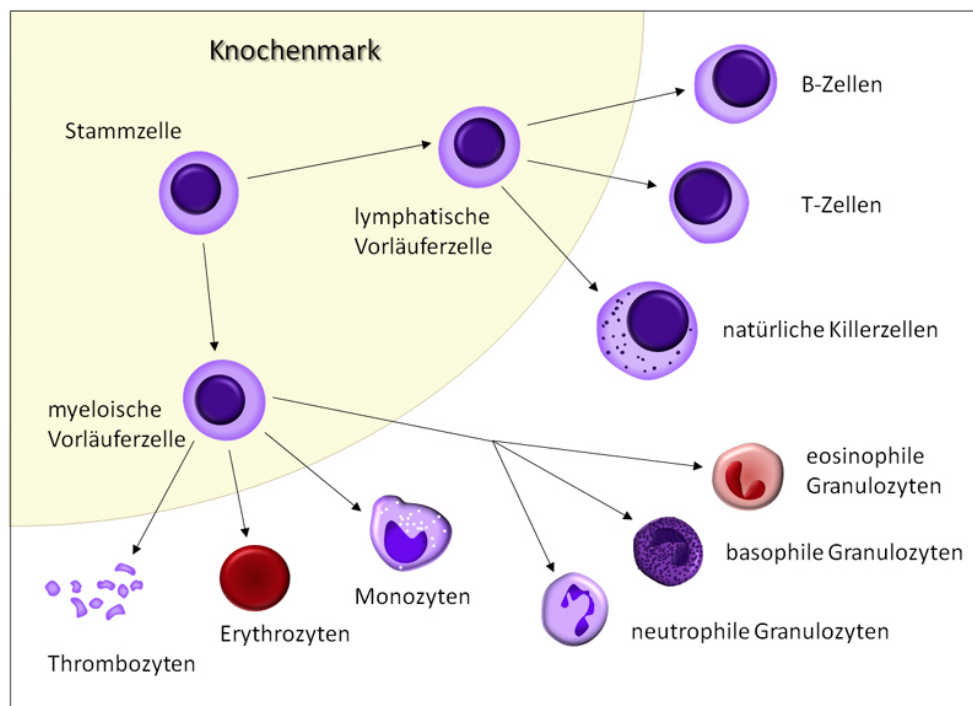


Abb. 1: Übersicht der Hämatopoese (Hehn 2014). Die Differenzierung pluripotenter Stammzellen in lymphatische und myeloische Vorläuferzellen ist Voraussetzung für die Entwicklung von Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten.

1.2 Thrombozytopoese

Thrombozyten sind mit einem Durchmesser von 1,5 - 3,0 µm die kleinsten korpuskulären Blutbestandteile. Sie sind kernlos und entstehen im Knochenmark aus Megakaryozyten durch die Abschnürung von Zytoplasmaausläufern, die mit Organellen und Proteinen des Zytoskeletts ausgestattet sind. Diese Prothrombozyten werden nach Fragmentierung als reife Thrombozyten in die Zirkulation ausgeschwemmt und zu einem geringen Anteil in der Milz gespeichert. Thrombozyten haben eine Lebensspanne von

etwa 7 - 10 Tagen und werden im retikuloendothelialen System sowie über die Bindung an Ashwell-Morell-Rezeptoren in der Leber abgebaut. Allerdings erfolgt die Bindung an diesen Rezeptor erst nach Abspaltung der Sialinsäure-Reste von den Proteinen und/oder Lipiden der Thrombozytenmembran. Gleichzeitig aktiviert die Bindung desialylierter Thrombozyten an den Ashwell-Morell-Rezeptor die Synthese des für die Thrombozytopoese essentiellen Thrombopoetins (Grozovsky et al. 2015, Matzdorff et al. 2018).

Unter physiologischen Bedingungen sind zwischen 150.000 - 400.000 Thrombozyten/ μ l Blut vorhanden (Schulze 2010). Der Thrombozytenumsatz ist neben der Thrombozytenzahl abhängig von der mittleren Thrombozytenüberlebenszeit und der Milzgröße und beträgt bei gesunden Individuen etwa 44.000 Thrombozyten/ μ l pro Tag (Branehög et al. 1974).

1.3 Thrombozytenmorphologie

Entsprechend der Morphologie werden innerhalb der Thrombozyten die periphere Zone, die strukturelle Zone, die Zone der Organellen und die Zone der Membransysteme unterschieden (Abb. 2).

Die periphere Zone ist durch die aus Lipiden bestehende Zellmembran mit der aus transmembranösen bzw. membranständigen Glykoproteinen (GP), Glycosphingolipiden und glykosylierten Lipiden gebildeten Glykokalyx gekennzeichnet. Die membranständigen GP sind für die Hämostase in mehrfacher Hinsicht essentiell. Zum einen ermöglichen sie als Rezeptoren die Thrombozytenadhäsion und -aggregation und zum anderen stellen sie durch konsekutive Aktivierung spezifischer Signalwege die Kommunikation der Thrombozyten untereinander sowie zwischen Thrombozyten und anderen Zellen sicher.

Die strukturelle Zone ist für die Formänderung der Thrombozyten verantwortlich und beinhaltet die Membranproteine des Zytoskeletts. In der Zone der Organellen befinden sich thrombozytäre Speicher (Lysosomen, alpha-Granula und elektronendichte Granula), die Proteine zur Chemotaxis, Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten enthalten. Die Zone der Membransysteme besteht aus dem offenen kanalikulären System und dem dichten tubulären System. Ersteres stellt ein weit in das Plättcheninnere hineinreichendes und mit der Plasmamembran verbundenes Kanalsystem dar, welches bei der Plättchenaktivierung nach außen verlagert wird und

so die Oberfläche der Thrombozyten vergrößert. Das dichte tubuläre System ist der Hauptspeicherort für freie Calciumionen, die eine Rolle bei der Thrombozytenaktivierung spielen (Madlener 2010).

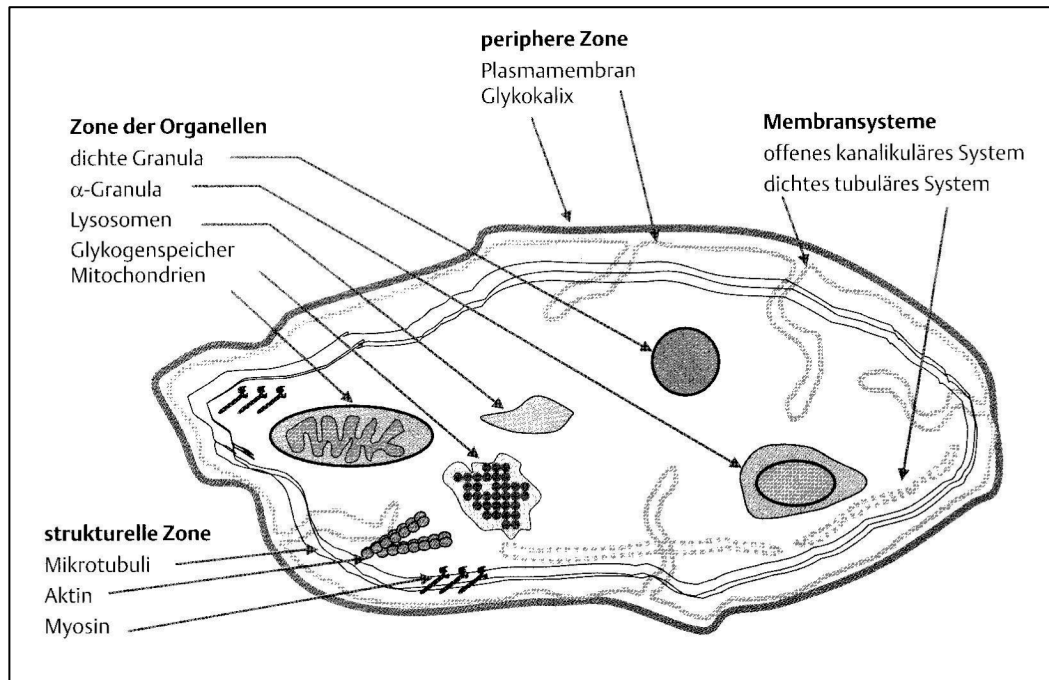


Abb. 2: Schematische Darstellung der Ultrastruktur ruhender Thrombozyten (Gawaz 1999). Innerhalb der Thrombozyten werden entsprechend der Morphologie die periphere Zone, die strukturelle Zone, die Zone der Organellen und die Zone der Membransysteme unterschieden.

1.4 Hämostase

Die Blutstillung wird durch ein koordiniertes Zusammenspiel aus zellulären und plasmatischen Gerinnungsfaktoren gewährleistet. Unter physiologischen Bedingungen stehen hämostasefördernde und hämostasehemmende Faktoren in einem streng kontrollierten Gleichgewicht. Defizite, Defekte und genetisch determinierte Varianten der zellulären oder plasmatischen Komponenten können diese Balance stören und je nach betroffener Komponente zu Blutungsneigung bzw. Thrombosebildung führen.

1.4.1 Primäre Hämostase

Die in der Blutbahn zirkulierenden Thrombozyten gewährleisten die Integrität des Gefäßsystems. Unter physiologischen Bedingungen und bei intaktem Gefäßendothel zirkulieren sie in diskoider Form in engem Kontakt zur Gefäßwand. Werden als Folge von Verletzungen die subendotheliale Matrix und/oder der von-Willebrand-Faktor (vWF) exponiert, kommt es zur Adhäsion der Thrombozyten in diesem Bereich. Die Interaktion mit dem vWF erfolgt über die GPIb α -Untereinheit des GPIb/IX/V-Komplexes und führt zur Aktivierung der Thrombozyten mit konsekutiver Reorganisation des Zytoskeletts. Aktivierte Thrombozyten ändern innerhalb von Sekunden ihre Gestalt und vergrößern durch Ausstülpung der Pseudopodien ihre Oberfläche (Reininger and Schramm 2011, Gear 1984). Die Aktivierung weiterer Rezeptoren und die Freisetzung von Thromboxan A₂, ADP, Serotonin sowie anderen Mediatoren aus den Granula fördern die Adhäsion weiterer Thrombozyten (Abb. 3).

Die Thrombozytenaggregation wird durch GPIIb/IIIa (Fibrinogenrezeptor) vermittelt. Fibrinogen verbindet jeweils zwei GPIIb/IIIa-Rezeptoren auf benachbarten Thrombozyten und stabilisiert das Thrombozytenaggregat (Greinacher 2010).

1.4.2 Sekundäre Hämostase

Die sekundäre Hämostase wird durch sequentielle Aktivierung der Gerinnungsfaktoren über den extrinsischen oder intrinsischen Weg ausgelöst und endet in einer gemeinsamen Endstrecke. Diese führt zur Umwandlung von löslichem Fibrinogen zu unlöslichem Fibrin, das den Plättchenthrombus verfestigt und so die Ablösung durch hämodynamische Kräfte verhindert (Klages and Lindhoff-Last 2015).

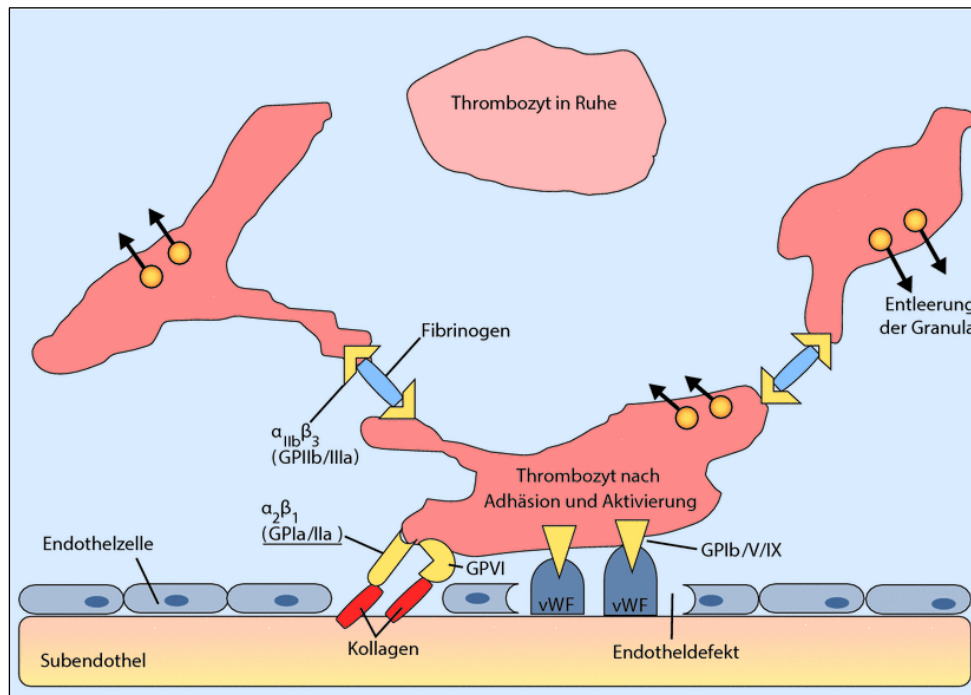


Abb. 3: Thrombozytenadhäsion, -aktivierung und -aggregation im Rahmen der primären Hämostase (Zieger B. 2018). Als Antwort auf eine Gefäßverletzung kommt es durch Interaktion des von-Willebrand-Faktors (vWF) mit dem thrombozytären GPIb/IX/V zur Adhäsion und nachfolgender Aktivierung der Thrombozyten mit Freisetzung spezifischer Mediatoren aus den Granula. Über GPIIb/IIIa (und GPIIb/IIIa) erfolgt die Bindung an Kollagen und über GPIIb/IIIa kommt es zur Aggregation der Thrombozyten mit der Bildung eines (noch lockeren) Thrombus.

1.5 Thrombozytäre Adhäsionsmoleküle

Trotz ihres fehlenden Zellkerns verfügen Thrombozyten über genetische Informationen. Die vermutlich von den megakaryozytären Vorläufern stammende Messenger-RNA (mRNA) befähigt die Blutplättchen zur de-novo-Proteinbiosynthese und ermöglicht ihnen damit Einfluss auf ihre unmittelbare Umgebung zu nehmen (Kieffer 1987, Weyrich 1998, Bugert and Klüter 2010). Darüber hinaus werden in den Granula gespeicherte Mediatoren entweder freigesetzt oder in die Zellmembran transloziert.

1.5.1 Die thrombozytären Glykoproteinkomplexe IIb/IIIa und Ia/Ia

Der GPIIb/IIIa-Komplex (Fibrinogenrezeptor) ist ein Glykoprotein aus der Familie der Integrine und wird ausschließlich auf Thrombozyten und deren Vorläuferzellen sowie

Tumoren exprimiert (Chang et al. 1991). Mit einer Dichte von 50.000-80.000 Rezeptoren pro Plättchen ist es das häufigste Rezeptorprotein auf Thrombozyten. Zusätzlich sind weitere GPIIb/IIIa Moleküle in den α -Granula und dem offenen kanalikulären System gespeichert (Wagner et al. 1996). Von dort werden sie im Rahmen der Thrombozytenaktivierung und dem damit einhergehenden Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration freigesetzt (Greinacher 2010). Ein Defekt in den Untereinheiten des GPIIb/IIIa-Komplexes führt zur autosomal-rezessiv vererbten Glanzmann-Thrombasthenie, die durch eine gestörte (reduzierte) Fähigkeit thrombozytäre Aggregation mit unterschiedlich stark ausgeprägten Haut- und Schleimhautblutungen charakterisiert ist.

Der GPIa/IIa-Komplex gehört ebenfalls zu den Integrinen, wird neben Thrombozyten auch auf Lymphozyten exprimiert und dann als VLA-2 (Very Late Antigen-2) bezeichnet. Auf jedem Thrombozyten befinden sich etwa 2.000 - 4.000 GPIa/IIa-Rezeptoren. Hauptaufgabe dieses Rezeptors ist die mit einer Konformationsänderung einhergehende Bindung an Kollagen und nachfolgender Aktivierung der Thrombozyten durch die Interaktion mit GPVI (Santoro et al. 1991, Jung and Moroi 2000).

1.5.2 Der thrombozytäre Glykoproteinkomplex Ib/IX

Der GPIb/IX-Komplex gehört zu den leucinreichen Rezeptoren und kommt mit einer Dichte von circa 60.000 Rezeptoren/Thrombozyt vor. Er ist ausschließlich auf Thrombozyten und Megakaryozyten exprimiert und ist der wichtigste Rezeptor für den vWF. GPIb/IX besteht aus den Untereinheiten GPIb α , GPIb β und GPIX (Abb. 4).

Die extrazelluläre Domäne der Ib α -Kette enthält die Bindungsstellen für den vWF und Thrombin und kann durch Calpain von der Thrombozytenmembran abgegeben werden (Greinacher 2010). Zwischen zwei GPIb/IX-Komplexen liegt jeweils ein GPV, welches nur schwach mit den anderen Untereinheiten verbunden ist. Wurde zunächst davon ausgegangen, dass sich das stöchiometrische Verhältnis von GPIb/IX zu GPV auf 2:1 beläuft (Modderman et al. 1992) und GPV zwischen zwei benachbarten GPIb α -Einheiten des GPIb/IX-Komplex gebunden ist (Li et al. 1995), so konnte von Burkhart et al. ein Verhältnis von 1:1 beschrieben werden (Burkhart et al. 2012).

Eine hereditäre Mutation in einer der drei Untereinheiten des Komplexes kann zum Krankheitsbild des Bernard-Soulier-Syndroms führen, welches durch eine erhöhte Blutungsneigung bei gleichzeitigen Makrothrombozyten charakterisiert ist (López et al. 1998).

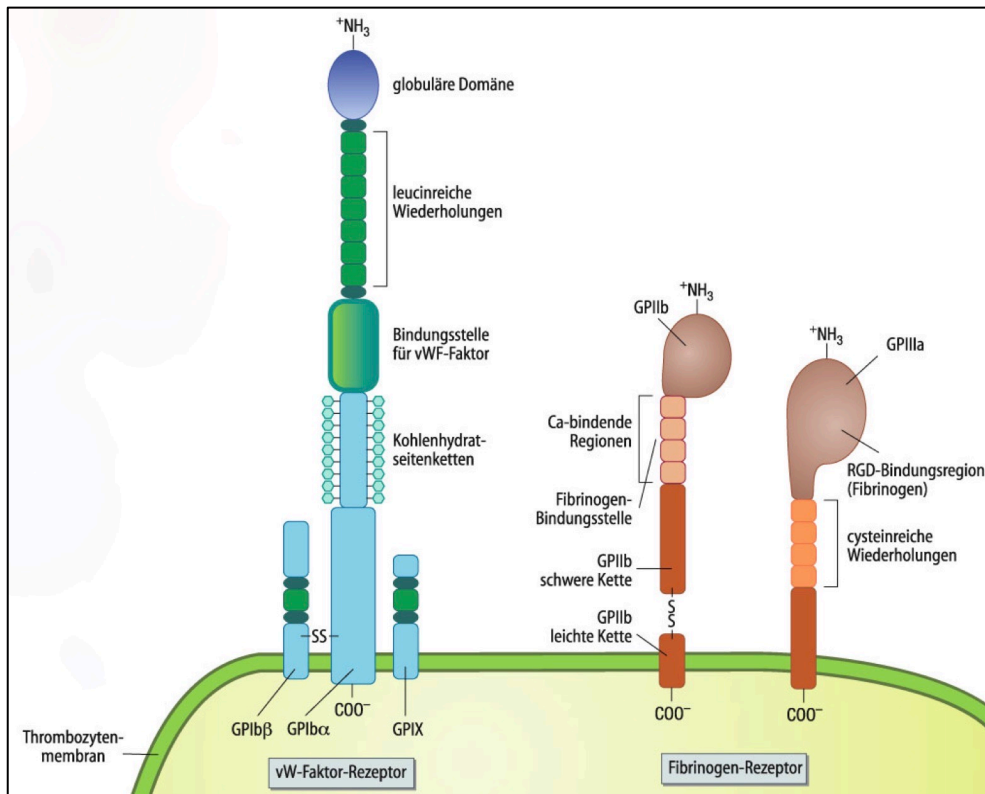


Abb. 4: vWF-Rezeptor (GPIb/IX) und Fibrinogen-Rezeptor (GPIIb/IIIa) auf der Thrombozytenmembran (Heinrich et al. 2014). Der **GPIb/IX-Komplex** besteht aus einer über Disulfidbrücken verbundenen Iba- und Ibβ-Kette, sowie dem nicht-kovalent mit GPIbβ verbundenen GPIIX. Alle Untereinheiten bestehen aus einer Ektodomäne, einer Transmembrandomäne sowie einer kleinen zytosplasmatischen Domäne. Die globuläre, extrazelluläre Domäne der Iba-Kette ragt weit über die Thrombozytenoberfläche hinaus und ermöglicht den an der Gefäßwand rollenden Thrombozyten die Interaktion mit dem vWF. Die zytosplasmatische Domäne des GPIba ist fest mit dem thrombozytären Zytoskelett verbunden und stabilisiert den Komplex. Der **GPIIb/IIIa-Komplex** ist ein Heterodimer aus den nicht-kovalent gebundenen Untereinheiten IIb und IIIa. GPIIb besteht aus einer leichten (zytoplasmatische und transmembranöse Domäne) und einer schweren Kette (extrazelluläre Domäne), die durch Disulfidbrücken verbunden sind. An der Ektodomäne ist die Bindungsstelle für Fibrinogen lokalisiert. GPIIIa ist ein transmembranöses Protein und besitzt ebenfalls eine Bindungsstelle für Fibrinogen (Greinacher 2010).

1.5.3 Das thrombozytäre Glykoprotein CD109

CD109 ist ein Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI) - verankertes Membranglykoprotein, das von aktivierten Thrombozyten exprimiert wird und Träger des ursprünglich als „Gov“ bezeichneten HPA-15-Antigensystems ist (Lin et al. 2002, Kelton et al. 1990). Der Nachweis von Antikörpern (Ak) gegen HPA-15 wird durch die niedrige und sehr variable Dichte von CD109 auf der Thrombozytenmembran sowie die Instabilität des Proteins im Rahmen der Isolierung und Lagerung von Thrombozyten erschwert (Ertel et al. 2005).

1.6 Differenzierung zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen

Das Immunsystem ist eines der größten Organsysteme des Körpers und umfasst verschiedene Organe sowie eine Vielzahl zellulärer Elemente. Es unterscheidet zwischen körpereigenen („selbst“) und körperfremden („fremd“) Strukturen und Organismen und ist damit für die Abwehr von Infektionen verantwortlich.

Die Unterscheidung zwischen *selbst* und *fremd* ist bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen gestört. Nicht nur pathogene Mikroorganismen, sondern auch einander entsprechende Strukturen auf Zellen genetisch verschiedener Individuen können strukturelle Unterschiede aufweisen. Wenn diese bei Übertragung von Zellen, Geweben und Plasma zu Immunreaktionen führen, wird von Alloantigenen gesprochen. Abgesehen von der wichtigen Rolle, die die Genprodukte des major histocompatibility complex (MHC, beim Menschen human leukocyte antigens, HLA) bei der Immunantwort spielen, sind HLA-Antigene selbst auch Alloantigene mit einem ausgeprägten Polymorphismus (Fleischer 2010).

1.7 Antigene auf Thrombozyten

Wie alle Körperzellen exprimieren auch Thrombozyten HLA-Klasse-I-Antigene sowie zusätzlich ABH-Antigene.

Basis für die Differenzierung der ABH-Antigene auf Thrombozyten und Erythrozyten sind Oligo- und Polysaccharide, die an membranständigen Lipo-und/oder Glyko-Proteinen gebunden sind, in den extrazellulären Raum hineinragen und so für zirkulierende Zellen sichtbar sind.

HLA-A und HLA-B konnten in großer Zahl auf der Thrombozytenmembran nachgewiesen werden, HLA-C-Antigene sind dagegen nur relativ schwach exprimiert (Mueller-Eckhardt et al. 1980).

Während mehrere der primär als thrombozytenspezifisch bezeichneten GP bzw. GP-Komplexe inzwischen auch auf Endothelzellen, aktivierten Lymphoblasten und anderen Zelltypen nachgewiesen werden konnten (Santoso and Kiefel 2001), sind die Glykoproteine IIb und Ib/IX ausschließlich auf Thrombozyten lokalisiert (Kiefel and Santoso 2010).

Thrombozytenspezifische Antigene stellen genetisch determinierte Polymorphismen der Glykoproteinkomplexe IIb/IIIa, Ib/IX, Ia/IIa und CD109 dar und bilden das Humane Plättchen Antigen (HPA) System. Diese Polymorphismen führen zu geringfügig verschiedenen Coreproteinen der genannten GP, beeinträchtigen die biologische Funktion in der Regel nicht, können aber zur Bildung von Ak führen (Metcalfe et al. 2003). Die von von dem Borne und Décary initiierte einheitliche Nomenklatur für die Bezeichnung der thrombozytären Alloantigene (von dem Borne and Décary 1990) besteht aus:

1. dem Terminus HPA für human platelet antigen
2. einer laufenden Nummer entsprechend der Reihenfolge ihrer Erstbeschreibung
3. einem lateinischen Buchstaben in der der Häufigkeit entsprechenden alphabetischen Reihenfolge

Noch nicht vollständig beschriebene Allele erhalten zusätzlich ein „w“ für workshop.

Derzeit sind 41 thrombozytäre Alloantigene beschrieben (Versiti October 2020), von denen 12 in 6 biallelen Gruppen zusammengefasst sind.

Alle Polymorphismen bzw. dadurch bedingte Änderungen der Aminosäuresequenz betreffen die extrazelluläre Domäne der GP und sind damit für das Immunsystem sichtbar (Tab.1, Abb. 5).

Tab. 1: Die häufigsten HPA (EMBL-EBI 2015)

HPA-System	Glykoprotein	Antigen	Aminosäure (Position)	Phänotyp in %
HPA-1	GPIIIa (CD61)	HPA-1a	Leucin (33)	D: 97,5
		HPA-1b	Prolin (33)	D: 30,8
HPA-2	GPIb (CD42b)	HPA-2a	Threonin (145)	D: 99,8
		HPA-2b	Methionin (145)	D: 11,8
HPA-3	GPIIb (CD41)	HPA-3a	Isoleucin (843)	D: 86,1
		HPA-3b	Serin (843)	D: 62,9
HPA-4	GPIIa (CD61)	HPA-4a	Arginin (143)	D: >99,9
		HPA-4b	Glutamin (143)	D: < 0,1/J: 1,7
HPA-5	GPIa (CD49b)	HPA-5a	Glutaminsäure (505)	D: 98,8
		HPA-5b	Lysin (505)	D: 20,7
HPA-15	CD109	HPA-15a	Serin (703)	UK: 80,5
		HPA-15b	Tyrosin (703)	UK: 60,2

D: Deutschland, J: Japan, UK: United Kingdom, AS: Aminosäure; modifiziert nach (Kiefel 2010b)

Das HPA-1-System hat innerhalb der kaukasischen Bevölkerung den größten klinischen Stellenwert. Die molekularbiologischen Grundlagen dieses Polymorphismus (L34P) wurden 1989 entdeckt (Newman et al. 1989, McFarland et al. 1991). Anti-HPA-1a-Ak sind Hauptauslöser für die fetale und neonatale Alloimmunthrombozytopenie und die posttransfusionelle Purpura (Mueller-Eckhardt et al. 1989). Anti-HPA-1b-Ak sind bei alloimmunisierten polytransfunden Patienten relevant (Kiefel et al. 2001).

Auch Anti-HPA-5b-Ak wurden im Zusammenhang mit der FNAIT entdeckt und sind als zweithäufigster Auslöser dieser Erkrankung anzusehen (Kiefel et al. 1988).

Das als HPA-15 bezeichnete Gov-Antigensystem ist auf CD109 lokalisiert (Kelton et al. 1990) und Anti-HPA-15-Ak können im Serum polytransfundierter Patienten nachgewiesen werden.

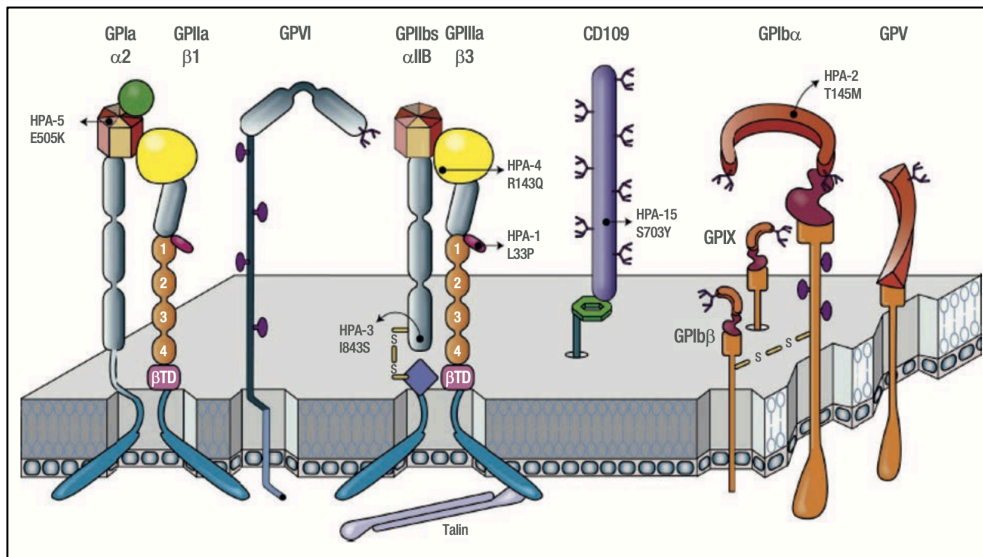


Abb. 5: Die thrombozytären Glykoproteine GPIa/IIa, GPIIb/IIIa, CD109 und GPIb/IX/V-Komplex mit Lokalisation der korrespondierenden HPA (Urban et al. 2013). HPA-1 und HPA-4 sind auf der extrazellulären Domäne des GPIIIa lokalisiert, HPA-3 befindet sich auf GPIIb und HPA-5 auf GPIa. HPA-2 ist auf der extrazellulären Domäne der Ib α -Kette lokalisiert. CD109 ist Träger von HPA-15.

1.8 Klinische Relevanz thrombozytärer Antikörper

Thrombozytäre Ak sind als Ursache von Transfusionsreaktionen und unklarer Thrombozytopenie in der Neonatalperiode sowie bei der Autoimmunthrombozytopenie klinisch relevant.

Auto-Ak reagieren mit monomorphen Determinanten autologer Thrombozyten und können eine Immunthrombozytopenie (ITP) auslösen. Ursache der gestörten Selbsttoleranz können Virusinfekte bzw. in seltenen Fällen Impfungen sein.

Im Gegensatz dazu werden Allo-Ak durch Kontakt mit „fremden“ HPA nach HLA- und/oder HPA-inkompatiblen Transfusionen bzw. während der Schwangerschaft induziert.

Die Immunthrombozytopenie ist aufgrund eines erhöhten Plättchenabbaus im retikuloendothelialen System durch eine verminderte Thrombozytenzahl mit konsekutiv erhöhter Blutungsneigung gekennzeichnet. Die Erkrankung ist eine Ausschlussdiagnose und klinisch als Thrombozytopenie ($< 100.000/\mu\text{l}$ Blut) bei normalem Hämoglobingehalt und fehlender Hepatosplenomegalie, Lymphadenopathie oder anderen ursächlichen Erkrankungen definiert.

Zu den Symptomen, die oft erst bei einer Thrombozytenzahl von 30.000/ μ l oder weniger auftreten, gehören Petechien der abhängigen Körperpartien bis hin zu flächenhaften Hautblutungen sowie gelegentlich gastrointestinale Blutungen.

Eine ITP wird durch zirkulierende bzw. an Thrombozyten gebundene Ak ausgelöst. Dabei können bei einem Großteil der Patienten Auto-Ak gegen Determinanten auf den thrombozytären Glykoproteinen IIb/IIIa (Woods et al. 1984b) und Ib/IX (Woods et al. 1984a, Kiefel et al. 1991) festgestellt werden.

Die fetale bzw. neonatale Alloimmunthrombozytopenie (FNAIT) ist durch einen beschleunigten Abbau der Plättchen des Fetus bzw. Neugeborenen charakterisiert und wird durch maternale Allo-Ak gegen ein kindliches, thrombozytenspezifisches Antigen ausgelöst. Kindliche Thrombozyten gelangen ab der 18. Schwangerschaftswoche in den mütterlichen Kreislauf. Fehlt der Mutter ein auf den fetalen Plättchen vorhandenes Antigen, kann sie mit einer Antikörperbildung reagieren. Diese führen entweder bereits in utero oder postnatal zu einem beschleunigten Abbau der kindlichen Thrombozyten.

Das klinische Bild der FNAIT, die mit einer Inzidenz von 1:2.000 - 1:5.000 auftritt, ist von einer isolierten Thrombozytopenie mit Petechien und gastrointestinalen Blutungen geprägt. Circa 10-20 % der Kinder erleiden als dramatische Folge des erhöhten Plättchenabbaus intrazerebrale Blutungen mit dem Risiko eines postnatalen Hydrozephalus sowie konsekutiver psychomotorischer Retardierung (Kroll and Maier 2010). Die klinische Ausprägung der FNAIT hängt wesentlich von der Spezifität der gebildeten Alloantikörper ab. Antikörper gegen Antigene auf dem GPIIb/IIIa-Komplex und GPIb/IX-Komplex verursachen in der Regel schwerere Blutungen als solche gegen den GPIa/IIa-Komplex (Kaplan et al. 1991, Kroll et al. 1995).

Etwa 80 % der betroffenen Kinder werden von HPA-1a-negativen Müttern geboren (Mueller-Eckhardt et al. 1989, Santoso and Kiefel 2001). Weitere 10-15 % der FNAIT-Fälle sind auf Anti-HPA-5b zurückzuführen. Im asiatischen Raum ist die FNAIT wesentlich mit dem HPA-4-Antigen assoziiert (Morel-Kopp et al. 1992).

Die posttransfusionelle Purpura (PTP) wird sehr selten nach Transfusion zellulärer Blutprodukte beobachtet. Ungefähr eine Woche nach der Transfusion kommt es zu einer plötzlichen, immunologisch bedingten Thrombozytopenie mit charakteristischer Klinik. In fast allen Fällen besteht anamnestisch ein früheres Immunisierungsereignis (Schwangerschaft, vorherige Transfusion) mit Induktion von Allo-Ak. Oftmals bleibt diese primäre Alloimmunisierung unbemerkt und erst die Boosterung durch eine erneute Transfusion führt zur klinischen Symptomatik. Nach circa 7 - 10 Tagen wird ein starker

Abfall der Plättchenzahl (oft $< 10.000/\mu\text{l}$ Blut) mit erhöhter Blutungsneigung und petechialen Hautblutungen beobachtet. Der genaue Pathomechanismus ist noch ungeklärt, diskutiert werden die Anlagerung von Immunkomplexen bzw. die Adsorption von Spender-Glykoproteinen an autologe Thrombozyten sowie kreuzreagierende Ak (Kiefel 2010a).

Kommt es 1-3 Stunden nach wiederholter Transfusion AB0-kompatibler Thrombozytenkonzentrate nicht zu einem Anstieg der Thrombozytenzahlen, können neben nicht-immunologischen Ursachen auch Ak gegen thrombozytäre Antigene ursächlich sein (Greinacher et al. 2011). Hier sind vorwiegend Ak gegen HLA-Klasse-I-Antigene zu nennen (Howard and Perkins 1978, Murphy and Waters 1985).

Da etwa 15 - 30 % der Patienten mit HLA-Ak zusätzlich HPA-Ak aufweisen, führt auch eine HLA-kompatible Transfusion nicht immer zum ausreichenden Inkrement (Kiefel et al. 2001, Kurz et al. 2001). Lediglich Anti-HPA-5b-Ak werden auch ohne zusätzlichen Anti-HLA-I-Ak nachgewiesen (Kiefel et al. 2001, Schnaidt et al. 1996).

1.9 Indikation zur immunologischen Typisierung von Thrombozyten

Die membranständigen thrombozytären Glykoproteine fungieren als funktionell wichtige Rezeptoren der Thrombozytenmembran im Rahmen der primären Hämostase. Aufgrund der Mutationen dieser Glykoproteine werden transfundierte Thrombozyten und fetale Thrombozytenfragmente im mütterlichen Kreislauf als fremd erkannt und können zu einer Immunisierung führen.

Bei Thrombozytentransfusionen für (noch) nicht immunisierte Patienten werden die HPA- und HLA-Antigene zunächst nicht berücksichtigt, während dies bei immunisierten Patienten sowohl für die Prävention einer Immunreaktion als auch für die Diagnose bereits vorhandener Allo- und/oder Auto-Ak bzw. einer von diesen Ak ausgelösten Erkrankungen notwendig ist. In letztgenanntem Fall ist es gleichermaßen wichtig, die Konzentration sowie die Spezifität vorhandener Ak zu ermitteln.

Für die Beantwortung dieser Fragen im Rahmen der klinischen Routine sind verschiedene qualitative, semi-quantitative und quantitative Testverfahren etabliert. Diese unterscheiden sich hinsichtlich der Probenvorbereitung, der Zahl der parallel durchführbaren Tests und der Verfahren zum Nachweis einer positiven Reaktion.

Der Nachweis (bzw. der Ausschluss) von Ak gegen spezifische thrombozytenständige GP setzt voraus, dass zumindest die GP eindeutig identifiziert werden können.

Dieses erfolgt in der Regel durch monoklonale Maus-Ak, die in ausreichender Menge und reproduzierbarer Qualität kommerziell verfügbar sind.

Thrombozyten mit bekannter GP-Struktur werden als "Testthrombozyten" für die Suche nach zirkulierenden Ak bei potentiellen Empfängern von Thrombozytenpräparaten bzw. Patienten mit unklaren thrombozytären Erkrankungen verwendet.

Weiterhin ermöglicht die sequentielle Bindung von humanem Anti-GP-Ak und Maus-Anti-GP-Ak in Kombination mit einer entsprechenden Nachweisreaktion die Spezifität des humanen Ak zu erfassen.

Auf diesem Prinzip basiert der von Kiefel et al. 1987 entwickelte Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigens (MAIPA) Test, in dem im Sinne einer Immunpräzipitation die Immobilisierung und Anreicherung der Zielstruktur mit dem Prinzip des Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) kombiniert ist (Kiefel et al. 1987). Nach diesem Prinzip lassen sich parallel zahlreiche Proben auf die Anwesenheit eines GP-spezifischen Ak bzw. mit einem Panel GP-spezifischer Ak screenen.

2 Ziel der Arbeit

Thrombozyten und ihre membranständigen Glykoproteine sind für die primäre Hämostase unabdingbar. Da Antikörper gegen thrombozytäre Glykoproteine die Hämostase stören können, ist der Nachweis von thrombozytenspezifischen Antikörpern für die Diagnostik und Therapie thrombozytärer Erkrankungen von großer Bedeutung.

Neben Suchtests zum Nachweis plättchenreaktiver Antikörper stehen spezifische Verfahren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung dieser Antikörper zur Verfügung. Hier ist insbesondere ein auf der Immobilisierung von Plättchen-spezifischen Antigenen basierendes mehrschrittiges Verfahren zur Suche nach GP-spezifischen Antikörpern zu nennen. Dieser als MAIPA (Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigens) bezeichnete Assay erlaubt die Anreicherung und Identifizierung der Zielstruktur durch parallele Verwendung von Ak bekannter Spezifität.

Allerdings sind für die weitestgehend manuelle Durchführung spezialisierte Laboratorien und zusätzlich große Routine erforderlich. Zahlreiche Inkubations- und Waschschrte bedingen, dass zwischen Beginn des Assays und dem Ergebnis circa 7 Stunden vergehen – eine im Verhältnis zur Dringlichkeit der Diagnostik doch unverhältnismäßig lange Zeitspanne.

Daher sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit geprüft werden, wie sich Änderungen einzelner Parameter auf die Ergebnisse auswirken.

Im Einzelnen handelt es sich um die Fragen,

- welchen Einfluss die Menge der Testthrombozyten auf die ELISA-Signale hat
- wie sich die Dauer der Inkubationszeiten und die Reaktionstemperatur bei den einzelnen Reaktionsschritten auf die Signalintensität des Assays auswirken
- wie sich beim Nachweis von Antikörpern gegen proteasesensitive Antigene die Lagerungsbedingungen und die Gegenwart des Proteaseinhibitors Leupeptin auf die Signalstärke des Assays auswirken
- wie sich die Lagerung von Spenderthrombozyten für den Nachweis von Antikörpern gegen das Glykoprotein CD109 auf die Assay-Signale auswirkt
- welchen Einfluss die von Hou et al. 2003 vorgeschlagenen Modifikationen auf die Resultate des MAIPA-Assays haben, verglichen mit dem Standardprotokoll

3 Material und Methoden

3.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

3.1.1 Geräte

Die verwendeten Geräte stammten von folgenden Firmen:

Anthos, Friesoythe:

Mikrotiterplatten-Photometer (Anthos htII)

BioRAD, Hercules, CA, USA:

Horizontalschüttler für Mikrotiter (MT) - Platten

Eppendorf, Hamburg:

Multipipetten

Heidolph Instruments, Schwabach:

Vortexer

Heraeus, Hanau:

Brutschrank

Hettich, Tuttlingen:

Kühlbare Tischzentrifuge mit einem Rotor für Mikrotiterplatten (Hettich Universal 320)

Sysmex, Norderstedt:

Hämatologieanalysator, KX-21

3.1.2 Verbrauchsmaterialien, gebrauchsfertige Reagenzien und Antikörper

Greiner Bio-One, Frickenhausen:

96-well Flachboden-Mikrotiterplatte mit hoher Proteinbindungskapazität (F-Form; Art.-Nr. 65.5061), Polystyrol-Röhrchen (12,0 ml)

Sarstedt, Nümbrecht:

96-well Rundboden-Mikrotiterplatte (Art.-Nr. 82.1582)

Biotest, Dreieich:

30% Rinderserumalbumin (BSA, Art.-Nr. 805080)

Braun, Melsungen:

0,15 M NaCl

Dako, Hamburg:

ortho-Phenylendiamin-dihydrochlorid (OPD; portioniert in Tabletten à 2 mg;
Art.-Nr. S2045)

Merck, Darmstadt:

35% H₂O₂

Morphisto, Frankfurt am Main:

Phosphate-Buffered Saline (PBS) nach Dulbecco; 10% NaN₃; 2,5 M H₂SO₄

Beckman-Coulter, Krefeld:

monoklonaler Maus-Anti-human GPIIb/IIIa-Antikörper (Anti-CD41-mAk; Klon P2,
Subtyp IgG1; Art.-Nr. 0145)

monoklonaler Maus-Anti-human GPIa-Antikörper (Anti-CD49b-mAk; Klon Gi9,
Subtyp IgG1, Art. Nr. 1425);

monoklonaler Maus-Anti-human HLA-I-Antikörper (β2 Mikroglobulin-Antikörper,
Klon B1G6, Subtyp IgG2, Art.-Nr. 0107)

Biosciences, San Jose, USA:

monoklonaler Maus-Anti-human CD109-Antikörper
(Klon TEA 2/16, Subtyp IgG1, Art.-Nr. 556039)

Dianova, Hamburg:

Affinitätsgereinigtes Ziege-Anti-Maus IgG-Antiserum (Art.-Nr. 115-005-071)

Affinitätsgereinigtes Peroxidase-konjugiertes Ziege-Anti-human IgG-Antiserum,
minimale Kreuzreaktivität mit Maus, Pferd und Rind (Art.-Nr. 109-035-098)

HISS Diagnostics, Freiburg:

monoklonaler Maus-Anti-human GPV-Antikörper (Anti-CD42d-mAk, Subtyp IgG1,
Art.-Nr. M 1637)

LINARIS Biologische Produkte GmbH, Dossenheim:

monoklonaler Maus-Anti-human GPIX-Antikörper (Anti-CD42a-mAk, Subtyp IgG1,
Art.-Nr. mAk 0594)

Alle Antikörper wurden portioniert, bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert und in einer
Konzentration von 20 µg/ml eingesetzt.

3.1.3 Puffer und Lösungen:

Beschichtungspuffer:

0,1 M $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ (pH 9,6) mit 0,01% NaN_3 stabilisiert

Waschpuffer (Tris-Buffered Saline, TBS mit Tween-20 und Triton X-100):

0,01 M Tris-HCl (pH 7,4) mit 0,15 M NaCl, 0,5 mM CaCl_2 , 0,5% Triton-X-100, 0,05% Tween-20

Solubilisierungspuffer (TBS mit Triton X-100):

0,01 M Tris (pH 7,4) mit 0,15 M NaCl, 0,5% Triton-X-100

Konjugatlösung:

Ziege-Anti-human-IgG-Ak 1:6.000 in Waschpuffer verdünnt

Substratlösung:

4 OPD Tabletten mit 12 ml Aqua dest. versetzen und dunkel für 10 Minuten bei 37 °C inkubieren; unmittelbar vor Gebrauch Zugabe von 5 µl 35%igem H_2O_2 .

Alle verwendeten Chemikalien hatten, wenn verfügbar, p.a.-Qualität.

3.1.4 Patienten- und Blutspendermaterial

Der Nachweis thrombozytengebundener Ak erfordert die Isolierung von Thrombozyten betroffener Patienten, während zum Nachweis zirkulierender Ak Thrombozyten mit definierten HPA- und HLA-Antigenen (Testthrombozyten) benötigt werden. Diese wurden über eine Vollblut- oder Thrombozytenspende von gesunden Blutspendern der Blutgruppe 0 in der Blutbank der Universitätsmedizin Rostock gewonnen und im thrombozytenserologischen Labor isoliert.

Patientenmaterial wurde als Nativ- bzw. EDTA-Blut aus dem Universitätsklinikum Rostock bzw. umliegenden Krankenhäusern zur Analyse eingesandt.

3.2 Isolierung von Thrombozyten

Das mit EDTA antikoagulierte Blut (mind. 10 ml) wurde mit dem gleichen Volumen isotoner Kochsalzlösung versetzt und zentrifugiert (20 min, 120 g ohne Bremse). Der Überstand aus plättchenreichem Plasma wurde abgehoben, mit dem gleichen Volumen

einer Lösung aus 0,5 % EDTA (pH 6,5) in 10 % PBS und 0,15 M NaCl verdünnt und zur Sedimentierung der Thrombozyten erneut zentrifugiert (10 min, 1.700 g). Die pelletierten Thrombozyten wurden in isotoner Kochsalzlösung resuspendiert, 2x gewaschen (10 min, 1.700 g) und schließlich in 1 ml isotoner Kochsalzlösung (stabilisiert mit 0,1 % NaN_3 -Lösung) aufgenommen.

Die Zelldichte wurde am Zellcounter bestimmt und auf $2 \cdot 10^5/\mu\text{l}$ eingestellt. Die Thrombozytensuspension wurde bei 4 °C gelagert.

Zum Nachweis von Ak gegen GPIb/IX müssen die Testthrombozyten mit einer Dichte von $5 \cdot 10^5/\mu\text{l}$ in Gegenwart des Proteaseinhibitors Leupeptin (50 $\mu\text{l}/\text{ml}$) gelagert werden.

Zum Nachweis von Ak gegen HPA-15b wurden die pelletierten Thrombozyten mit einer BSA-EDTA-haltigen Lösung (700 ml PBS + 5 ml BSA [30%] + 10 ml EDTA [5%]) gewaschen und auf eine Dichte von $1 \cdot 10^6/\mu\text{l}$ eingestellt.

3.3 Monoclonal Antibody Immobilisation of Platelet Antigens-Assay (MAIPA-Assay)

3.3.1 Indirekter MAIPA-Assay

Der indirekte MAIPA-Assay dient zum Nachweis von zirkulierenden Antikörpern gegen thrombozytäre Glykoproteine und erlaubt gleichzeitig die Bestimmung der Spezifität dieser Ak.

Dazu werden Thrombozyten mit definierten HPA- und HLA-Antigenen (Testthrombozyten) mit dem zu untersuchenden Patientenserum und einem Panel monoklonaler Maus-Anti-human-GP-Ak inkubiert.

Unter der Voraussetzung, dass die humanen und murinen monoklonalen Ak an unterschiedliche Epitope des GP binden, kommt es zur Bildung eines trimolekularen Komplexes, der nach Lyse der Zellen über einen Festphasen-gebundenen Fängerantikörper (z.B. Ziege-Anti-Maus-Ak) immobilisiert und über eine entsprechende Nachweisreaktion sichtbar gemacht wird (Abb. 6).

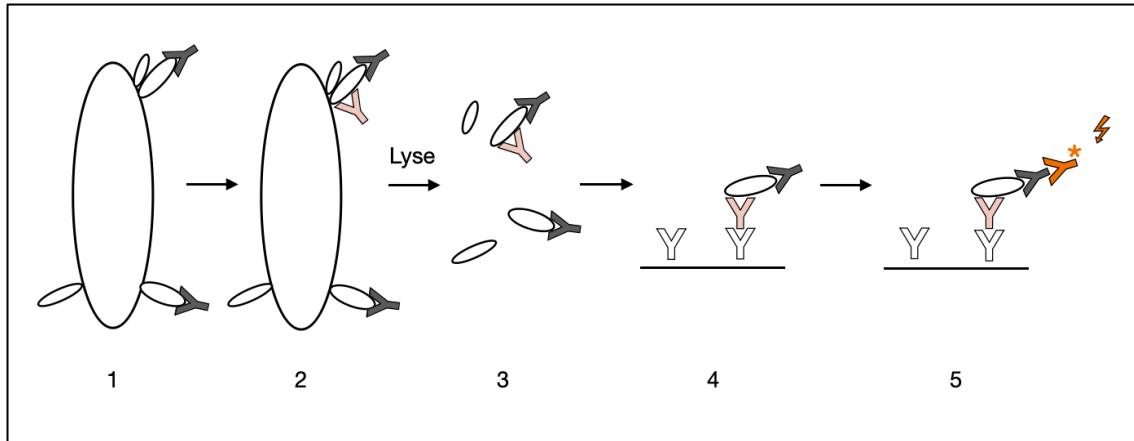


Abb. 6: Schematische Darstellung des MAIPA-Assays

Inkubation von Testthrombozyten und dem zu untersuchenden Serum (1): humane Ak (Y) binden an ein Epitop der thrombozytären GP. Inkubation mit einem monoklonalen Maus-Anti-human-GP-Ak (Y), welcher an ein anderes Epitop der thrombozytären GP bindet (2). Nach Lyse der Thrombozyten und Entfernung von Zelldebris (3) werden die Ak-markierten GP an einer mit Ziege-Anti-Maus-IgG-Ak (Y) funktionalisierten Mikrotiterplatte immobilisiert (4). Nachweis der GP-gebundenen humanen Ak durch Inkubation mit Peroxidase-konjugiertem Ziege-Anti-human-IgG-Ak (Y*) und anschließender Indikatorreaktion (5).

Die Durchführung des MAIPA-Assays, sowohl die vorbereitende Funktionalisierung einer MT-Platte für den Nachweis GP-spezifischer Ak, als auch die MT-Platten-basierte Anreicherung der Thrombozytenantikörper, erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Kiefel et al. (Kiefel 1992).

Funktionalisierung der MT-Platte für den Einsatz im ELISA:

Inkubation mit dem in Beschichtungspuffer adäquat verdünnten Ziege-Anti-Maus-IgG-Ak (100 µl/Ansatz, 4 °C über Nacht bzw. mind. 4 h bei Raumtemperatur [RT]). Vor der Verwendung wird die MT-Platte zur Entfernung ungebundener Fänger-Ak gewaschen (5x; 200 µl/Vertiefung) und unspezifische Bindungsstellen werden mit Waschpuffer (200 µl/Vertiefung; 10 min, RT) blockiert.

1. Vorlegen der nach 3.2 isolierten Testthrombozyten in die Vertiefungen der Rundbodenplatte (100 µl/Ansatz bzw. 20×10^6 Thrombozyten/Ansatz)
2. Waschen mit 0,15 M NaCl (50 µl/Vertiefung) und Sedimentieren der Thrombozyten (2 min, 8000 g)
3. Resuspendieren durch Zusatz von 2% BSA in PBS (30 µl/Vertiefung; 2 min, RT)
4. Inkubation mit Patientenserum (50 µl/ Vertiefung; 30 min, 37 °C)
5. Waschen und Sedimentieren der Thrombozyten wie unter 2. beschrieben

6. Inkubation mit einem Panel monoklonaler Maus-Anti-human-GP-spezifischer Ak (Anti-GPIa/IIa-, Anti-GPIIb/IIIa-, Anti-HLA-I-, Anti-GPIb/IX- und Anti-CD109-Ak) (10 µl/Ansatz; 30 min, 37 °C)
7. 3x Waschen zum Entfernen ungebundener Ak wie unter 2. beschrieben
8. Solubilisierung der Ak-beladenen Thrombozyten (100 µl/Vertiefung; 30 min, 4 °C)
9. Zentrifugation zum Entfernen von Zelldebris (15.000 g; 30 min, 4 °C)
10. 50 µl Überstand in 200 µl Waschpuffer verdünnen und 100 µl des verdünnten Überstandes in die korrespondierende Vertiefung der funktionalisierten MT-Platte übertragen (Doppelbestimmung; 90 min, 4 °C)
11. Inkubation mit Konjugat (100 µl/Ansatz; 120 min, 4 °C)
12. 6x mit Waschpuffer waschen (200 µl/Vertiefung)
13. Inkubation mit Substrat (100 µl/Ansatz; 15 min, RT im Dunkeln)
14. Stoppen der Reaktion mit 2,5 M H₂SO₄ (50 µl/Vertiefung)
15. Bestimmung der Extinktion bei 492 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) im MT-Photometer

Entsprechend der Extinktion wird die Reaktion von „negativ“ bis 4-fach „positiv“ eingestuft (Cut-off Extinktion $\geq 0,2$).

Grundsätzlich wurde bei jeder Testreihe eine Positivkontrolle mitgeführt, weiterhin wurde zur Bestimmung des Leerwertes anstelle der Konjugatlösung die gleiche Menge TBS-Puffer verwendet.

3.3.2 Direkter MAIPA-Assay

Der direkte MAIPA-Assay dient dem Nachweis von zirkulierenden Ak-beladenen Thrombozyten.

Daher schließt sich an die Isolierung der patienteneigenen Thrombozyten die Inkubation mit einem Panel monoklonaler Ak (mAk) von der Maus mit definierter Spezifität für humane thrombozytäre GP an.

Der weitere Ablauf und die Auswertung entsprechen dem Protokoll des indirekten MAIPA-Assays.

3.4 Modifizierungen des MAIPA-Assays

Das Design des Assays führt zu einer direkten Proportionalität zwischen Signal und Ak-Titer, geht aber mit erheblichem Zeit- und/oder Materialaufwand einher. Um das Protokoll für den Einsatz in der Patientenversorgung zu optimieren, wurden verschiedene Parameter modifiziert.

Im Einzelnen handelt es sich um die

- Isolierung, Aufbereitung und Lagerung der Testthrombozyten sowie den Einfluss des Proteaseinhibitors Leupeptin
- Zahl der verwendeten Testthrombozyten als Träger der Antigendeterminanten
- Inkubationsschritte mit Bindung
 - o plättchenreaktiver humaner Ak an die GP der Testthrombozyten
 - o monoklonaler Maus-Anti-human-GP-Ak an die GP der Testthrombozyten
 - o isolierter Ak-beladener GP an die Ak-beschichtete MT-Platte
 - o Peroxidase-konjugierter Ak an die humanen plättchenreaktiven Ak

Wenn nicht anders angegeben, erfolgten die Modifizierungen gemäß dem Protokoll für den indirekten MAIPA-Assay (siehe 3.3.1).

Als Negativkontrolle dienten Seren gesunder Spender bzw. HPA-negative Testthrombozyten. Als Positivkontrolle wurde ein 1:20 verdünntes Humanserum mit Anti-HPA-1a-Ak verwendet.

3.4.1 MAIPA-Assay mit variablen Thrombozytenzahlen

Im regulären MAIPA-Assay Protokoll werden $20 \cdot 10^6$ Thrombozyten/Ansatz eingesetzt. Parallel zur Variation der Zahl der Testthrombozyten wurde die Menge des monoklonalen Maus-Anti-human-GP-Ak angepasst, während die Menge des Ak-haltigen Humanserums konstant gehalten wurde (Tab. 2, Abb. 7).

Diese Untersuchungen wurden mit humanen Seren mit Anti-HPA-1a-Ak (n=9), Anti-HPA-5b-Ak (n=5), Anti-GPIIb/IIIa-Auto-Ak (n=2) und Anti-GPIb/IX-Auto-Ak (n=3) durchgeführt.

Tab. 2: Variable Zahl der Testthrombozyten/Ansatz

Ansatz	Absolute Zahl der Testthrombozyten/Anzahl	Maus Anti-hGP-mAk	Patientenserum
1	80 * 10 ⁶ *	40 µl	50 µl
2	40 * 10 ⁶	20 µl	50 µl
3	20 * 10⁶	10 µl	50 µl
4	10 * 10 ⁶	5 µl	50 µl
5	5 * 10 ⁶	2,5 µl	50 µl

*nur bei der Analyse Anti-HPA-5b-Ak-haltiger Seren, Maus Anti-hGP-mAk = monoklonaler Maus-Anti-human-GP-Ak mit Spezifitäten für die untersuchten GP
Fettgedruckt ist die im regulären MAIPA-Protokoll eingesetzte Testthrombozytenzahl.

Aufgrund der niedrigen thrombozytären Expressionsdichte des Antigens wurde für den Nachweis von Anti-HPA-5b-Ak mit einer Zellzahl von 80 * 10⁶ Thrombozyten/Ansatz gearbeitet.

Nach Isolierung der Thrombozyten nach dem unter 3.2 beschriebenen Protokoll wurden diese für den Nachweis von Anti-HPA-5b-Ak erneut pelletiert und in einem kleineren Volumen resuspendiert.

3.4.2 Modifizierte Inkubationsbedingungen

a. Inkubation der isolierten Ak-beladenen Glykoproteine mit dem Fängerantikörper

Zeitdauer und Temperatur der Inkubation zur Immobilisierung der isolierten und mit humanen und murinen Ak-beladenen thrombozytären GP an eine Festphase wurden variiert (Abb. 7).

- **90 min bei 4 °C (reguläre Immobilisierung)**
- 90 min bei 37 °C
- 60 min bei 37 °C
- 30 min bei 37 °C

b. Inkubation des Peroxidase-konjugierten Antikörpers mit den humanen plättchenreaktiven Antikörpern

Zeitdauer und Temperatur zur Anlagerung des Peroxidase-konjugierten Ziege-Anti-human-Ak an den humanen plättchenreaktiven Ak wurden variiert (Abb. 7).

- **120 min bei 4 °C (reguläre Inkubation)**
- 120 min bei 37 °C
- 60 min bei 37 °C
- 30 min bei 37 °C

Für die Untersuchungen (a. und b.) wurden Seren mit Anti-HPA-1a-Ak (n=2), Anti-HPA-5b-Ak (n=1), Anti-HLA-I-Ak (n=1), Anti-GPIIb/IIIa-Auto-Ak (n=3) und Anti-GPIb/IX-Auto-Ak (n=3) eingesetzt.

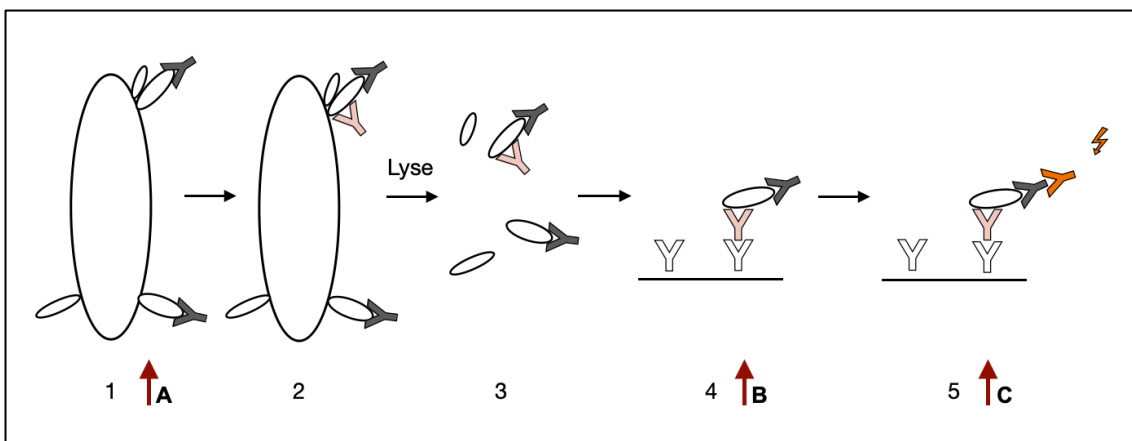


Abb. 7: Variation der Testthrombozytenzahl und der Inkubationsbedingungen. Die Zahl der Testthrombozyten als Träger der Antigen determinanten (A), die Inkubationszeit und -temperatur des trimolekularen Komplexes mit dem Fänger-Ak (B) und des Peroxidase-konjugierten Ak mit dem humanen Ak wurden variiert (C), jeweils mit rotem Pfeil markiert.

3.4.3 Lagerung von Testthrombozyten für den Anti-HPA-2b-Ak-Nachweis

Da Serin-, Cystein- und Threonin-Peptidasen zu einer Freisetzung der Iba-Kette als Träger des HPA-2b aus dem GPIb/IX führen, wird Leupeptin als Proteaseninhibitor sowohl im Rahmen der Lagerung der Testthrombozyten als auch im Solubilisierungspuffer verwendet.

Im bisherigen Routineverfahren des transfusionsserologischen Labors zum Nachweis von Anti-HPA-2b-Ak wurden die Testthrombozyten maximal sieben Tage bei 4 °C gelagert. Es sollte geprüft werden, wie lange nach Isolierung der Testthrombozyten der Anti-HPA-2b-Ak-Nachweis möglich ist.

Die Untersuchungen erfolgten mit HPA-2b-Testthrombozyten (n=7) und Anti-HPA-2b-Ak-haltigen Seren (n=2) und der Assay wurde nach Tag 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 und 30 nach Thrombozytenisolierung in Gegenwart bzw. Abwesenheit von Leupeptin durchgeführt.

Zusätzlich wurde untersucht, ob das Alter der Testthrombozyten zum Zeitpunkt der Zugabe von Leupeptin einen Einfluss auf die Signalintensität hat.

Einem Spender wurden 2 Röhrchen EDTA-Blut entnommen und daraus entweder sofort (Probe A) oder nach 24-stündiger Lagerung bei 4 °C (Probe B) die Thrombozyten isoliert und mit Leupeptin versetzt. An Tag 1, 3 und 5 nach Thrombozytenisolierung wurden die Plättchen zum Nachweis von Anti-HPA-2b-Ak eingesetzt (Abb. 8). Die Untersuchungen wurden mit Anti-HPA-2b-Ak-haltigen Seren (n=2) durchgeführt.

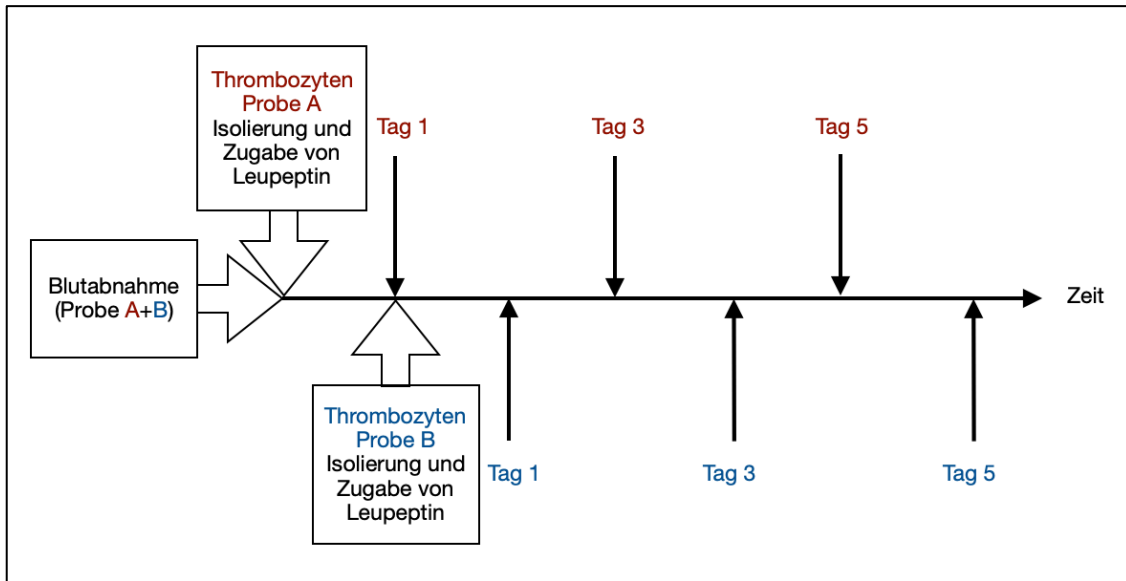


Abb. 8: Alter der Testthrombozyten beim Zusatz von Leupeptin. Thrombozyten desselben Spenders wurden sofort (Probe A) bzw. nach 24h (Probe B) isoliert und mit Leupeptin versetzt. Der MAIPA-Assay erfolgte an definierten Tagen nach Thrombozytenisolierung und Versetzen der Lösung mit Leupeptin.

3.4.4 Lagerung von Testthrombozyten für den Anti-HPA-15b-Ak-Nachweis

Es wurden CD109-positive Testthrombozyten (homozygot: n=3, heterozygot: n=1) sowie ein Serum mit Anti-HPA-15b-Ak verwendet und der Assay an Tag 1, 3 und 5 nach der Thrombozytenisolierung durchgeführt.

3.4.5 Modifikation nach Hou

Es wurde überprüft, ob das 2003 von Hou et al. vorgelegte vereinfachte Protokoll zum Nachweis von Antikörpern gegen GPIIb/IIIa (Hou et al. 2003) auch für den Nachweis anderer Ak-Spezifitäten geeignet ist.

Testthrombozyten werden mit dem zu untersuchenden Patientenserum inkubiert und lysiert. Die mit eventuell vorhandenen Ak beladenen GP werden an einer mit Maus-Anti-human-GP funktionalisierten Oberfläche immobilisiert und durch eine entsprechende Nachweisreaktion sichtbar gemacht (Abb. 9).

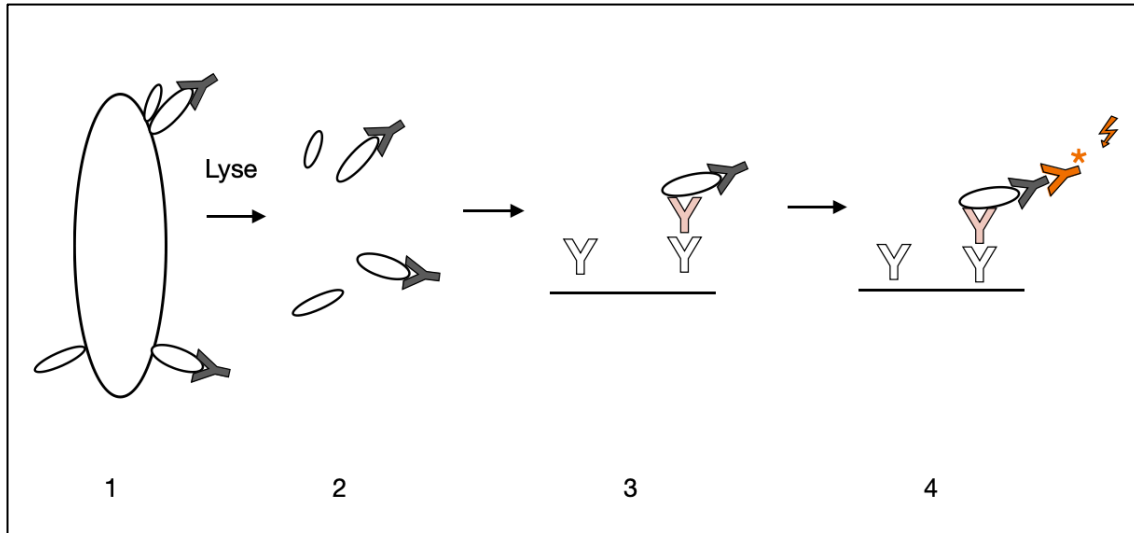


Abb. 9: Schematische Darstellung des MAIPA-Assays nach Hou. Inkubation von Thrombozyten mit bekannten HPA- und HLA-Antigenen mit dem zu untersuchenden Serum (1): humane Ak (Y) binden an ein Epitop der thrombozytären GP. Nach Lyse der Thrombozyten und Entfernung von Zelldebris (2) werden die Ak-beladenen GP an einer mit monoklonalem Maus-Anti-human-GP-Ak (Y) funktionalisierten Oberfläche (MT-Platte) immobilisiert (3). GP-gebundene humane Ak werden durch Inkubation mit Peroxidase-konjugiertem Ziege-Anti-human-IgG-Ak (Y*) und anschließender Indikatorreaktion sichtbar gemacht (4).

Protokoll des modifizierten MAIPA-Assays nach Hou:

Funktionalisierung der MT-Platte für den Einsatz im ELISA:

Inkubation mit dem in Beschichtungspuffer adäquat verdünnten Ziege-Anti-Maus-IgG-Ak (100 µl/Ansatz, 4 °C über Nacht bzw. mind. 4 h bei RT). Vor der Verwendung wird die MT-Platte zur Entfernung ungebundener Fänger-Ak gewaschen (5x; 200 µl/Vertiefung) und unspezifische Bindungsstellen mit Waschpuffer (200 µl/Vertiefung; 10 min, RT) blockiert.

1. Vorlegen der nach 3.2 isolierten Testthrombozyten in die Vertiefungen der Rundbodenplatte (100 µl/Ansatz bzw. 20×10^6 Thrombozyten/Ansatz)
2. Waschen mit 0,15 M NaCl (50 µl/Vertiefung) und Sedimentieren der Thrombozyten (2 min, 8000 g)
3. Resuspendieren durch Zusatz von 2% BSA in PBS (30 µl/Vertiefung; 2 min, RT)
4. Inkubation mit Patientenserum (50 µl/Vertiefung; 30 min, 37 °C)
5. 2x Waschen mit 0,15 M NaCl zum Entfernen ungebundener humaner Ak (100 µl/Vertiefung)
6. Solubilisierung der Ak-beladenen Thrombozyten (100 µl/Ansatz; 30 min, 4 °C)

7. Zentrifugation zum Entfernen von Zelldebris (15.000 g; 30 min, 4 °C)
8. In der Zwischenzeit erfolgt die Inkubation der mit Ziege-anti-Maus-IgG-Ak beschichteten MT-Platte mit einem Panel monoklonaler Maus-Anti-human-GP-spezifischer Ak (Doppelbestimmung; 60 min, 37 °C)
9. 50 µl des Überstandes der solubilisierten Thrombozyten in 200 µl Waschpuffer verdünnen und 100 µl des verdünnten Überstandes in die korrespondierende Vertiefung der funktionalisierten MT-Platte übertragen (Doppelbestimmung; 90 min, 4 °C)
10. Inkubation mit Konjugat (100 µl/Ansatz; 120 min, 4 °C)
12. 6x mit Waschpuffer waschen (200 µl/Vertiefung)
13. Inkubation mit Substrat (100 µl/Ansatz; 15 min, RT im Dunkeln)
14. Stoppen der Reaktion mit 2,5 M H₂SO₄ (50 µl/Vertiefung)
15. Bestimmung der Extinktion bei 492 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) im MT-Photometer

Entsprechend der Extinktion wird die Reaktion von „negativ“ bis 4-fach „positiv“ eingestuft (Cut-off Extinktion $\geq 0,2$).

Grundsätzlich wurde bei jeder Testreihe eine Positivkontrolle mitgeführt, weiterhin wurde zur Bestimmung des Leerwertes anstelle der Konjugatlösung die gleiche Menge TBS-Puffer verwendet.

In der Untersuchung wurden 35 Seren mit Anti-HPA-1a-Ak (n=10), Anti-HPA-1b-Ak (n=5), Anti-HPA-5a-Ak (n=1), Anti-HPA-5b-Ak (n=5), Anti-HLA-I-Ak (n=5), Anti-HPA-15b-Ak (n=1), Anti-GPIIb/IIIa-Auto-Ak (n=3), Anti-GPIb/IX-Auto-Ak (n=3), Anti-GPIIb/IIIa- und Anti-GPIb/IX-Auto-Ak (n=2) verwendet.

Pro Versuch wurden Testthrombozyten mit geeignetem HPA- und HLA-Muster von jeweils zwei unterschiedlichen Spendern eingesetzt und die Extinktionen anschließend arithmetisch gemittelt.

Tab. 3: Verwendete Seren im Rahmen dieser Arbeit

Seren mit Ak gegen		1-9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
αHPA-1	1a	x											x								x	x	x	x								
	1b																								x	x	x	x	x			
αHPA-2	2b																	x	x													
αHPA-5	5a																													x		
	5b		x	x	x	x	x				x																					
αHPA-15	15b																			x												
αHLA	HLA-I													x																	x	x
Auto-Ak	IIb/IIIa							x	x						x	x																
	Ib/IX									x	x	x					x															

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die fortlaufend nummerierten Seren eingesetzt, einen Überblick über die in den jeweiligen Versuchen eingesetzten Seren gibt Tabelle 6 im Anhang.

4 Ergebnisse

4.1 MAIPA-Assay mit variablen Thrombozytenzahlen

Es wurden Patientenseren mit Anti-HPA-1a- und Anti-HPA-5b-Ak sowie Auto-Ak gegen GPIIb/IIIa und GPIb/IX verwendet.

Um die Konzentration der genannten Antikörper zu testen, werden im Standardprotokoll geeignete Testthrombozyten ($20 \cdot 10^6$ Zellen/Ansatz) eingesetzt.

Es war zu klären, ob diese Zellzahl eventuell zu gering ist, um auch niedrige Ak-Titer zuverlässig zu erfassen.

In der Gruppe der Anti-HPA-1a-Ak-haltigen Seren nahm die Extinktion bei 5 Seren mit steigender Thrombozytenzahl zu, bei 2 Seren war der Ak-Titer so hoch, dass unabhängig von der Zahl der Testthrombozyten die Extinktion maximal war, ein Serum erzielte niedrigere Extinktionen mit zunehmender Thrombozytenzahl und ein Serum reagierte auch bei maximaler Thrombozytenzahl inadäquat schwach.

Analog zeigte sich, dass für den Nachweis von Anti-HPA-5b-Ak (n=5) die Extinktion mit steigender Thrombozytenzahl zunimmt. Leider galt dies auch für die Negativkontrolle eines Serums (Abb. 10).

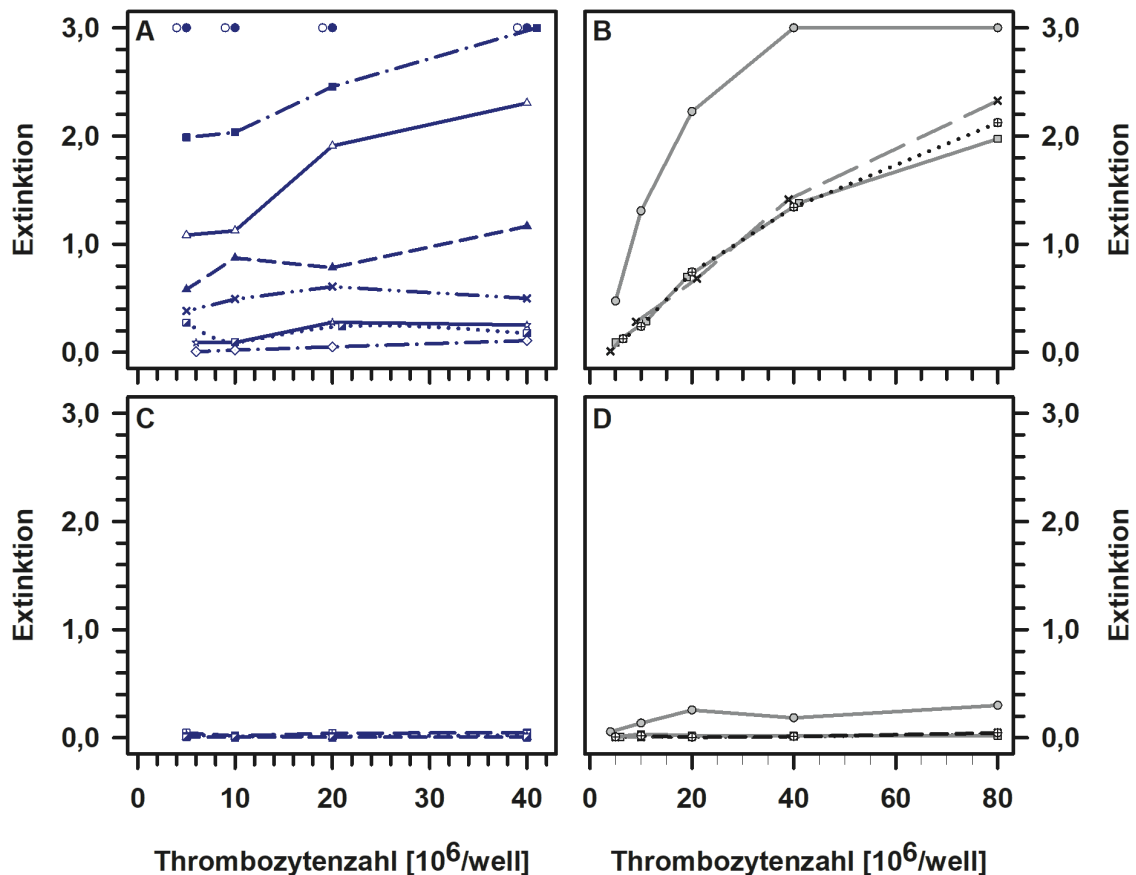


Abb. 10: Signalintensität in Abhängigkeit von der Zahl der Testthrombozyten zum Nachweis von Anti-HPA-1a- (A, C) und -HPA-5b-Ak (B, D) im Serum. Die im MAIPA-Assay gemessenen Extinktionen zur Quantifizierung von Anti-HPA-1a-Ak-haltigen (A) und Anti-HPA-5b-Ak-haltigen (B) Seren sowie die korrespondierenden Negativkontrollen (Reaktion des gleichen Serums mit HPA-negativen Testthrombozyten, C: HPA-1a, D: HPA-5b). Die Daten der Negativkontrollen befinden sich zusätzlich in Tabelle 7 und 8 im Anhang. Die Signale der Negativkontrollen von Thrombozyten mit Serum ohne plättchenreaktive Ak waren stets negativ (Extinktion < 0,2).

Analog wurden 2 Seren mit Anti-GPIIb/IIIa-Auto-Ak und 3 Seren mit Anti-GPIb/IX-Auto-Ak eingesetzt.

Unabhängig von der Autoantikörper-Spezifität nahm die Extinktion in allen Seren mit steigender Thrombozytenzahl zu (Abb. 11).

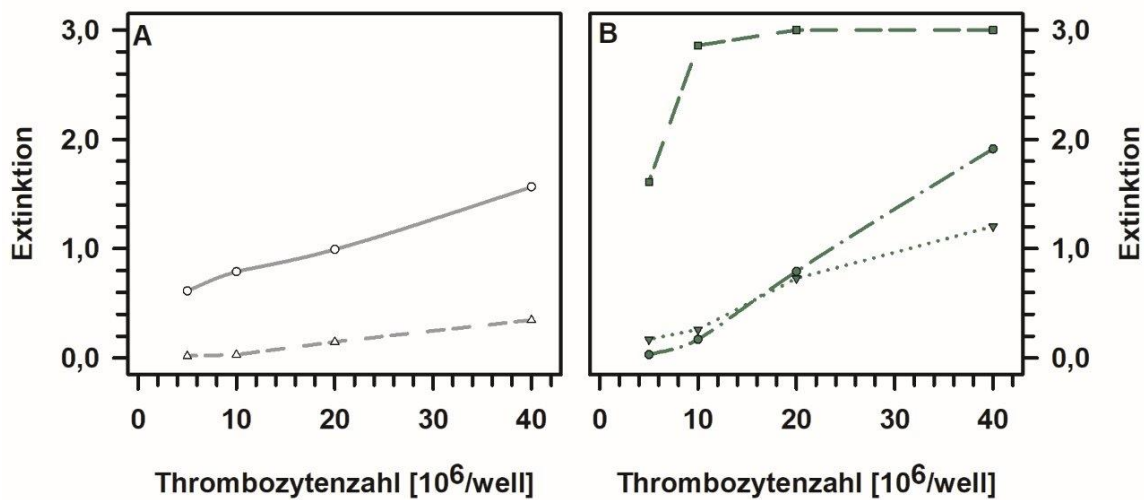


Abb. 11: Signalintensität in Abhängigkeit von der Zahl der Testthrombozyten mit Auto-Ak-haltigen Seren. Die im MAIPA-Assay gemessenen Extinktionen zur Analyse Anti-GPIIb/IIIa-Auto-Ak-haltiger (A) und Anti-GPIb/IX-Auto-Ak-haltiger (B) Seren in Abhängigkeit von der Zahl der eingesetzten Thrombozyten. Die Signale der Negativkontrollen von Thrombozyten mit Serum ohne plättchenreaktive Ak waren stets negativ (Extinktion < 0,2).

4.2 Modifizierte Inkubationsbedingungen

a. Inkubation der isolierten Antikörper-beladenen Glykoproteine mit dem Fängerantikörper

Die Inkubation des trimolekularen Komplexes mit dem Festphase-gebundenen Fängerantikörper erfolgt gemäß Standardprotokoll für 90 min bei 4 °C.

Es war zu klären, welchen Einfluss Inkubationszeit und -temperatur auf diese Inkubation haben.

Die Seren mit Anti-HPA-1a-Ak, Anti-HPA-5b-Ak und Anti-HLA-I-Ak erzielten die höchsten Extinktionen bei einer 90-minütigen Inkubation bei 37 °C und die niedrigsten Extinktionen bei einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C. Unter den veränderten Inkubationsbedingungen kam es zu unspezifischen Reaktionen der Negativkontrollen (HPA- bzw. HLA-negative Thrombozyten mit thrombozytenreaktiven Ak) bei zunehmender Temperatur und Inkubationszeit (Abb. 12).

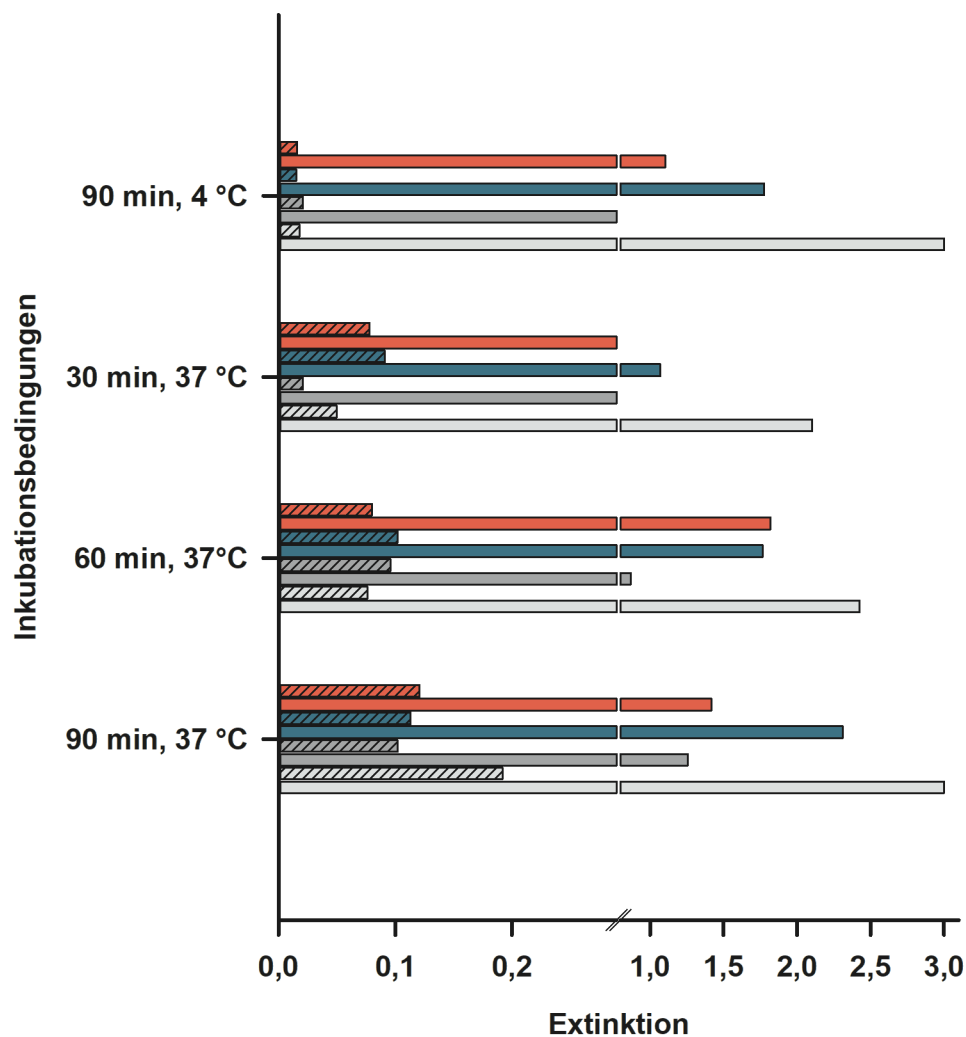


Abb. 12: Veränderte Inkubationsbedingungen des trimolekularen Komplexes mit dem Fängerantikörper. Dargestellt ist der Einfluss von Inkubationszeit und -temperatur auf die im MAIPA-Assay gemessenen Extinktionen zum Nachweis von HPA-1a-Ak (hellgrau, dunkelgrau), HPA-5b-Ak (blau) und HLA-I-Ak (rot) sowie die korrespondierenden Negativkontrollen (Reaktion des gleichen Serums mit HPA- bzw. HLA-negativen Testthrombozyten, schraffiert). Die Signale der Negativkontrollen von Thrombozyten mit Serum ohne plättchenreaktive Ak waren stets negativ (Extinktion < 0,2).

Die Auto-Ak-enthaltenden Seren (Anti-GPIIb/IIIa-Auto-Ak, Anti-GPIb/IX-Auto-Ak) erhielten die höchsten Extinktionen bei 60- bzw. 90-minütiger Inkubation bei 37 °C. Jeweils ein Serum reagierte in allen Bedingungen mit einem maximalen Signal (Abb. 13).

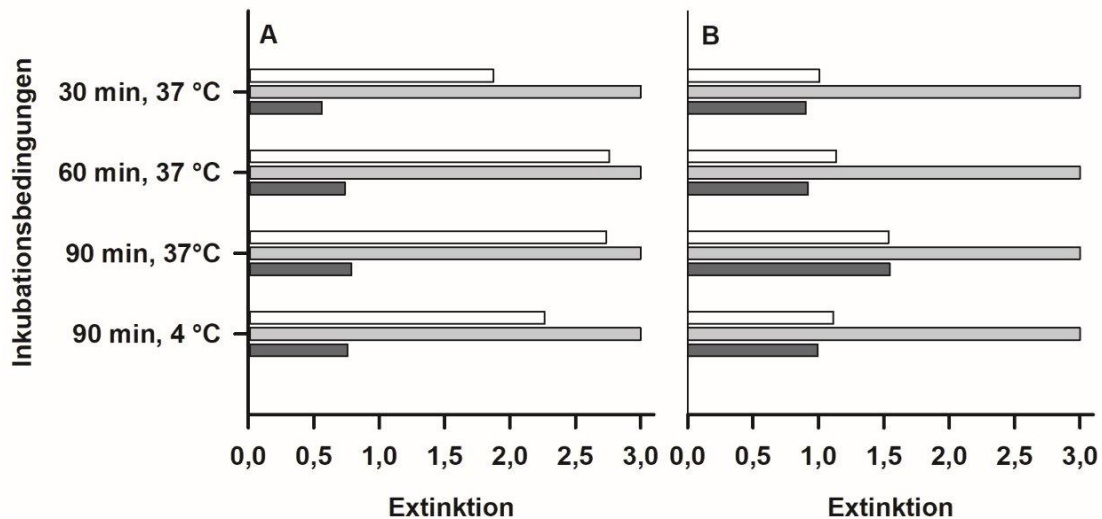


Abb. 13: Veränderte Inkubationsbedingungen des trimolekularen Komplexes mit dem Fängerantikörper mit Auto-Ak-haltigen Seren. Dargestellt ist der Einfluss von Inkubationszeit und -temperatur auf die Extinktion im MAIPA-Assay mit der Verwendung von Anti-GPIIb/IIIa-Auto-Ak (A) und Anti-GPIb/IX-Auto-Ak (B). Es wurden jeweils drei verschiedene Seren (weiß, hellgrau und dunkelgrau) eingesetzt. Die Signale der Negativkontrollen von Thrombozyten mit Serum ohne plättchenreaktive Ak waren stets negativ (Extinktion < 0,2).

b. Inkubation des Peroxidase-konjugierten Antikörpers mit den humanen plättchenreaktiven Antikörpern

Die Inkubation des Peroxidase-konjugierten Ziege-Anti-human-Ak mit dem humanen plättchenreaktiven Ak erfolgt gemäß Standardprotokoll für 120 min bei 4 °C. Es war zu klären, welchen Einfluss Inkubationszeit und -temperatur auf diese Inkubation haben.

In der Gruppe der Seren mit Anti-HPA-1a-Ak, Anti-HPA-5b-Ak und Anti-HLA-I-Ak wurden die höchsten Extinktionen bei einer Inkubationszeit von 120 min bei 37 °C erzielt, die niedrigsten Signale ergab die Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C. Die Negativkontrollen (HPA- bzw. HLA-negative Thrombozyten mit thrombozytenreaktiven Ak) blieben unterhalb des Cut-off-Wertes (Abb.14).

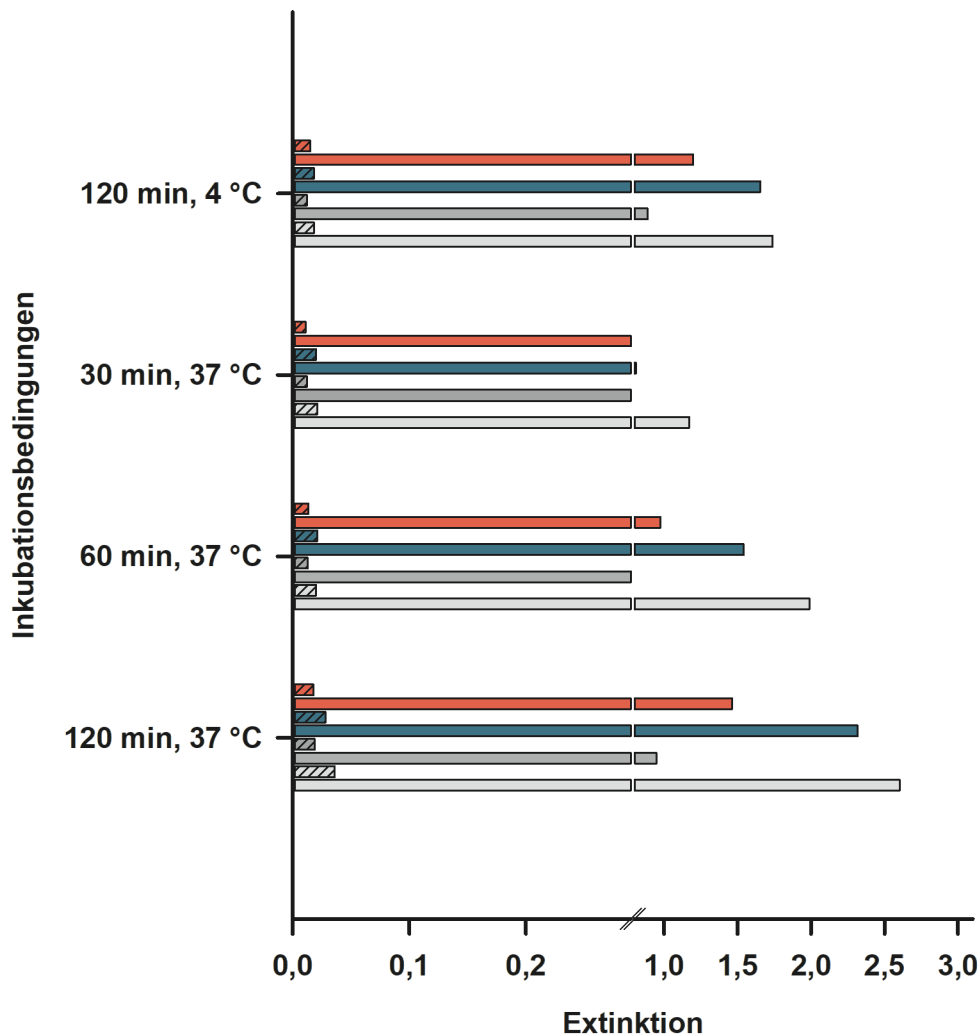


Abb. 14: Veränderte Inkubationsbedingungen des Peroxidase-konjugierten Antikörpers mit den humanen plättchenreaktiven Antikörpern. Dargestellt ist der Einfluss von Inkubationszeit und -temperatur auf die im MAIPA-Assay gemessenen Extinktionen zum Nachweis von HPA-1a-Ak (hellgrau, dunkelgrau), HPA-5b-Ak (blau) und HLA-I-Ak (rot) sowie die korrespondierenden Negativkontrollen (Reaktion des gleichen Serums mit HPA-negativen Testthrombozyten, schraffiert). Die Signale der Negativkontrollen von Thrombozyten mit Serum ohne plättchenreaktive Ak waren stets negativ (Extinktion < 0,2).

Die Seren mit Auto-Ak gegen GPIIb/IIIa und GPIb/IX ergaben analog zu 4.2 identische Ergebnisse. Jeweils ein Serum mit Anti-GPIIb/IIIa-Auto-Ak und Anti-GPIb/IX-Auto-Ak erzielte unter allen Bedingungen maximale Signale (Abb.15).

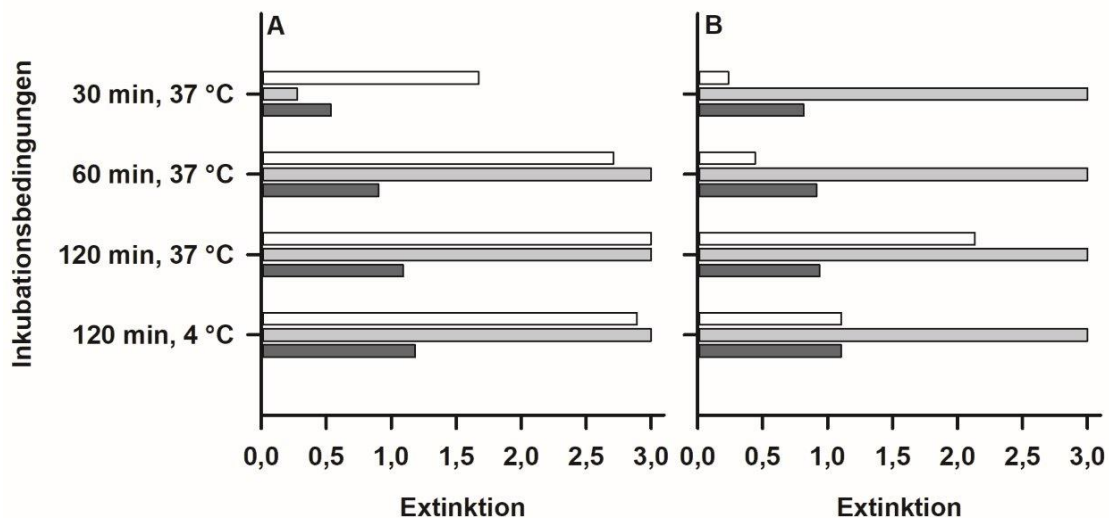


Abb. 15: Veränderte Inkubationsbedingungen des Peroxidase-konjugierten Antikörpers mit den humanen plättchenreaktiven Antikörpern mit Auto-Ak-haltigen Seren. Dargestellt ist der Einfluss von Inkubationszeit und -temperatur auf die im MAIPA-Assay ermittelten Extinktionen zur Analyse von Seren mit Anti-GPIIb/IIIa-Auto-Ak (A) und Anti-GPIb/IX-Auto-Ak (B). Es wurden jeweils drei verschiedene Humanseren (weiß, hellgrau und dunkelgrau) eingesetzt. Die Signale der Negativkontrollen von Thrombozyten mit Serum ohne plättchenreaktive Ak waren stets negativ (Extinktion < 0,2).

4.3 Lagerung von Testthrombozyten für den Anti-HPA-2b-Ak-Nachweis ohne und mit Zusatz von Leupeptin

Um zu klären, wie lange der Anti-HPA-2b-Ak-Nachweis nach Isolierung der Testthrombozyten möglich ist, wurden an definierten Tagen Untersuchungen in Gegenwart von Leupeptin durchgeführt. Parallel erfolgte die Untersuchung in Abwesenheit von Leupeptin.

In allen Ansätzen nahm die Extinktion mit der Dauer der Lagerung kontinuierlich ab. Im Zeitraum von 4 bis 10 Tagen nach der Thrombozytenisolierung wurde ein Plateau erreicht, in dem die Signale des Assays nicht auf eine relevante Freisetzung der

Antigendomäne hinweisen. Nach 10 Tagen sind die Thrombozyten nicht mehr als Testthrombozyten verwendbar.

In Abwesenheit von Leupeptin konnte ein starker Abfall der Extinktionen am 4. Tag nach der Thrombozytenisolierung nachgewiesen werden.

Leupeptin ist somit als Stabilisator im Rahmen der Lagerung der Testthrombozyten wirkungsvoll (Abb. 16).

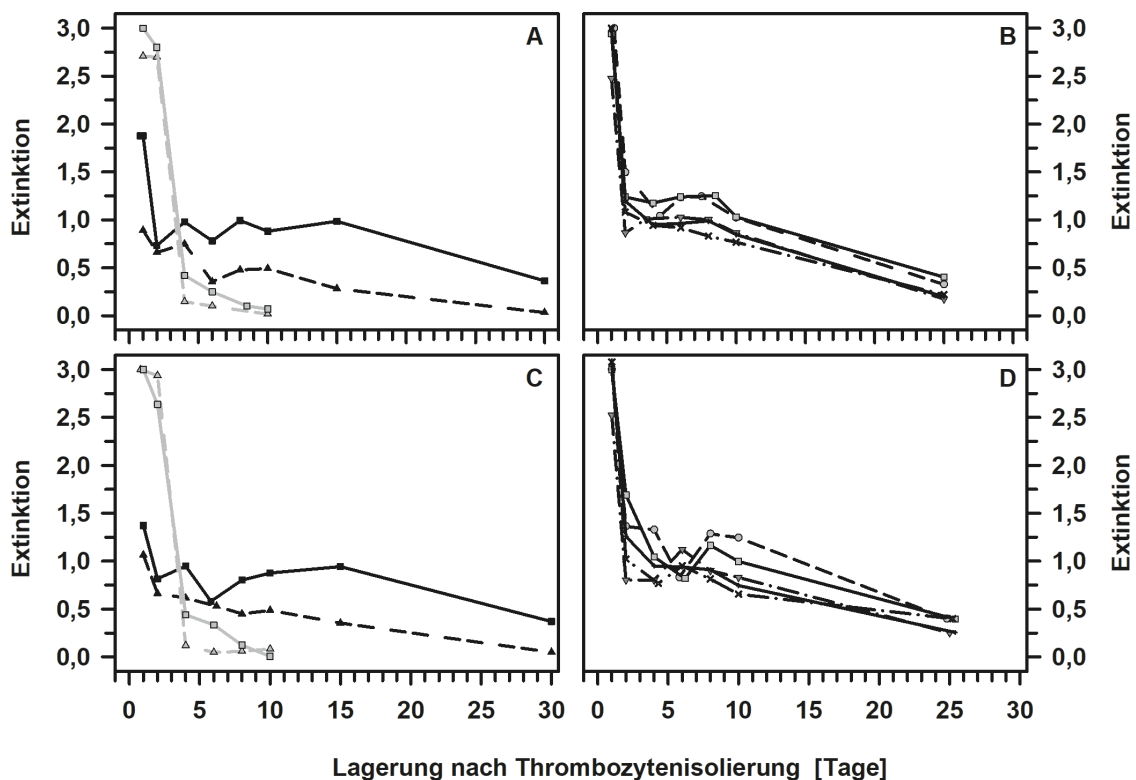


Abb. 16: Lagerung der Testthrombozyten für den Nachweis von Anti-HPA-2b-Ak.

Reaktion von HPA-2b-positiven Testthrombozyten (HPA-2a+b+) mit zwei Anti-HPA-2b-Ak-enthaltenden Humanseren (A/B, C/D) in Relation zur Dauer der Lagerung.

Die im MAIPA-Assay ermittelten Extinktionen der mit Leupeptin versetzten Testthrombozyten von zwei Spendern sind schwarz dargestellt, die ermittelten Extinktionen in Abwesenheit von Leupeptin sind grau abgebildet (A und C).

Die Extinktionen der mit Leupeptin versetzten Testthrombozyten von fünf weiteren Spendern sind in B und D dargestellt. Die Signale der Negativkontrollen von Thrombozyten mit Serum ohne plättchenreaktive Ak waren stets negativ (Extinktion < 0,2).

In Abhängigkeit von der Verfügbarkeit der HPA-typisierten Thrombozyten werden die Testthrombozyten entweder aus EDTA-Blut isoliert oder im Rahmen einer Thrombozytapherese gewonnen. In Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Thrombozytengewinnung werden die Plättchen mitunter erst am Folgetag mit Leupeptin versetzt und als Testthrombozyten verwendet.

Es war zu klären, ob der Zeitpunkt, zu dem Spenderthrombozyten mit Leupeptin versetzt werden, die Empfindlichkeit des Assays beeinflusst.

Dazu wurden Thrombozyten eines Spenders entweder sofort oder 24h später isoliert, mit Leupeptin versetzt und im Assay zum Nachweis von Anti-HPA-2b-Ak eingesetzt.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass der Zeitpunkt der Leupeptinzugabe nur eine geringe Rolle zu spielen scheint (Abb. 17).

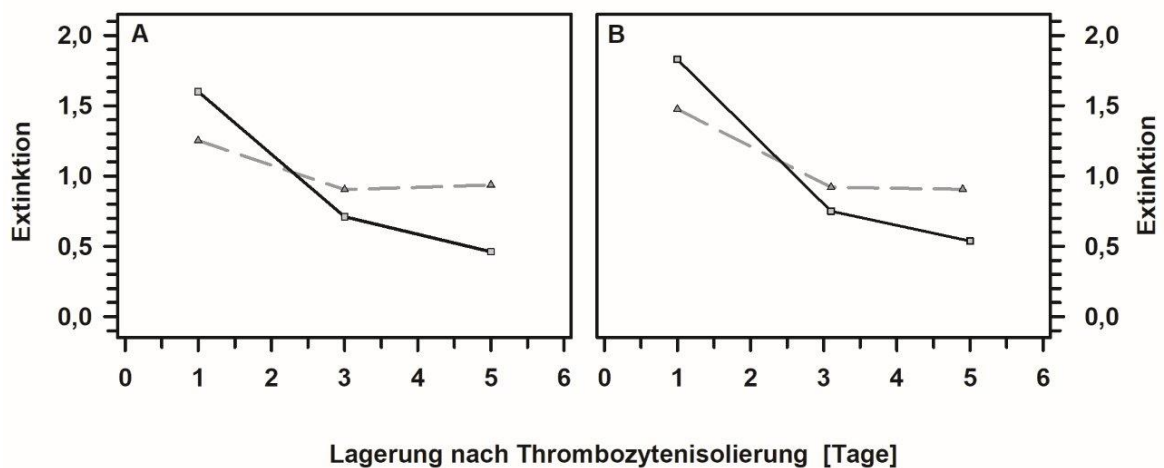


Abb. 17: Abhängigkeit des Alters der Testthrombozyten für den Anti-HPA-2b-Ak-Nachweis. Dargestellt sind die Thrombozyten eines Spenders, die entweder sofort nach der Spende (grau gestrichelt) bzw. nach 24h (schwarze Linie) isoliert und mit Leupeptin versetzt wurden. Anschließend wurde der Assay an definierten Tagen mit zwei verschiedenen HPA-2b-Ak-haltigen Humanseren (A, B) durchgeführt.

4.4 Lagerung von Testthrombozyten für den Anti-HPA-15b-Ak-Nachweis

Es war zu klären, wie lange der Nachweis von Anti-HPA-15b-Ak in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer der Testthrombozyten möglich ist.

Die Ergebnisse zeigten bereits innerhalb kurzer Zeit nach der Thrombozytenisolierung einen Abfall der Extinktion.

Der Phänotyp scheint keinen Einfluss auf den Aktivitätsverlust der antigenbindenden Struktur zu haben, jedoch waren höhere Extinktionen der auf das Allel 15b bezogenen homozygoten Zellen ermittelt worden (Abb. 18).

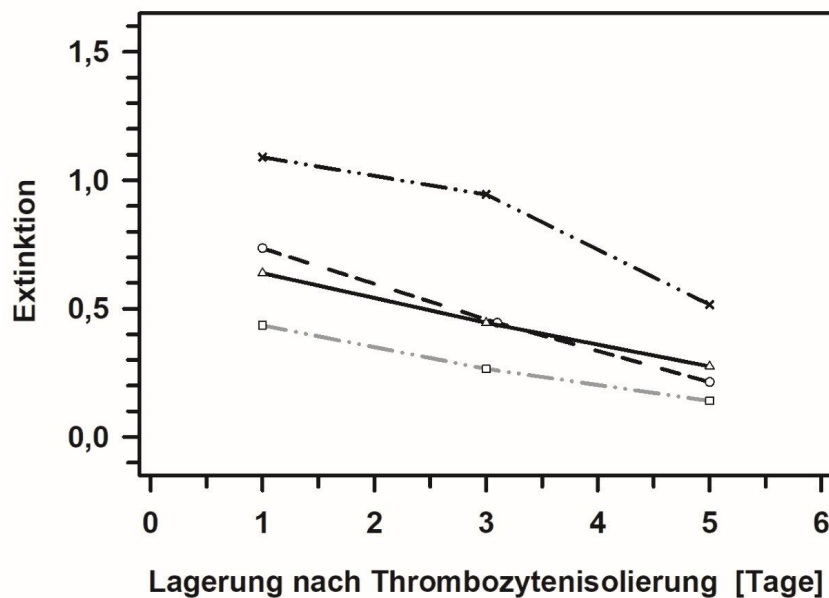


Abb. 18: Lagerung der Testthrombozyten für den Nachweis von Anti-HPA-15b-Ak

Dargestellt ist die Abhängigkeit der Extinktion von der Lagerung HPA-15b-positiver Testthrombozyten. Es wurden Testthrombozyten homozygoter (n=3) und eines heterozygoten Spenders (Quadrate mit grauer Linie) bezogen auf das Allel 15b eingesetzt.

4.5 Modifikation nach Hou

Hou et al. modifizierten den Assay, indem die mit humanen Ak-beladenen GP an einer mit Maus-Anti-human-GP funktionalisierten Oberfläche immobilisiert und durch eine Nachweisreaktion sichtbar gemacht werden.

Es war zu klären, ob der modifizierte Assay beim Nachweis unterschiedlicher Antikörperspezifitäten verlässlich ist.

Alle Seren mit HPA-1-Ak und HPA-5-Ak (mit Ausnahme eines Anti-HPA-1a-Ak- und eines Anti-HPA-5b-Ak enthaltenden Serums) ergaben im nach Hou modifizierten Protokoll höhere Signale (Abb. 19).

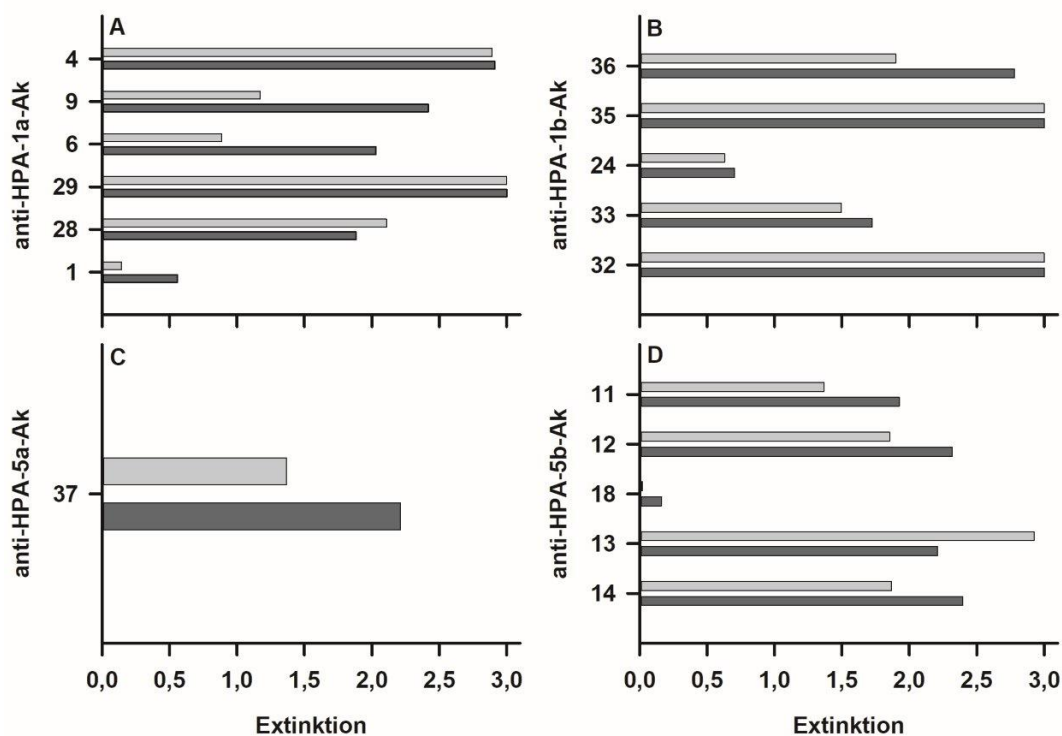


Abb. 19: Standard- und nach Hou modifiziertes Protokoll zum Nachweis von Anti-HPA-1-Ak (A, B) und Anti-HPA-5-Ak (C, D).

Dargestellt sind die ermittelten Extinktionen gemäß Standardprotokoll (hellgrau) und Hou modifiziertem Protokoll (dunkelgrau). A: Serum 30, 31, 8 und 20 (nicht dargestellt, siehe Abb. 24 im Anhang) reagierten gleich stark wie Serum 29. Die Signale der Negativkontrollen von Thrombozyten mit Serum ohne plättchenreaktive Ak waren stets negativ (Extinktion < 0,2).

In der Gruppe der HLA-I-Ak-enthaltenden Seren ergaben vier Seren ähnliche Ergebnisse im Standard- und nach Hou modifizierten Protokoll. Lediglich ein Serum reagierte inadäquat niedrig in beiden Protokollen (Abb. 20).

Der Vergleich zwischen dem aus 8 Spendern bestehenden HLA-I-Pool und den Testthrombozyten der einzelnen Spender ergab gleich hohe Signale im Hou-modifizierten Protokoll (siehe Anhang).

In der Analyse HPA-15b-Ak-enthaltener Seren erzielte der nach Hou modifizierte Assay negative Signale mit Testthrombozyten von zwei Spendern und scheint damit im Nachweis von Anti-HPA-15b-Ak keine ausreichend hohe Empfindlichkeit zu besitzen (Abb. 20).

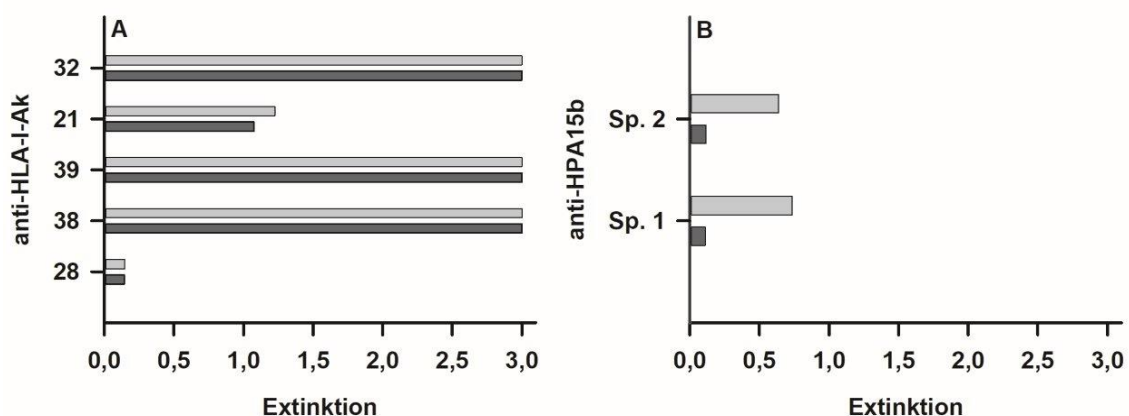


Abb. 20: Standard- und nach Hou modifiziertes Protokoll für den Nachweis von Anti-HLA-I-Ak (A) Anti-HPA-15b-Ak (B). Dargestellt sind die ermittelten Extinktionen gemäß Standardprotokoll (hellgrau) und Hou modifiziertem Protokoll (dunkelgrau).

Zur Analyse von Anti-HPA-15b-Ak wurden HPA-15b-positive Testthrombozyten von zwei Spendern (Sp.1 und 2) sowie ein Anti-HPA-15b-Ak-haltiges Serum verwendet (B). Die Signale der Negativkontrollen von Thrombozyten mit Serum ohne plättchenreaktive Ak waren stets negativ (Extinktion < 0,2).

Zur Analyse Auto-Ak-haltiger Seren wurden Seren mit Anti-GPIIb/IIIa-Auto-Ak (n=3), Seren mit Anti-GPIb/IX-Auto-Ak (n=3) sowie Seren mit sowohl Anti-GPIIb/IIIa-Auto-Ak als auch Anti-GPIb/IX-Auto-Ak (n=2) eingesetzt. Der nach Hou modifizierte Assay erzielte gleich hohe Extinktionen beim Nachweis von Anti-GPIIb/IIIa-Auto-Ak und - mit Ausnahme eines Serums - beim Nachweis von Anti-GPIb/IX-Auto-Ak. Seren mit beiden Auto-Ak-Spezifitäten erzielten mit Ausnahme eines Serums (Nachweis von Anti-GPIIb/IIIa-Ak) niedrigere Extinktionen im Hou-modifizierten Protokoll (Abb. 21).

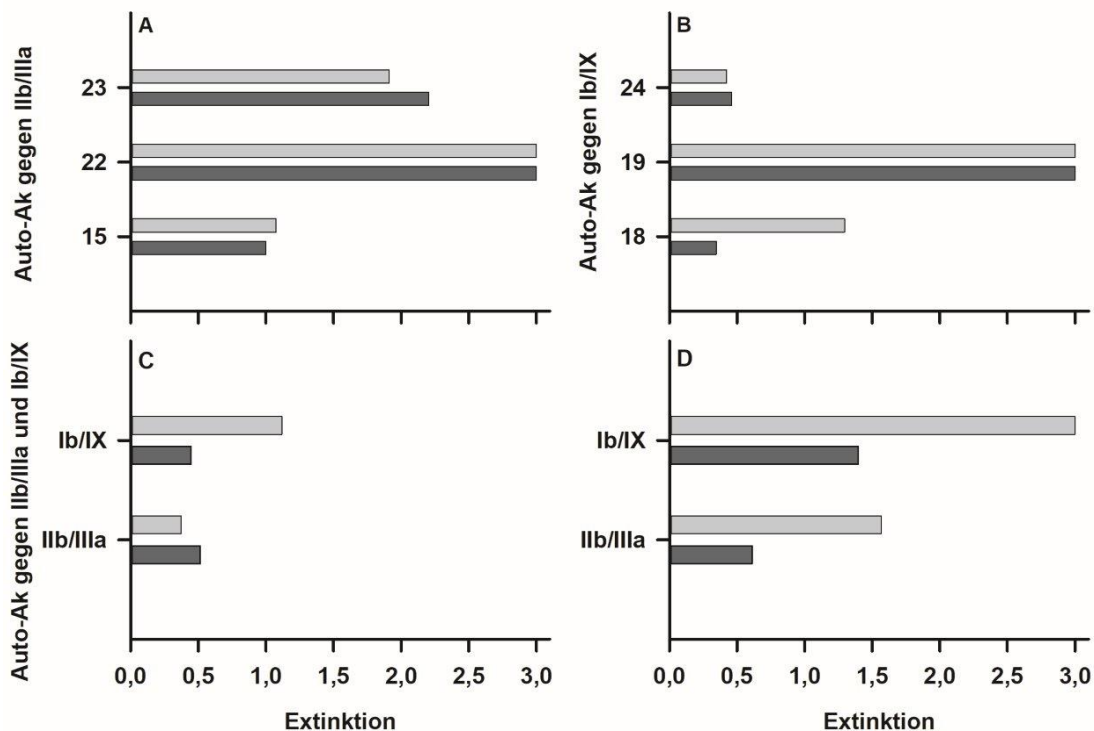


Abb. 21: Standard- und nach Hou modifiziertes Protokoll zur Analyse Auto-Ak-haltiger Seren. Dargestellt sind die Extinktionen von Seren mit Auto-Ak gegen GPIIb/IIIa (A) und Auto-Ak gegen GPIb/IX (B) gemäß Standardprotokoll (hellgrau) und Hou-modifiziertem Protokoll (dunkelgrau). In C und D sind die Assay-Signale zur Analyse von Seren mit Ak gegen GPIIb/IIIa als auch gegen GPIb/IX abgebildet (C: Serum 35, D Serum 36). Die Signale der Negativkontrollen von Thrombozyten mit Serum ohne plättchenreaktive Ak waren stets negativ (Extinktion < 0,2).

5 Diskussion

Der Nachweis von thrombozytären Allo- und Autoantikörpern ist für die Diagnose und Therapie nicht nur bei Patienten mit (bekannten) Thrombozytopenien und Thrombozytopathien, sondern auch bei ausbleibendem Erfolg einer Thrombozytentransfusion bedeutsam.

Für die Differenzierung von körpereigenen und körperfremden Thrombozyten ist neben dem HLA-System auch das für die Hämostase essentielle und durch Polymorphismen der Glykoproteine determinierte HPA-System relevant. In-vivo reicht das Spektrum der HPA-vermittelten Pathologien von einer leichten Gerinnungsstörung bis hin zu einer schweren Thrombozytopenie.

Die strukturelle und funktionelle Charakterisierung der thrombozytären GP sowie das Verständnis für die GP-vermittelte Interaktion zwischen Thrombozyten sowie zwischen Thrombozyten und umgebendem Gewebe haben dazu geführt, dass nicht mehr nur die Frage nach thrombozytenspezifischen zirkulierenden Ak, sondern auch die Frage nach der von diesen Ak erkannten Zielstruktur in den Fokus gerückt ist.

So lassen sich HLA-I-Ak häufig nach vorangegangenen Schwangerschaften nachweisen, spielen aber keine Rolle in der Pathogenese der FNAIT. Hier sind vielmehr Ak gegen GPIIb/IIIa, GPIb/IX und/oder GPIa/IIa, also Komponenten des HPA-Systems, ursächlich (Kaplan et al. 1991, Kroll et al. 1995).

Weiterhin ist das Wissen um die Spezifität zirkulierender plättchenreaktiver Ak für HPA- und HLA-kompatible Transfusionen relevant und Voraussetzung für die Typisierung der Spender. Folglich müssen alle Verfahren zum Nachweis thrombozytärer Ak mit hinreichender Sensitivität und Spezifität reproduzierbare Ergebnisse in angemessener Zeit liefern. Das Spektrum reicht von funktionellen bzw. eher „einfachen“ Suchtests bis hin zu ausgefeilten Kombinationen aus biochemischen und immunchemischen Verfahren (Abb. 22).

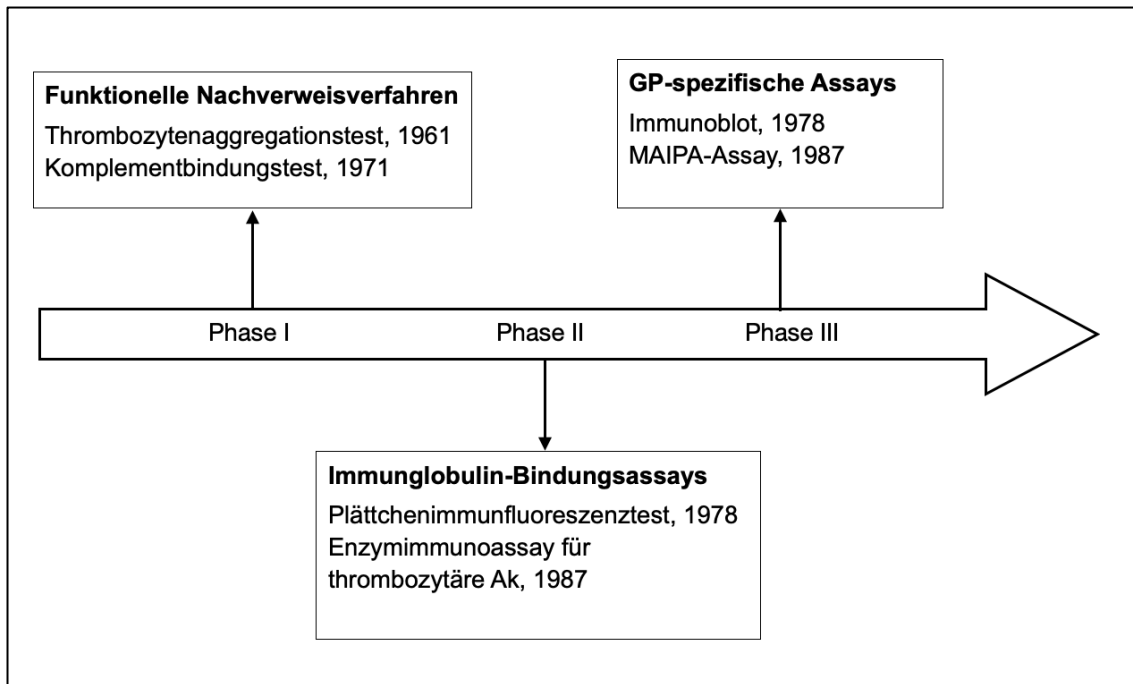


Abb. 22: Schematische Übersicht zur Evolution der Methoden zum Nachweis thrombozytärer Antikörper (Kiefel 2020). Phase I: Funktionelle Tests wie der Thrombozytenaggregationstest (Shulman et al. 1961) und der Komplementbindungstest (Shulman et al. 1961, Colombani et al. 1971). Phase II: Reaktion von Thrombozyten mit markierten Antiseren gegen humane Globuline. Phase III: Kombination aus biochemischen (SDS-PAGE) und immunchemischen Verfahren durch Einsatz GP-spezifischer monoklonaler muriner Anti-human-GP-Ak und markierter Sekundär-Ak gegen humane Ak.

Erste Techniken nutzten vorrangig die funktionellen Eigenschaften von Thrombozyten (Phase I).

Die Verfügbarkeit von Antiseren gegen humane Serumproteine sowie die Möglichkeit, diese mit geeigneten Markierungen zu versehen, führte zur Entwicklung der Immunglobulin-Bindungsassays (Phase II).

Autologe plättchenreaktive Ak können als plättchenassoziierte IgG (PAIgG) an autologen suspendierten Thrombozyten (Plättchen-Suspensions-Immunfluoreszenztest, PSIFT) durch Zusatz fluoreszenzmarkierter Antihumanglobuline nachgewiesen werden (von dem Borne et al. 1978). Durch Inkubation von den an einer Glasplatte fixierten Thrombozyten mit Serum und Zusatz eines markierten Detektorserums lassen sich zirkulierende Ak nachweisen (Plättchenadhäsionstest, PAIFT; Schneider and Schnaidt 1981).

Alternativ können thrombozytäre Allo-Ak nach Inkubation von Testthrombozyten mit der zu untersuchenden Serumprobe und Zusatz von Enzym-markiertem Antihumanglobulin

über eine Substratreaktion nachgewiesen werden (Enzymimmunoassay; Collins and Aster 1987). Diese Verfahren werden heute als Suchtests zum Nachweis thrombozytärer Ak sowie zur Kreuzprobe eingesetzt, um den Erfolg von Thrombozytentransfusionen bei immunisierten Patienten vorherzusagen.

Nachteil dieser Assays der Phase II ist die fehlende Diskriminierung zwischen HLA- und HPA-spezifischen Ak. Dieses Problem konnte durch die Behandlung der Thrombozyten mit Chloroquin als einem „Lösungsmittel“ für HLA-Antigene nur partiell gelöst werden (Nordhagen and Flaathen 1985).

Eine technisch einfache Differenzierung von Antikörpern gegen thrombozytäre HLA- und HPA-Antigene wurde erst durch die kommerzielle Verfügbarkeit monoklonaler Ak gegen definierte/bekannte thrombozytäre Glykoproteine möglich (Phase III). Davor wurden für den antigenspezifischen Nachweis von Ak gegen Thrombozyten aufwendige immunchemische Methoden wie Immunoblot und Radioimmunpräzipitation verwendet. Für den Immunoblot werden Glykoproteine eines Testthrombozyten-Lysats in der Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach dem Molekulargewicht getrennt und das Muster der Proteine auf eine Membran transferiert. Auf dieser Membran werden durch sequentielle Inkubation mit dem zu testenden Serum und mit markierten Antihumanglobulinen plättchenreaktive Ak als gefärbte Bande sichtbar gemacht (Huisman 1986). Aufgrund der Komplexität und des zeitlichen Aufwandes dieses mehrschrittigen Verfahrens (Isolierung thrombozytärer Membranproteine, Trennung nach Molekulargewicht, Überführen (Blotting) auf eine geeignete Membran und mehrstufige Nachweisreaktion), das mit einem Antigenverlust einhergehen kann und zudem allenfalls semiquantitative Informationen liefert, wird der Immunoblot im klinischen Alltag heute nicht mehr zum Nachweis plättchenreaktiver Ak eingesetzt. Darüber hinaus ist das Verfahren ungeeignet zum Nachweis von Ak gegen konformationsspezifische Antigene, die bei der SDS-PAGE zerstört werden. Dies trifft vor allem für thrombozytäre Auto-Ak zu.

Die ersten, auf monoklonalen GP-spezifischen Ak basierenden Testverfahren wurden von Woods und McMillan beschrieben (Woods et al. 1984b, McMillan et al. 1987). In dem von Woods entwickelten Assay werden Thrombozyten lysiert und die im Lysat enthaltenen GP selektiv an eine mit monoklonalen Maus-Anti-human-GP-Ak funktionalisierte MT-Platte gebunden. Nach Inkubation mit dem zu untersuchenden Serum erfolgte der Nachweis eventuell gebundener GP-spezifischer Ak durch markierte Sekundärantikörper gegen humane Immunglobuline. Während in den 80er Jahren überwiegend radioaktiv-markierte Detektionssysteme verwendet wurden, wird

inzwischen fast nur noch mit Enzym- oder Fluoreszenzfarbstoff-basierten Detektionssystemen gearbeitet.

Die unspezifische Bindung von humanen Ak an die Oberfläche der MT-Platte kann jedoch zu falsch-positiven Resultaten führen, während die Lyse der Thrombozyten zu Konformitätsänderungen der GP mit reduzierter Bindung an die murinen mAk und/oder der humanen Ak mit dem Risiko falsch-negativer Resultate einhergeht.

Mit der Entwicklung des MAIPA (Monoclonal Antibody-specific Immobilization of Platelet Antigens) - Assays konnten viele dieser Probleme überwunden werden (Kiefel et al. 1987). Ein großer Vorteil des Assays besteht darin, dass die humanen Plättchenantigene während der Inkubation mit dem zu untersuchenden Serum in nativer Konfiguration vorliegen. Erst nach Bindung von murinen „Fänger“-Ak und humanen Ak erfolgt die Lyse der Zellen und der Wechsel auf das „klassische“ ELISA-Format.

Damit ist der MAIPA-Assay ausgesprochen zeitaufwendig und Ergebnisse sind frühestens nach 7 Stunden zu erwarten. Zusätzlich muss für den MAIPA-Assay auf HPA- und HLA-typisierte Spenderthrombozyten zurückgegriffen werden, deren Verfügbarkeit aufgrund der individuell variablen HPA-Frequenz mitunter problematisch ist und deren Lagerungsfähigkeit als Panelzellen variiert.

Vor diesem Hintergrund zielte die Arbeit auf eine Optimierung der bestehenden MAIPA-Assay Protokolle ab.

Seit der Publikation des MAIPA-Assays wurden zahlreiche Modifikationen des ursprünglichen Protokolls (Kiefel et al. 1987) vorgestellt, die die Bedingungen, unter denen murine und humane Ak um die Bindung an die GP kompetieren, optimieren und den erforderlichen Zeitaufwand minimieren sollten.

Dennoch offenbaren die Workshops der ISBT (International Society of Blood Transfusion) regelmäßig große Unterschiede zwischen den Ergebnissen der teilnehmenden Laboratorien (Tab. 4). Im Rahmen des 12. ISBT Workshops zeigte sich, dass jedes der am Ringversuch teilnehmenden Labore mit einem anderen Protokoll (Reaktionsbedingungen, Techniken, Ak etc.) arbeitete (Bessos et al. 2005).

Zur Verbesserung der Qualität des MAIPA-Assays wird daher auf eine Standardisierung des Assays und entsprechende technische Expertise abgezielt.

Tab. 4: Ergebnisse der Ringversuche zum Nachweis thrombozytärer Antikörper

Autor / Jahr	Zahl der Labore	Ergebnisse		Schlussfolgerung
Bessos et. al. 2005 (12 th ISBT Workshop)	27	Ak-Nachweis 95% αHPA-1a/-5a 70% αHPA-1b/-3b/-5b 59% αHPA-15b	Sonstiges Unterschiedliche Protokolle aller Teilnehmer	- Auswahl der Testthrombozyten und mAk relevant - Standardisierung notwendig
Foxcroft et. al. 2007 (13 th ISBT Workshop)	28	Gleiche hohe Sensitivität von in-House- und MR- MAIPA	Hohe Interlaborvariabilität der Ergebnisse trotz standardisiertem Protokoll	- Neben dem Protokoll sind technische Expertise und Laborausstattung essentiell
Allen et al. 2007	34	Ak-Nachweis guter Allo-Ak Nachweis gegen hochfrequente Antigene 32% αHPA-15b Große Unterschiede beim αHPA-3a-Ak-Nachweis	Sonstiges Hohe Interlaborvariabilität der Ergebnisse Unterschiedliche Signalintensitäten mit versch. mAk-Klone	- Kombination zahlreicher Einzelschritte führt zur hohen Interlabor- variabilität
Wu et al. 2010 (14 th ISBT Workshop)	34	Ak-Nachweis 85-97% αHPA-1a/b,-5a/b 30% αHPA-3b 31,4% αHPA-15b	Sonstiges murine monoklonaler Ak gegen verschiedene Epitope des gleichen GP vorteilhaft	- Einsatz eines Panels muriner monoklonaler Ak sinnvoll
Bertrand et al. 2012	4	Heterogene (in-House)- Protokolle der Teilnehmer	Interlaborvariabilität der Ergebnisse trotz Verwendung <i>eines</i> standardisierten Protokolls	- Nutzen des in- House-Protokolls möglich, wenn Erfahrung in der Durchführung besteht
Lewin et al. 2018 (19 th ISBT Workshop)	28	Ak-Nachweis 89-100% Nachweis gegen hochfrequente Antigene 3-7% αHPA-15b 14-29% αHPA-3a	Sonstiges Hohe Interlaborvariabilität der Ergebnisse Unterschiedliche Signalintensitäten mit versch. mAk-Klonen gegen CD109	- Standardisieren der Protokolle und Verbesserung des Ak-Nachweises gegen niedrigfrequente Antigene notwendig

Die Angaben zum Ak-Nachweis beziehen sich auf die Ergebnisse der teilnehmenden Laboratorien und geben den Erfolg der entsprechenden Ak-Nachweise in % an.

ISBT = International Society of Blood Transfusion, αHPA = Anti-HPA-Ak, mAk = monoklonaler Ak
MR-MAIPA = Modified-Rapid MAIPA-Assay, modifizierter Assay von Campbell et al., der sich insbesondere durch veränderte Inkubationsbedingungen (Zeitdauer und Temperatur) vom Standardprotokoll unterscheidet (Campbell et al. 2007).

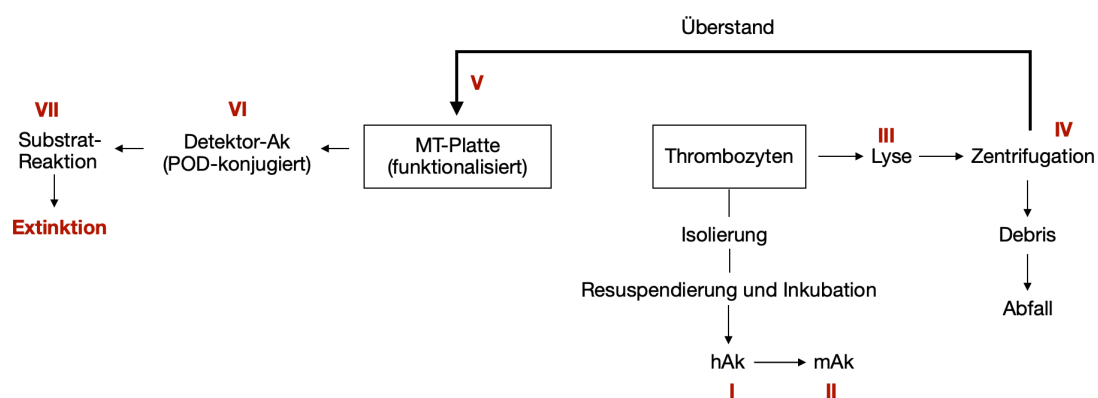
5.1 Teilschritte und zugehörige Reaktionsbedingungen des MAIPA-Assays

Einer der limitierenden Faktoren für die Bildung des trimolekularen Komplexes aus thrombozytenständigem GP, murinem und humanem Ak ist die Geschwindigkeit, mit der die Ak zur Zielstruktur diffundieren. Zusätzlich spielt die Affinität bzw. Avidität für die Komplexbildung eine Rolle und nicht zuletzt mag der bereits gebundene humane Ak auch die Bindung des murinen Ak negativ beeinflussen. So kann der humane Ak die Bindung des monoklonalen Ak behindern mit der Folge falsch negativer Signale, wenn die von dem humanen und dem monoklonalen Ak erkannten Epitope eng beieinander liegen oder sogar identisch sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das als vernachlässigbar angesehen, da geeignete monoklonale Antikörper für den Nachweis der untersuchten humanen Ak ausgewählt worden waren.

Die Bindung des Peroxidase-konjugierten (Ziege-Anti-human-GP) Detektorantikörpers ist die Voraussetzung für eine entsprechende Reaktion im MAIPA-Assay. Mit anderen Worten, der Assay basiert darauf, dass ein „Sandwich“ aus Fänger-Ak, murinem Ak, humanem GP, humanem Ak und Detektor-Ak gebildet wird.

Modifizierungen einzelner Schritte werden erst nach einem mehrschrittigen Verfahren sichtbar und es wird angenommen, dass es keine Wechselwirkungen mit der auf die Modifizierung folgenden Schritte gibt (Abb. 23).



hAk = humaner Ak, mAk = muriner monoklonaler Anti-human-GP-Ak, POD = Peroxidase

Abb. 23: Extinktion als Resultat des mehrschrittigen MAIPA-Assays

Das Ergebnis der Modifizierung jedes Teilschrittes (I-VII) ist erst am Ende des Assays sichtbar.

Sämtliche Beurteilungen der Ergebnisse stützen sich auf Bewertungen, die in der Routinediagnostik nach geltenden Standards erhoben wurden. So wurden Seren im thrombozytenserologischen Labor der Universitätsmedizin Rostock anhand der Signalintensitäten als niedrig- oder hochtitrig klassifiziert.

5.1.1 Modifizierte Inkubation der humanen und murinen Antikörper

Das ursprüngliche MAIPA-Assay Protokoll gab eine simultane Inkubation der Testthrombozyten mit Humanserum und murinem Ak vor (Kiefel et al. 1987). Um unspezifische Reaktionen durch natürlich vorkommende human-Anti-Maus-Ak zu vermeiden (Klee 2000), wurden die Testthrombozyten zunächst mit Humanserum und erst nach einem Waschschrift mit dem murinen Ak inkubiert (Kiefel 1992).

Der Zeitpunkt, zu dem die Inkubation mit humanem bzw. murinem Ak in thrombozytenserologischen Nachweisverfahren erfolgen sollte, wird in der Literatur kontrovers diskutiert.

Da die humanen Plättchenantigene bei der Verwendung intakter Thrombozyten während der Inkubation mit dem zu untersuchenden Serum in nativer Konfiguration vorliegen, wird einerseits der Verlust der von einem Ak erkannten Epitope reduziert und andererseits die Entstehung irrelevanter Neo-Epitope minimiert (Kaplan et al. 2007).

Auch eine Kompetition von humanen und murinen Ak um gleiche bzw. strukturell ähnliche Epitope, die zu falsch negativen Signalen im MAIPA-Assay führen, wird immer wieder diskutiert (Morel-Kopp et al. 1996, Kaplan et al. 2007).

Thrombozytäre Ak verschiedener Individuen erkennen in der Regel unterschiedliche Epitope (Kroll et al. 2005). Daher ist die Auswahl der murinen monoklonalen Ak schwierig, da Aussagen über die Kompetition mit dem potentiellen Ak nicht möglich sind. Manche Laboratorien arbeiten daher mit verschiedenen murinen monoklonalen Ak (Panel), die gegen unterschiedliche Epitope desselben GP gerichtet sind (Allen et al. 1994, Killie et al. 2010). Die Verwendung solcher Panel ist teuer und erhöht die Zahl der Tests deutlich.

In dem nach Hou modifizierten Protokoll erfolgt die Bindung des murinen Ak an die bereits von der Plättchenmembran gelösten GP (Hou et al. 2003). Hierbei kann es allerdings zu Konformationsänderungen der GP mit konsekutiv geänderten Bedingungen, unter denen sich die murinen Ak anlagern (möglicherweise geänderte Zugänglichkeit/Zerstörung des Epitops, Bildung von Neoepitopen), kommen.

Die Modifikation unseres Protokolls nach dem Vorgehen von Hou führte zu identischer Signalintensität bei Seren mit Allo-Ak gegen GPIIb/IIIa, Ia/IIa und HLA-I sowie bei solchen mit Auto-Ak gegen GPIIb/IIIa und GPIb/IX. Lediglich bei panreaktiven Auto-Ak wurden niedrige Signalintensitäten von Anti-GP-IIb/IIIa- und Anti-GP-Ib/IX-Auto-Ak ermittelt.

Ein Serum mit Anti-HLA-I-Ak ergab weder im regulären, noch im modifizierten MAIPA-Assay ein positives Signal. Dieses Serum lagerte aliquotiert bei -20 °C und stammte von einem Patienten mit bekannt niedrigem Anti-HLA-I-Ak-Titer. Es ist zu vermuten, dass die Aktivität dieses Ak während der Lagerung weiter abgenommen hat.

Im Vergleich zur vorliegenden Studie untersuchte die Arbeitsgruppe um Hou ausschließlich Auto-Ak gegen GPIIb/IIIa, dennoch existieren Publikationen, in denen die beschriebene Modifikation auch im Rahmen des Nachweises von Auto-Ak gegen GPIb/IX erfolgreich eingesetzt wurde (Liu et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurden niedrigere Signale mit panreaktiven Auto-Ak im von Hou modifizierten Protokoll gemessen.

Die Versuchsreihe wurde mit jeweils einem monoklonalen Maus-Anti-human-GP-Ak pro GP durchgeführt. Die Arbeitsgruppe um Liu verwendete den gleichen murinen Ak gegen GPIIb/IIIa (P2), aber einen anderen Klon gegen GPIb/IX (SZ2 statt FMC-25). Es wird angenommen, dass monoklonale Ak partiell mit der Bindung von Auto-Ak der GP interagieren und um Epitope konkurrieren bzw. nach Bindung die Konformation des Zielproteins verändern (Santoso et al. 1986, Tsubakio et al. 1987). Möglicherweise führt die Verwendung anderer muriner mAk-Klone durch die Bindung an andere Epitope zu höheren ELISA-Signalen beim Nachweis von panreaktiven Auto-Ak.

5.1.2 Modifizierte Inkubation des trimolekularen Komplexes und Sekundär-Antikörpers

Die Immobilisierung des trimolekularen Komplexes (humaner Anti-GP-Ak, humanes GP, muriner Anti-human-GP-Ak) an die mit Ziege-Anti-Maus-Ak-beschichtete MT-Platte und die Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten Detektorantikörper sind mit 90 bzw. 120 min die Schritte mit dem größten zeitlichen Aufwand.

Modifizierte Inkubationsbedingungen des MAIPA-Assays sind Bestandteil zahlreicher in-House-Protokolle und basieren auf einer von Campbell et al. publizierten Arbeit. Zur Standardisierung der in unterschiedlichen Laboratorien verwendeten Protokolle

entwickelte die Arbeitsgruppe den Modified-Rapid MAIPA-Assay (MR-MAIPA-Assay), welcher die Dauer des Assays, insbesondere durch veränderte Inkubationstemperaturen, auf circa 5 Stunden reduzierte.

Im Vergleich zum Standardprotokoll erzielte der MR-MAIPA-Assay eine höhere Sensitivität beim Nachweis von Allo-Ak gegen HPA-1, -2, -3 und -5 sowie Auto-Ak gegen GPIIb/IIIa und GPIb/IX (Campbell et al. 2007).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass sowohl Zeit als auch Temperatur für die Signalintensität entscheidend sind.

Leider kam es bei der Immobilisierung des trimolekularen Komplexes unter den veränderten Bedingungen zu unspezifischen Reaktionen der Negativkontrollen.

Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Campbell et al., auch wenn diese und unsere Arbeitsgruppe mit geringfügig unterschiedlichen Protokollen arbeiteten. So erfolgte die Immobilisierung des trimolekularen Komplexes an die MT-Platte in beiden Fällen bei 37 °C für 30 min, während die Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten Ziege-Anti-human-Ak bei 20 °C für 60 min (Campbell et al. 2007) bzw. bei 37 °C für 30, 60 oder 120 min (diese Arbeit) durchgeführt wurde. Die HPA-typisierten Testthrombozyten lagerten bei Campbell et al. lyophilisiert und wurden nach der Rekonstitution maximal drei Tage verwendet. Im Thrombozytenlabor der Universität Rostock werden die Testthrombozyten für die Routinediagnostik (mit Ausnahme von Thrombozyten für die Anti-HPA-2b- und Anti-HPA-15-Ak-Diagnostik) in Suspension bei 4 °C über mehrere Monate gelagert.

Dennoch sind die Immobilisierung des trimolekularen Komplexes sowie die Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten Detektor-Ak für sich betrachtet nur zwei Teilschritte des MAIPA-Assays. So wurden unspezifische Signale der Negativkontrollen, sowohl bei modifizierten Inkubationen, als auch der simultanen Inkubation der Testthrombozyten mit dem zu untersuchenden Serum und dem murinen Ak beschrieben (Bertrand et al. 2012).

5.2 Einsatz und Lagerung der Testthrombozyten

Für viele Verfahren zum Nachweis zirkulierender thrombozytärer Ak ist der Einsatz von Thrombozyten gesunder Spender mit bekannten HPA- und HLA-Antigenen notwendig.

Die HLA- und HPA-Typisierung erfolgt im Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsmedizin Rostock, sodass zum einen stets typisierte Thrombozyten als Panelzellen im Rahmen der Diagnostik und zum anderen potentielle Thrombozytenspender für Patienten mit Anti-HPA- bzw. -HLA-Ak zur Verfügung stehen. Um die Konzentration humaner plättchenreaktiver Ak im MAIPA-Assay zu bestimmen, werden in der Regel $20 \cdot 10^6$ Testthrombozyten/Ansatz eingesetzt.

Diese Thrombozytenzahl scheint nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit für eine ausreichende Signalintensität zu genügen.

In lediglich einem von 9 Seren mit Anti-HPA-1a-Ak zeigte sich eine mit steigender Thrombozytenzahl abnehmende Signalintensität (Abb. 10; A, Symbol x), für die sich zunächst keine Erklärung finden lässt.

Bei einem Serum mit ohnehin geringem Anti-HPA-1a-Ak-Titer konnte auch bei maximaler Thrombozytenzahl kein zufriedenstellendes Signal erreicht werden. Hier ist zu vermuten, dass die Aktivität des Ak während der Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgenommen hat.

Die aufgrund der ELISA-Ergebnisse als niedrig- oder hochtitrig kategorisierten Seren erlauben keine Diskriminierung zwischen der Ak-Konzentration und der Ak-Affinität.

Quantitative Bestimmungen niedriger Ak-Titer sind anspruchsvoll und oftmals falsch-negativ. Mit Hilfe der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (surface plasmon resonance, SPR) konnte gezeigt werden, dass bei niedrigen Ak-Titern das Gleichgewicht zugunsten der Dissoziation von Antigen und Antikörper verschoben ist (Bakchoul et al. 2011, Socher 2009). Weiterhin ist damit zu rechnen, dass niedrig-affine Ak durch häufiges Waschen von ihrem korrespondierenden Antigen dissoziieren. Dieses ist insbesondere für die Diagnostik der FNAIT relevant, da hier auch Anti-HPA-1a-Ak mit niedriger Affinität ursächlich sein können (Peterson 2013).

Die Zahl der eingesetzten Testthrombozyten variiert zwischen den Laboratorien, entspricht aber im Mittel der im Rostocker Institut für Transfusionsmedizin verwendeten Thrombozytenzahl (Tab. 5).

Die unspezifischen Reaktionen bei der Analyse Anti-HPA-5b-Ak-haltiger Seren resultieren vermutlich aus der zusätzlichen Manipulation der Testthrombozyten (3.4.1).

Tab. 5: Zahl der Testthrombozyten in ausgewählten Arbeiten

Autor / Jahr	Zahl der Protokolle	Zahl der Testthrombozyten/well
Bessos et al. 2005	27	$6 \cdot 10^6 - 4 \cdot 10^{10}$
Campbell et al. 2007	1	$10 \cdot 10^6$
Killie et al. 2010	1	$20 \cdot 10^6$
Bertrand et al. 2012	4	$10 \cdot 10^6 - 30 \cdot 10^6$

Der grundsätzliche Einsatz höherer Zellzahlen beim Screening auf hochfrequente plättchenreaktive Ak ist fraglich, da sich damit der Verbrauch von murinen monoklonalen GP-spezifischen Ak erhöht. Bei der Analyse von Seren mit bekannt/vermutet niedrigem Ak-Titer kann eine Erhöhung der Testthrombozytenzahl erwogen werden.

5.2.1 Nachweis von Anti-HPA-2b-Ak

Neben der Verfügbarkeit und der Aufbereitung von definierten HPA- und HLA-typisierten Testthrombozyten beeinflusst die Lagerung dieser Thrombozyten die Signalintensität des MAIPA-Assays. Während Testthrombozyten für den Nachweis von Allo-Ak gegen GPIIb/IIIa, GPIa/IIa und HLA-I sowie Auto-Ak gegen GPIIb/IIIa mehrere Monate bei 4 °C gelagert werden können, erfordert die Analyse von Seren mit Anti-HPA-2b-Ak einen höheren Aufwand. Einerseits stehen aufgrund der niedrigen Frequenz von HPA-2b von 11,8 % in Deutschland nicht viele Spender zur Verfügung (Kiefel 2010b), andererseits ist HPA-2b anfällig für den Abbau durch Serinproteasen, sodass die Testthrombozyten im Institut für Transfusionsmedizin der Universitätsmedizin Rostock regelhaft in Gegenwart von Leupeptin für maximal 7 Tage gelagert werden.

Die Wirkung von Leupeptin auf thrombozytäre Membranproteine wurde erstmals 1986 beschrieben (Yamamoto et al. 1986). So wird die α -Kette des thrombozytären GPIIb in zwei unterschiedlich große Fragmente gespalten, was durch die Gegenwart von Leupeptin verhindert wird. In dieser Arbeit konnte der mit zunehmender Lagerung der Plättchen einhergehende, sukzessive Abfall der Signalintensität beim Nachweis von Anti-HPA-2b-Ak gezeigt werden. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Lagerung der HPA-2b-Testthrombozyten (HPA-2a+b+) über 10 Tage möglich ist.

Das Alter der Testthrombozyten zum Zeitpunkt der Isolierung bzw. des Zusatzes von Leupeptin scheint den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge nur eine geringe Rolle zu spielen.

Dies wird durch Untersuchungen des 19. Workshops der ISBT 2018 bekräftigt. Die Teilnehmer untersuchten den Einfluss einer zeitlich verzögerten Thrombozytenisolierung in Kombination mit der Lagerung dieser Testthrombozyten für den Nachweis von Anti-HPA-3-Ak. Während die verzögerte Isolierung der Thrombozyten nur einen geringen Effekt hatte, ergab die Kombination aus der verzögerten Isolierung *und* Lagerung der Plättchen einen relevanten Signalverlust im MAIPA-Assay (Lewin et al. 2020).

Um die Verfügbarkeit und Lagerung von Testthrombozyten zu vereinfachen, verwenden viele Laboratorien lyophilisierte bzw. kryokonservierte Panelzellen. Ein großer Nachteil ist jedoch die Instabilität einzelner Antigene.

Während die Sensitivität und Spezifität des MAIPA-Assays durch einheitliche Panelzellen verbessert werden könnte, ist die Aufbereitung kryokonservierter Panelzellen untersucherabhängig (Foxcroft et al. 2007). Andere Untersuchungen erzielten niedrigere Signalintensitäten mit der Verwendung lyophilisierter Testthrombozyten (Killie et al. 2010).

5.2.2 Nachweis von Anti-HPA-15b-Ak

Der Nachweis von Ak gegen das auf CD109 lokalisierte Antigen HPA-15 wird durch die niedrige (2000 ± 400 Moleküle auf aktivierten Thrombozyten, deutlich niedrigere Expression auf ruhenden Plättchen) und variable Dichte von CD109 auf der Thrombozytenmembran erschwert (Sutherland et al. 1991). Daher ist die sorgfältige Auswahl HPA-15-typisierter Plättchen für den zuverlässigen Nachweis von Anti-CD109-Ak entscheidend. Zusätzlich ist das Antigen instabil, sodass Panelzellen für den Nachweis von Anti-HPA-15b-Ak unmittelbar nach der Spende aufbereitet werden müssen und nur kurze Zeit gelagert werden können (Ertel et al. 2005, Maślanka et al. 2012). Zudem sollten vorrangig Plättchen homozygoter Spender mit einer hohen Dichte von CD109 als Panelzellen genutzt werden (Ertel et al. 2005).

Mit den in dieser Arbeit für den Nachweis von HPA-15b-Ak verwendeten homozygoten Testthrombozyten wurden in Übereinstimmung mit diesem Vorgehen die höchsten Signale erzielt.

Weiterhin konnte der mit zunehmender Lagerung einhergehende sukzessive Abfall der Signalintensität gezeigt werden.

Im Rahmen des 19. ISBT Workshops 2018 wurde die Notwendigkeit eines standardisierten MAIPA-Assay Protokolls für den Nachweis von Anti-HPA-15b-Ak erneut betont. Nur 3-7 % von 25 Laboren konnten Anti-HPA-15b-Ak nachweisen (Lewin et al. 2020).

Womöglich verbessert sich die Zuverlässigkeit des MAIPA-Assays künftig beim Nachweis von Anti-HPA-15b-Ak durch die Verwendung eines lyophilisierten WHO-Referenzserums (Sharp and Studholme 2020).

5.3 Limitationen

Der MAIPA-Assay erfordert durch die Kombination von zellbasiertem und klassischen MT-Platten-abhängigen ELISA Verfahren gut ausgestattete Laboratorien und entsprechend gut geschultes Personal.

In dieser Arbeit wurde eine große Anzahl bekannter Seren verwendet, die im MAIPA-Assay in mehreren unterschiedlichen Modifizierungen größtenteils als Einfachbestimmungen eingesetzt wurden. Von den ermittelten Ergebnissen ist kein generelles Ableiten auf einzelne Assay-Schritte bzw. den Einsatz von Reagenzien möglich.

Um weiterführende Aussagen treffen zu können, sind quantifizierende Untersuchungen und die Kombination von Modifizierungen sowie höhere Versuchszahlen für reproduzierbare Ergebnisse notwendig.

5.4 Ausblick

Die Entwicklungen für den Nachweis thrombozytenreaktiver Ak zielen insgesamt auf eine Standardisierung der Reagenzien, die Verfügbarkeit der Diagnostika für periphere Laboratorien sowie eine Verbesserung der Zuverlässigkeit für die Erfassung niedrigfrequenter bzw. niedrig-affiner Ak ab.

So kann die klassische ELISA-Platte durch Beads, die mit murinen mAk beschichtet sind, ersetzt werden (simultaneous analysis of specific platelet antibodies (SASPA)-Assay; Nguyen et al. 2004, Nguyen et al. 2010) oder es kommen biotinylierte murine mAk zum Einsatz, um den trimolekularen Komplex (humaner Ak, humanes GP, biotinylierter muriner mAk) an Streptavidin-beschichtete Beads zu binden (Mörtberg et al. 2016).

Die dann mögliche durchflusszytometrische Auswertung ist apparativ aufwendig, führt aber in deutlich kürzerer Zeit zu reproduzierbaren Ergebnissen.

Neben überwiegend manuell durchzuführenden Assays sind entsprechend den individuell entwickelten Protokollen (in-house) kommerzielle GP-spezifische Assays verfügbar. Im PakLx Immunoassay (Immucor, Dreieich) werden die mit definierter HPA-Beschichtung eingesetzten Beads simultan mit dem zu untersuchenden Serum inkubiert und die humanen Ak durch Zusatz von Fluoreszenz-markiertem Antiserum gegen humane Immunglobuline nachgewiesen. Mit einer Dauer von 3 Stunden ist der Assay deutlich zeitsparender als der MAIPA-Assay. Für viele Ak-Spezifitäten sind die Ergebnisse des PakLx mit denen des MAIPA-Assays vergleichbar, während der Nachweis von Anti-HPA-3a- und -HPA-15-Ak nur unzureichend erfolgt (Porcelijn et al. 2014). Grundsätzlich ist der Einsatz dieser Systeme als Screening auch in peripheren Laboratorien sinnvoll, die Diagnostik sollte aber bei Diskrepanzen oder der Suche nach niedrigfrequenten Ak durch spezialisierte Nachweisverfahren ergänzt werden (Rockenbauer et al. 2015).

Die Diagnose von niedrig-affinen Ak und eines entsprechend labilen Antigen-Antikörper-Komplexes ist herausfordernd. Häufiges Waschen wird einen bereits nur schwach mit dem Antigen interagierenden Ak leichter entfernen. Hier könnte die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie geeigneter sein, da weder Waschschrte, noch murine monoklonale Ak benötigt werden (Socher 2009). Durch die Immobilisierung der Antigene an eine Sensoroberfläche und die Zugabe von IgG aus dem zu untersuchenden Serum ermöglicht die SPR-Spektroskopie die Analyse einer

Antigen-Antikörper-Bindung in Echtzeit. Da die Geräte sehr teuer und in nur wenigen Laboratorien vorhanden sind, ist die SPR-Spektroskopie als Routinemethode derzeit (noch) nicht verfügbar.

Biotechnologisch hergestellte Panelzellen mit thrombozytären Antigenen könn(t)en anstelle von Thrombozyten in Testsystemen verwendet werden und ermöglichen den zuverlässigen Nachweis von Ak gegen „labile“ und gering exprimierte Antigene. Dieses Verfahren wurde für den Nachweis von Ak gegen HPA-3 und -9 sowie HPA-15 erfolgreich eingesetzt (Zhang 2019, Hayashi 2010, Koh et al. 2020).

Seit seiner Entwicklung ist der MAIPA-Assay ein etabliertes thrombozytenimmunologisches Verfahren, das zwar zeitlich aufwendig ist, jedoch zuverlässige Antworten auf klinische Fragestellungen liefert. Die Entwicklungen der letzten Jahre machen deutlich, dass die Durchführung des MAIPA-Assays auch nach der Etablierung kommerzieller ELISA für spezifische Fragen der Antikörperdiagnostik erforderlich ist.

6 Zusammenfassung

Thrombozyten und die auf ihrer Membran lokalisierten Glykoproteine sind für die Hämostase sowie die Kommunikation untereinander und mit anderen Zellen essentiell. Verschiedene Ereignisse wie Schwangerschaften, Transfusion von Blutprodukten oder autoimmunologische Erkrankungen können die Bildung von Antikörpern gegen diese Glykoproteine auslösen und zu einem beschleunigten Thrombozytenabbau führen. Klinisch reicht das Spektrum von milden (subklinischen) Thrombozytopenien über Haut- und Schleimhautblutungen bis hin zu schweren hämorrhagischen Diathesen.

Während in der Vergangenheit mit funktionellen Tests zum Nachweis von thrombozytenreaktiven Antikörpern gearbeitet wurde, sind heute immunchemische Verfahren mit einem Fokus auf die Erfassung der Ak-Spezifität Standard. Eines dieser glykoproteinspezifischen Nachweisverfahren ist der 1987 entwickelte Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigens (MAIPA)-Assay, der auf der Immobilisierung eines trimolekularen Komplexes aus humanen (Allo- oder Auto)-Ak, thrombozytärem Glykoprotein und murinen monoklonalen Anti-human-GP-Ak an einer Festphase und anschließender Detektorreaktion basiert. Der MAIPA-Assay ist jedoch technisch und zeitlich aufwendig und ist auf die Verfügbarkeit von Testthrombozyten angewiesen, sodass die Testbedingungen im Rahmen dieser Arbeit optimiert werden sollten. Dafür wurden Teilschritte des MAIPA-Assays modifiziert und die Effekte dieser Modifikation anhand von Humanseren mit bekannter Ak-Spezifität evaluiert. Zusätzlich wurde der Einfluss von Zahl und Lagerung der HPA- und HLA-typisierten Testthrombozyten untersucht.

Die Inkubationsbedingungen (Zeit und Temperatur) für die Immobilisierung des trimolekularen Komplexes und die Anlagerung des Detektor-Ak wirken sich auf die Signalintensität des MAIPA-Assays aus. Mit zunehmender Inkubationszeit und -temperatur steigt die Intensität unspezifischer Signale. Die Zahl der Testthrombozyten als Träger der Antigendeterminanten scheint mit $20 \cdot 10^6$ /Ansatz zu genügen, um ein hinreichend hohes Signal im MAIPA-Assay zu erzielen.

Leupeptin verhindert die Spaltung der α -Kette des GPIb und ist für die Lagerung der HPA-2b-Testthrombozyten ein geeigneter Proteaseninhibitor.

Testthrombozyten für den Nachweis von Anti-HPA-15b-Ak sollten von homozygoten Spendern gewonnen und nur kurz gelagert werden.

7 Thesen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss Modifizierungen von Teilschritten und Reagenzien auf die Signalintensität im Monoclonal-Antibody-Immobilization of Platelet Antigens (MAIPA) - Assay haben.

1. Der MAIPA-Assay ist ein etabliertes thrombozytenimmunologisches Verfahren, das zuverlässige Antworten auf klinische Fragestellungen liefert und auch nach der Entwicklung kommerzieller Assays für die Diagnostik von Thrombozytopenien und Thrombozytopathien bedeutsam ist.
2. Der MAIPA-Assay basiert als mehrschrittiges, überwiegend manuelles glykoproteinspezifisches Nachweisverfahren auf der Bildung eines trimolekularen Komplexes aus humanem Glykoprotein, humanem Antikörper und murinem Antikörper, der an eine Festphase gebunden und mit einem Detektorantikörper nachgewiesen wird. Inkubationszeit und -temperatur haben einen Einfluss auf die Signalintensität des MAIPA-Assays bei der Immobilisierung des trimolekularen Komplexes und der Anlagerung des Detektor-Antikörpers.
3. Für die Durchführung des indirekten MAIPA-Assays werden Thrombozyten mit bekannter HPA- und HLA-Spezifität (Testthrombozyten) benötigt, deren Zahl von $20 \cdot 10^6$ /Ansatz hinreichend ist, um eine ausreichend hohe Signalintensität im MAIPA-Assay zu erzielen.
4. Der Proteaseninhibitor Leupeptin verhindert die Spaltung der Iba-Kette des GPIIb/IX durch Serinproteasen, sodass HPA-2(a+b+) Testthrombozyten in Gegenwart von Leupeptin 10 Tage für den Nachweis von Anti-HPA-2b-Ak gelagert werden können.
5. Der Zeitpunkt der Isolierung und des Versetzens der HPA-2b-Testthrombozyten mit Leupeptin spielt nur eine untergeordnete Rolle.
6. Thrombozyten für den Nachweis von Anti-HPA-15b-Ak sollten von homozygoten Spendern stammen und unmittelbar nach der Thrombozytenspende isoliert und als Testthrombozyten verwendet werden.

7. Interaktionen von verschiedenen Antikörperspezifitäten (z.B. Maus und Mensch) können zu unspezifischen Signalen führen. Das aus diesem Grund modifizierte Protokoll von Hou et. al 2003 eignet sich für den Nachweis von Alloantikörpern gegen HPA-1 und -5, HLA-I sowie Autoantikörpern gegen IIb/IIIa bzw. Ib/IX, nicht hingegen für den Nachweis von HPA-15-Antikörpern.

8 Literaturverzeichnis

Allen, D., Chapman, J., Phillips, P. and Ouwehand, W. (1994) 'Sensitivity of the platelet immunofluorescence test (PIFT) and the MAIPA assay for the detection of platelet-reactive alloantibodies: a report on two U.K. National Platelet Workshop exercises', *Transfus Med*, 4(2), 157-64.

Bakchoul, T., Bertrand, G., Krautwurst, A., Kroll, H., Bein, G., Sachs, U. J., Santoso, S., Kaplan, C. (2013) 'The implementation of surface plasmon resonance technique in monitoring pregnancies with expected fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia', *Transfusion*, 59(3), 2078-2085.

Bakchoul, T., Kubiak, S. and Krautwurst, A. (2011) 'Low-avidity Anti-HPA-1a alloantibodies are capable of antigen-positive platelet destruction in the NOD/SCID mouse model of alloimmune thrombocytopenia', *Transfusion*, 51(11), 2455-61.

Bertrand, G., Bakchoul, T., Javela, K., Killie, M. and Kaplan, C. (2012) 'Interlaboratory workshop on Anti-HPA-1a alloantibody quantification with the mAb-specific immobilization of platelet antigen technique', *J Thromb Haemost*, 10, 1172-74.

Bessos, H., Wilson, D., Metcalfe, P., Allen, D. and Urbaniak, S. (2005) 'Report on the 12th International Society of Blood Transfusion platelet immunology workshop', *Vox Sang*, 89(2), 105-13.

Branehög, I., Kutti, J., Weinfeld, A. (1974) 'Platelet survival and platelet production in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP)', *Br J Haematol*, 27(1), 127-143.

Bugert, P., Klüter, H. (2010) 'Das thrombozytäre Transkriptom' in *Hämostaseologie*, Springer, Berlin, Heidelberg: Pötzsch, B., Madlener, K., 43-50.

Burkhardt, J., Vaudel, M., Gambaryan, S., Radau, S., Walter, U., Martens, L., Geiger, J., Sickmann, A. and Zahedi, R. (2012) 'The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways', *Blood*, 120(15), e73-82.

Campbell, K., Rishi, K., Howkins, G., Gilby, D., Mushens, R., Ghevaert, C., Metcalfe, P., Ouwehand, W. and Lucas, G. (2007) 'A modified rapid monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigen assay for the detection of human platelet antigen (HPA) antibodies: a multicentre evaluation', *Vox Sang*, 93(4), 289-97.

Chang, S., Chen, Y., Fitzgerald, L. and Honn, K. (1991) 'Analysis of integrin mRNA in human and rodent tumor cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 176(1), 108-13.

Collins, J. and Aster, R. (1987) 'Use of immobilized platelet membrane glycoproteins for the detection of platelet-specific alloantibodies in solid-phase ELISA', *Vox Sang*, 53, 157-61.

Colombani, J., D'Amaro, J., Gabb, B., Smith, G. and Svejgaard, A. (1971) 'International agreement on a microtechnique of platelet complement fixation (Pl. C fix.)', *Transplant Proc*, 3, 121-6.

EMBL-EBI (2015) 'All HPA - Alloantigen/Protein Data', [online], available: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/hpa/table1.html> 2015, [16.12.2020].

Ertel, K., Al-Tawil, M., Santoso, S. and Kroll, H. (2005) 'Relevance of the HPA-15 (Gov) polymorphism on CD109 in alloimmune thrombocytopenic syndromes', *Transfusion*, 45(3), 366-73.

Fleischer, B. (2010) 'Physiologie und Pathophysiologie des Immunsystems' in *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*, Berlin Heidelberg: Kiefel, V., 64-67.

Foxcroft, Z., Campbell, K., Merieux, Y., Urbaniak, S., Brierley, M., Rigal, D., Ouwehand, W., Metcalfe, P. and Workshop, t. I. S. o. B. T. P. I. (2007) 'Report on the 13th International Society of Blood Transfusion Platelet Immunology Workshop', *Vox Sang*, 93(4), 300-5.

Gawaz, M. (1999) 'Medikamenteninduzierte Thrombozytopenie' in *Das Blutplättchen*, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 80-84.

Gear, A. (1984) 'Rapid platelet morphological changes visualized by scanning-electron microscopy: kinetics derived from a quenched-flow approach', *Br J Haematol*, 56(3), 387-98.

Greinacher, A. (2010) 'Physiologie des Hämostasesystems' in Kiefel, V., ed. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*, Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 46-61.

Greinacher, A., Bux, J. and Salama, A. (2009) 'Autoimmune Thrombozytopenie, Neutropenie und Hämolyse', *Internist*, 50.

Greinacher, A., Kiefel, V., Klüter, H., Kroll, H., Pötzsch, B. and Riess, H. (2011) 'Leitlinie zur Thrombozytentransfusion', [online], available: https://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/thrombozytentransfusion/index_html#25, [16.12.2020]

Grozovsky, R., Begonja, A., Liu, K., Visner, G., Hartwig, J., Falet, H. and Hoffmeister, K. (2015) 'The Ashwell-Morell receptor regulates hepatic thrombopoietin production via JAK2-STAT3 signaling', *Nat Med* 21, 47–54.

Hayashi, T., Amakishi, E., Matsuyama, N., Yasui, K., Furuta, R. A., Hori, Y., Fukumori, Y., Tanaka, S., Curtis, B. R., Inoue, M., Hirayama, F. (2010) 'Detection of antibodies against human platelet antigens 15a and 15b by using a cell line panel', *Br J Haematol*, 151(4), 402-404.

Hehn, S. (2014) 'Blut und Blutbildung', [online], available: https://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/patienten/leukaemien/blut_und_blutbildung/, [15.01.2021].

Heinrich, P., Haan, S., Hermanns, H., Müller-Newen, G. and Schaper, F. (2014) 'Rezeptoren und ihre Signaltransduktion' in Heinrich, P., Müller, M. and Graeve, L., eds., *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 411-441.

Hou, M., Peng, J., Shi, Y., Zhang, C., Qin, P., Zhao, C., Ji, X., Wang, X. and Zhang, M. (2003) 'Mycophenolate mofetil (MMF) for the treatment of steroid-resistant idiopathic thrombocytopenic purpura', *Eur J Haematol*, 70(6), 353-7.

Howard, J. and Perkins, H. (1978) 'The natural history of alloimmunization to platelets', *Transfusion*, 18(4), 496-503.

Huisman, J. G. (1986) 'Immunoblotting: an emerging technique in immunohematology', *Vox sang*, 50(3), 129-136.

Jung, S. and Moroi, M. (2000) 'Signal-transducing mechanisms involved in activation of the platelet collagen receptor integrin $\alpha(2)\beta(1)$ ', *J Biol Chem*, 275(11), 8016-26.

Kaplan, C., Freedman, J., Foxcroft, Z., Husebekk, A., Metcalfe, P., Muniz-Diaz, E., Ouwehand, W., Panzer, S., Rozman, P., Skogen, B. and Immunology, I. S. o. B. T.-W. P. o. P. (2007) 'Monoclonal platelet antigen capture assays (MAIPA) and reagents: a statement', *Vox Sang*, 93(4), 298-9.

Kaplan, C., Morel-Kopp, M., Kroll, H., Kiefel, V., Schlegel, N., Chesnel, N. and Mueller-Eckhardt, C. (1991) 'HPA-5b (Br(a)) neonatal alloimmune thrombocytopenia: clinical and immunological analysis of 39 cases', *Br J Haematol*, 78(3), 425-9.

Kelton, J., Smith, J., Horsewood, P., Humbert, J., Hayward, C. and Warkentin, T. (1990) 'Gova/b alloantigen system on human platelets', *Blood*, 75(11), 2172-6.

Kiefel, V. (1992) 'The MAIPA assay and its applications in immunohaematology', *Transfusion*, 2(3), 181-8.

Kiefel, V. (2010a) 'Nichtinfektiöse unerwünschte Wirkungen' in Kiefel, V., ed. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*, Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 519-520.

Kiefel, V. (2010b) 'Thrombozytäre Alloantigene' in *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*, Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 179.

Kiefel, V. (2020) 'Platelet antibodies in immune thrombocytopenia and related conditions' *J Lab Med*, 44(5), 273-84.

Kiefel, V., König, C., Kroll, H. and Santoso, S. (2001) 'Platelet alloantibodies in transfused patients', *Transfusion*, 41(6), 766-70.

Kiefel, V. and Santoso, S. (2010) 'Alloantigene von Thrombozyten' in Kiefel, V., ed. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*, Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 178-183.

Kiefel, V., Santoso, S., Katzmann, B. and Mueller-Eckhardt, C. (1988) 'A new platelet-specific alloantigen Bra. Report of 4 cases with neonatal alloimmune thrombocytopenia', *Vox Sang*, 54(2), 101-6.

Kiefel, V., Santoso, S., Kaufmann, E. and Mueller-Eckhardt, C. (1991) 'Autoantibodies against platelet glycoprotein Ib/IX: a frequent finding in autoimmune thrombocytopenic purpura', *Br J Haematol*, 79(2), 256-62.

Kiefel, V., Santoso, S., Weisheit, M. and Müller-Eckhardt, C. (1987) 'Monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet- reactive antibodies', *Blood*, 70(6), 1722-6.

Kieffer, N., Guichard, J., Farcet, J.P., Vainchenker, W., Breton-Gorius, J. (1987) Biosynthesis of major platelet proteins in human blood platelets. *Eur J Biochem* 164: 189–195.

Killie, M., Salma, W., Bertelsen, E., Skogen, B. and Husebekk, A. (2010) 'Quantitative MAIPA: Comparison of different MAIPA protocols', *Transfus Apher Sci*, 43(2), 149-54.

Klages, M. and Lindhoff-Last, E. (2015) 'Hämostase' in Marx, G., Muhl, E. and Zacharowski, K., eds., *Die Intensivmedizin*, Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.

Klee, G. G. (2000) 'Human Anti-mouse antibodies', *Arch Pathol Lab Med*, 124(6), 921-23.

Koh, Y., Nishimiya, H., Inoue, H., Kishigami, A., Tsuji, Y., Sakamoto, R., Hirayama, F. and Kuroishi, A. (2020) 'A novel simple assay system for the detection of human platelet antigen 15 (HPA-15) alloantibodies based on three techniques: an HPA-15 expressing cell line, a monoclonal antibody-specific antigen-capture method and mixed-passive haemagglutination', *Vox Sang*, 115, 202–206.

Kroll, H., Kiefel, V., Giers, G., Murphy, M., Kaplan, C., Kekomäki, R., Kanhai, H., Waters, A. and Mueller-Eckhardt, C. (1995) 'Current Concepts of Diagnosis and Treatment of Fetal Alloimmune Thrombocytopenia – an International Survey', *Infusionsther Transfusionsmed*, 22, 77-79.

Kroll, H. and Maier, R. (2010) 'Perinatale und pädiatrische Transfusionsmedizin' in Kiefel, V., ed. *Transfusionsmedizin und Immunhämatologie*, Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 434-437.

Kroll, H., Penke, G. and Santoso, S. (2005) 'Functional heterogeneity of alloantibodies against the human platelet antigen (HPA)-1a', *Thromb Haemost*, 94(6), 1224-9.

Kurz, M., Knöbl, P., Kalhs, P., Greinix, H., Höcker, P. and Panzer, S. (2001) 'Platelet-reactive HLA antibodies associated with low posttransfusion platelet increments: a comparison between the monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens assay and the lymphocytotoxicity test', *Transfusion*, 41(6), 771-4.

Lewin, A., Al Khan, S., Beaudin, L., Meilleur, L., Clarke, G. and Richard, L. (2020) 'Report on the 19th International Society of Blood Transfusion Platelet Immunology Workshop 2018', *Vox Sang*, 115(8), 767-782.

Li, C., Dong, J., Lanza, F., Sanan, D., Sae-Tung, G. and López, J. (1995) 'Expression of platelet glycoprotein (GP) V in heterologous cells and evidence for its association with GP Ib alpha in forming a GP Ib-IX-V complex on the cell surface', *J Biol Chem*, 270(27), 16302-7.

Lin, M., Sutherland, D., Horsfall, W., Totty, N., Yeo, E., Nayar, R., Wu, X. and Schuh, A. (2002) 'Cell surface antigen CD109 is a novel member of the alpha(2) macroglobulin/C3, C4, C5 family of thioester-containing proteins', *Blood*, 99(5), 1683-91.

Liu, X., Li, J., Qin, P., Ren, J., Ma, S., Sun, L., Shi, Y., Ji, X., Zhu, Y., Ma, D., Guo, C., Du, X., Hou, M. and Peng, J. (2011) 'Determination of platelet-bound glycoprotein-specific autoantibodies by flow cytometric immunobead assay in primary immune thrombocytopenia', *Eur J Haematol*, 86(4), 339-46.

López, J., Andrews, R., Afshar-Kharghan, V. and Berndt, M. (1998) 'Bernard-Soulier syndrome', *Blood*, 91(12), 4397-418.

Madlener, K. e. a. (2010) 'Hämostasesystem' in Pötzsch, B. and Madlener, K., eds., *Hämostaseologie, Grundlagen, Diagnostik und Therapie*, Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 8-11.

Matzdorff, A., Meyer, O., Ostermann, H., Kiefel, V., Eberl, W., Kühne, T., Pabinger, I. and Rummel, M. (2018) 'Immunthrombozytopenie – aktuelle Diagnostik und Therapie: Empfehlungen einer gemeinsamen Arbeitsgruppe der DGHO, ÖGHO, SGH, GPOH und DGTI', *Oncol Res Treat*, 41, 8.

Maślanka, K., Michur, H., Guz, K., Wróbel, A., Uhrynowska, M., Misiak, A., Ejduk, A., Brojer, E. and Zupańska, B. (2012) 'The relevance of HPA-15 antigen expression for Anti-HPA-15 antibody detection', *Int J Lab Hematol*, 34(1), 65-9.

McFarland, J., Aster, R., Bussel, J., Gianopoulos, J., Derbes, R. and Newman, P. (1991) 'Prenatal diagnosis of neonatal alloimmune thrombocytopenia using allele-specific oligonucleotide probes', *Blood*, 78(9), 2276-82.

- McMillan, R., Tani, P., Millard, F., Berchtold, P., Renshaw, L. and Woods, V. J. (1987) 'Platelet-associated and plasma Anti-glycoprotein autoantibodies in chronic ITP', *Blood*, 70(4), 1040-5.
- Metcalfe, P., Watkins, N., Ouwehand, W., Kaplan, C., Newman, P., Kekomaki, R., De Haas, M., Aster, R., Shibata, Y., Smith, J., Kiefel, V. and Santoso, S. (2003) 'Nomenclature of human platelet antigens', *Vox Sang*, 85, 240-45.
- Modderman, P., Admiraal, L., Sonnenberg, A. and von dem Borne, A. (1992) 'Glycoproteins V and Ib-IX form a noncovalent complex in the platelet membrane', *J Biol Chem*, 267(1), 364-9.
- Morel-Kopp, M., Blanchard, B., Kiefel, V., Joly, C., Mueller-Eckhardt, C. and Kaplan, C. (1992) 'Anti-HPA-4b (Anti-Yuk(a)) neonatal alloimmune thrombocytopenia: first report in a Caucasian family', *Transfus Med*, 2(4), 273-6.
- Morel-Kopp, M., Daviet, L., McGregor, J. and Kaplan, C. (1996) 'Drawbacks of the MAIPA technique in characterising human antiplatelet antibodies', *Blood Coagul Fibrinolysis*, 7(2), 144-6.
- Mueller-Eckhardt, C., Kiefel, V., Grubert, A., Kroll, H., Weisheit, M., Schmidt, S., Mueller-Eckhardt, G. and Santoso, S. (1989) '348 cases of suspected neonatal alloimmune thrombocytopenia', *Lancet*, 1(8634), 363-6.
- Mueller-Eckhardt, G., Hauck, M., Kayser, W. and Mueller-Eckhardt, C. (1980) 'HLA-C antigens on platelets', *Tissue Antigens*, 16(1), 91-4.
- Murphy, M. and Waters, A. (1985) 'Immunological aspects of platelet transfusions', *Br J Haematol*, 60(3), 409-14.
- Mörtberg, A., Meinke, S., Berg, P., Killie, M., Kjeldsen-Kragh, J., Järås, K., Refsum, E., Höglund, P. and Wikman, A. (2016) 'Sensitive detection of platelet-specific antibodies with a modified MAIPA using biotinylated antibodies and streptavidin-coated beads', *J Immunol Methods*, (434), 9-15.

Newman, P., Derbes, R. and Aster, R. (1989) 'The human platelet alloantigens, PIA1 and PIA2, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing', *J Clin Invest*, 83(5), 1778-81.

Nguyen, X., Dugrillon, A., Beck, C., Kerowgan, M. and Klüter, H. (2004) 'A novel method for simultaneous analysis of specific platelet antibodies: SASPA', *Br J Haematol*, 127, 552-60.

Nguyen, X., Goebel, M., Schober, M., Klüter, H. and Panzer, S. (2010) 'The detection of platelet antibodies by simultaneous analysis of specific platelet antibodies and the monoclonal antibody-specific immobilization of platelet antigens: an interlaboratory comparison', *Transfusion*, 50(7), 1429-34.

Nordhagen, R. and Flaathen, S.T. (1985) 'Chloroquine removal of HLA antigens from platelets for the platelet immunofluorescence test', *Vox Sang*, 48(3), 156-9.

Peterson, J. A., Kanack, A., Nayak, D., Bougie, D. W., McFarland, J. G., Curtis, B. R., Aster, R. H. (2013) 'Prevalence and clinical significance of low-avidity HPA-1a antibodies in women exposed to HPA-1a during pregnancy ', *Transfusion*, 53, 1309-1318.

Porcelijn, L., Huiskes, E., Comijs-van Osselen, I., Chhatta, A., Rathore, V., Meyers, M. and de Haas, M. (2014) 'A new bead-based human platelet antigen antibodies detection assay versus the monoclonal antibody immobilization of platelet antigens assay', *Transfusion*, 54(6), 1486-92.

Reininger, A., Schramm, W. (2011) 'Thrombozyten' in *Hämostaseologie für die Praxis*, Stuttgart, Schattauer: Bruhn, H., Hach-Wunderle, V., Schambeck, C. and Schard, R., 5-10.

Rockenbauer, L., Eichelberger, B. and Panzer, S. (2015) 'Comparison of the bead-based simultaneous analysis of specific platelet antibodies assay (SASPA) and Pak Lx Luminex technology with the monoclonal antibody immobilization of platelet antigens assay (MAIPA) to detect platelet alloantibodies', *Clin Chem Lab Med*, 53(11), 1779-83.

Santoro, S., Walsh, J., Staatz, W. and Baranski, K. (1991) 'Distinct determinants on collagen support alpha 2 beta 1 integrin-mediated platelet adhesion and platelet activation', *Cell Regul*, 2(11), 905-13.

Santoso, S. and Kiefel, V. (2001) 'Human platelet alloantigens', *Wien Klin Wochenschr*, 113(20-21), 806-813.

Santoso, S., Zimmermann, U., Neppert, J. and Mueller-Eckhardt, C. (1986) 'Receptor patching and capping of platelet membranes induced by monoclonal antibodies', *Blood*, 67(2), 343-9.

Schnaidt, M., Northoff, H. and Wernet, D. (1996) 'Frequency and specificity of platelet-specific alloantibodies in HLA-immunized haematologic-oncologic patients', *Transfus Med*, 6(2), 111-4.

Schulze, H. (2010) 'Gegenwärtige Modelle der Thrombozytopoese.', *Pathologe*, 31, 183–187.

Sharp, G. and Studholme, L. (2020) 'International collaborative study to evaluate a proposed 1st WHO reference reagent for Anti-human platelet antigen-15b (Anti-HPA-15b), Code: 18/220', in *WHO Expert Committee on biological standardization*, Geneva.

Shulman, N., Aster, R., Leitner, A. and Hiller, M. (1961) 'Immunoreactions involving platelets. V Post-transfusion purpura due to a complement-fixing antibody against a genetically controlled platelet antigen. A proposed mechanism for thrombocytopenia and its relevance in "autoimmunity"', *J Clin Invest*, 40(9), 1597-620.

Socher, I., Andrei-Selmer, C., Bein, G., Kroll, H., Santoso, S. (2009) 'Low-avidity HPA-1a alloantibodies in severe neonatal alloimmune thrombocytopenia are detectable with surface plasmon resonance technology', *Transfusion*, 49, 943–952.

Sutherland, D., Yeo, E., Ryan, A., Mills, G., Bailey, D. and Baker, M. (1991) 'Identification of a cell-surface antigen associated with activated T lymphoblasts and activated platelets', *Blood*, 77(1), 84-93.

Tsubakio, T., Tani, P., Woods, V. J. and McMillan, R. (1987) 'Autoantibodies against platelet GPIIb/IIIa in chronic ITP react with different epitopes', *Br J Haematol*, 67(3), 345-8.

Urban, E., Liebscher, U.M., Tonn, T. (2013) 'Diagnostik immunologisch bedingter Thrombozytopenien', *Hämotherapie*, 20/2013, 33.

Versiti (October 2020) 'Human Platelet Antigen (HPA) Database' [online] <https://www.versiti.org/medical-professionals/precision-medicine-expertise/platelet-antigen-database> [27.02.2021].

von dem Borne, A. and Décary, F. (1990) 'ICSH/ISBT Working Party on platelet serology. Nomenclature of platelet-specific antigens', *Vox Sang*, 58(2), 176.

von dem Borne, A., Verheugt, F., Oosterhof, F., von Riesz, E., de la Riviere, A. and Engelfriet, C. (1978) 'A simple immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies', *Br J Haematol*, 39, 195-207.

Wagner, C., Mascelli, M., Neblock, D., Weisman, H., Coller, B. and Jordan, R. (1996) 'Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets', *Blood*, 88(3), 907-14.

Weyrich, A. S., Dixon, D. A., Pabla, R., Elstad, M. R., McIntyre, T. M., Prescott, S. M., & Zimmerman, G. A. (1998) 'Signal-dependent translation of a regulatory protein, Bcl-3, in activated human platelets' *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(10), 5556–5561.

Woods, V. J., Kurata, Y., Montgomery, R., Tani, P., Mason, D., Oh, E. and McMillan, R. (1984a) 'Autoantibodies against platelet glycoprotein Ib in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura', *Blood*, 64(1), 156-60.

Woods, V. J., Oh, E., Mason, D. and McMillan, R. (1984b) 'Autoantibodies against the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex in patients with chronic ITP', *Blood*, 63(2), 368-75.

Yamamoto, K., Kosaki, G., Suzuki, K., Tanoue, K. and Yamazaki, H. (1986) 'Cleavage site of calcium-dependent protease in human platelet membrane glycoprotein Ib', *Thromb Res*, 43(1), 41-55.

Zhang, N., Santoso, S., Aster, R. H., Curtis, B. R., Newman, P. J. (2019) 'Bioengineered iPSC-derived megakaryocytes for the detection of platelet-specific patient alloantibodies', *Blood*, 134, e1-e8.

Zieger B., B. M., Germershausen M., Kühne T., Bergmann F. (2018) 'Das thrombozytäre System' in Niemeyer, C. and Eggert, A., eds., *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*, Berlin Heidelberg: Springer Verlag, 113-132.

9 Anhang

Tab. 6: Verwendete Seren für die Teilschritte des MAIPA

Versuch	Ak-Spezifität	verwendete Seren Lfd. Nummer
Variable Testthrombozytenzahl	HPA-1a	1-9
	HPA-5b	10-14
	Auto-Ak IIb/IIIa	15, 16
	Auto-Ak Ib/IX	17-19
Modifizierte Inkubationsbedingungen	HPA-1a	20, 8
	HPA-5b	13
	HLA-I	21
	Auto-Ak IIb/IIIa	15, 22, 23
	Auto-Ak Ib/IX	18, 19, 24
HPA-2b-Lagerung		25, 26
HPA-15b-Lagerung		27
Hou-Modifikation	HPA-1a	1, 28, 29, 6, 30, 9, 31, 4, 8, 20
	HPA-1b	32-36
	HPA-5a	37
	HPA-5b	14, 13, 18, 12, 11
	HLA-I	28, 38, 39, 21, 32
	HPA-15b	27
	Auto-Ak IIb/IIIa	15, 22, 23
	Auto-Ak Ib/IX	18, 19, 24
	Auto-Ak IIb/IIIa und Ib/IX	35, 36

Tab. 7: MAIPA-Assay mit variablen Testthrombozytenzahlen: Negativkontrollen mit Anti-HPA-1a-Ak-haltigen Seren

Zellzahl	HPA-1a-Ak-haltige Seren (Lfd. Nr.)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
5 * 10⁶	0,049	0,010	0,030	0,003	0,006	0,007	0,011	0,005	0,007
10 * 10⁶	0,018	0,012	0,014	0,006	0,006	0,007	0,004	0,006	0,003
20 * 10⁶	0,043	0,014	0,014	0,007	0,008	0,006	0,007	0,005	0,003
40 * 10⁶	0,049	0,036	0,025	0,018	0,008	0,006	0,022	0,005	0,004

Dargestellt sind die im MAIPA-Assay ermittelten Extinktionen von HPA-negativen Testthrombozyten mit HPA-1a-Ak-haltigen Seren (Lfd. Nr. 1-9).

Tab. 8: MAIPA-Assay mit variablen Testthrombozytenzahlen: Negativkontrollen mit Anti-HPA-5b-Ak-haltigen Seren

Zellzahl	HPA-5b-Ak-haltige Seren (Lfd. Nr.)				
	10	11	12	13	14
5 * 10⁶	0,055	0,009	0,007	0,005	0,009
10 * 10⁶	0,136	0,007	0,007	0,032	0,018
20 * 10⁶	0,257	0,006	0,015	0,022	0,005
40 * 10⁶	0,184	0,010	0,018	0,022	0,011
80 * 10⁶	0,300	0,031	0,048	0,018	0,046

Dargestellt sind die im MAIPA-Assay ermittelten Extinktionen von HPA-negativen Testthrombozyten mit HPA-5b-Ak-haltigen Seren (Lfd. Nr. 10-14).

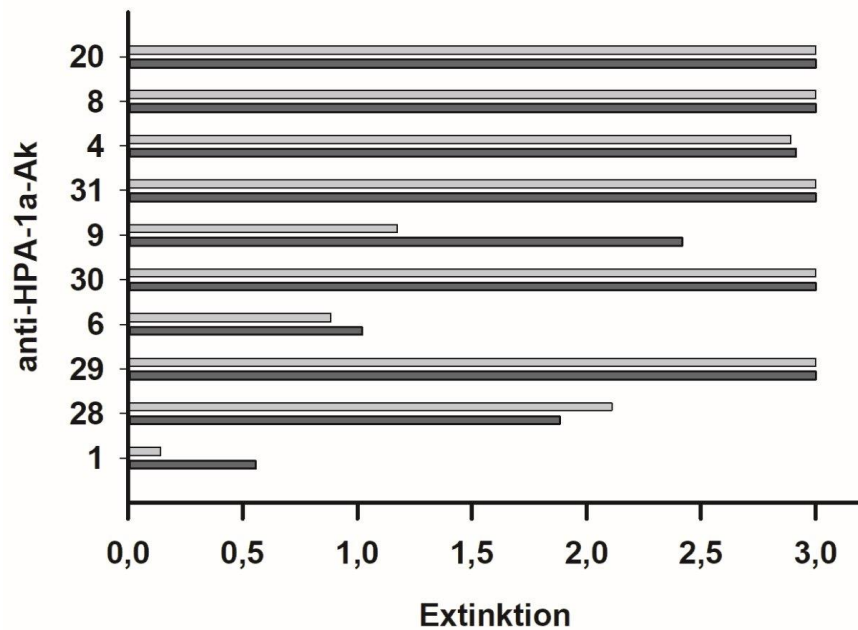


Abb. 24: Standard- und nach Hou modifiziertes Protokoll für den Nachweis von Anti-HPA-1a-Ak mit allen eingesetzten Seren. Dargestellt sind die ermittelten Extinktionen gemäß Standardprotokoll (hellgrau) und Hou modifiziertem Protokoll (dunkelgrau). Analysiert wurden 10 Humanseren mit Anti-HPA-1a-Ak. Die Signale der Negativkontrollen von Thrombozyten mit Serum ohne plättchenreaktive Ak waren stets negativ (Extinktion < 0,2).

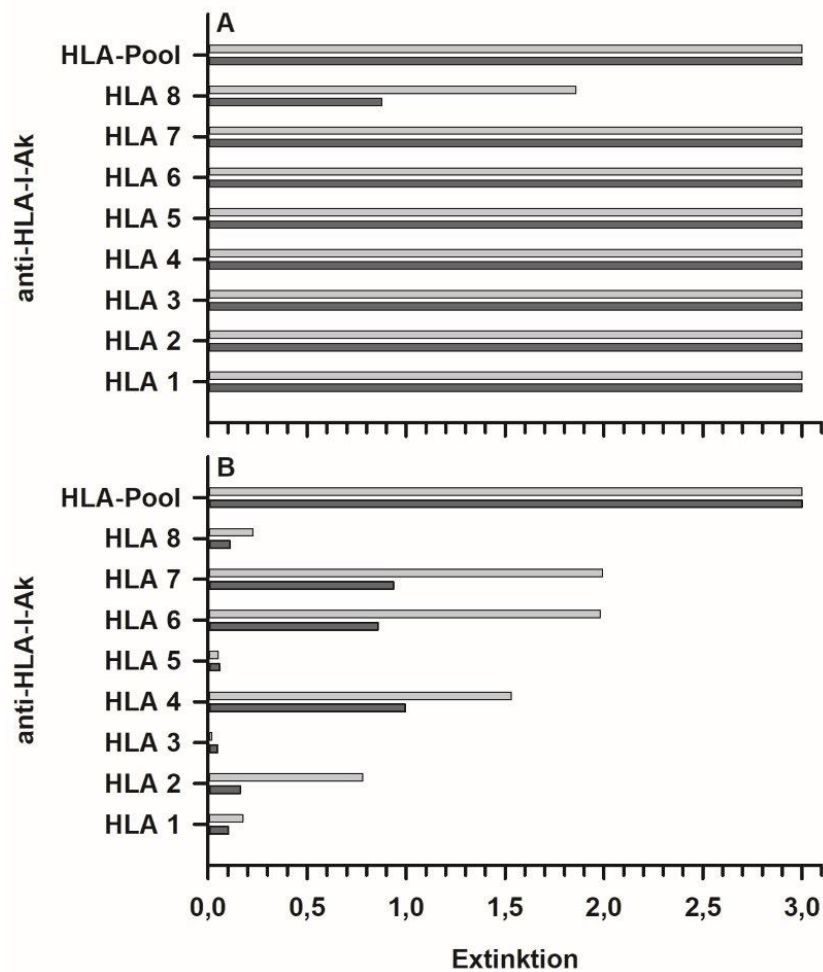


Abb. 25: Standard- und nach Hou modifiziertes Protokoll zum Nachweis von HLA-I-Ak mit dem HLA-Pool und den einzelnen HLA-I-Thrombozyten. Im MAIPA ermittelte Extinktionen gemäß Standardprotokoll (hellgrau) und nach Hou modifiziertem Protokoll (dunkelgrau) des aus 8 Thrombozytenspendern bestehenden HLA-I-Pools gegenüber den Thrombozyten der Einzelspender mit zwei Humanseren (A: Serum Lfd. Nr. 28, B: Serum Lfd. Nr. 38). Die Signale der Negativkontrollen von Thrombozyten mit Serum ohne plättchenreaktive Ak waren stets negativ (Extinktion < 0,2).

10 Danksagung

11 Curriculum Vitae

12 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne die Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Rostock, April 2021

Anne Svea Rank