

Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin

Abteilung Transfusionsmedizin

der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald



**Der Einfluss eines niedrigsulfatierten 12mer-Polysaccharides auf die
Antigen/Antikörper-Interaktion von PF4/Heparin-Antikörper**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der Medizin
(Dr.med.)**

der Medizinischen Fakultät der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

vorgelegt von:

Mandy Berner

geb. am: 24.07.1992

in: Quedlinburg

Greifswald, November 2021

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Max P. Baur

1. Gutachter: Prof. Dr. A. Greinacher

2. Gutachter: Prof. Dr. Tzvetkov

Ort, Raum: Greifswald, Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin

Tag der Disputation: 19.11.2021

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät und keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
II. Abbildungsverzeichnis	3
III. Tabellenverzeichnis	4
1. Einleitung	11
2. Materialien und Methoden	17
2.1 Materialien	17
2.2 Methoden	21
2.2.1 Bicinchoninsäure (BCA-Assay)	21
2.2.2 Zirkulardichroismus (CD)	23
2.2.3 Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)	27
2.2.4 Heparin-induzierter Plättchenaktivierungstest (HIPA)	30
3. Ergebnisse	32
3.1 Zirkulardichroismus (CD)	32
3.1.1 Zirkulardichroismus der Standardheparine	32
3.1.2 Zirkulardichroismus der 12mer-Polysaccharide	35
3.1.3 Zirkulardichroismus der Standardheparine und	37
12mer-Polysaccharide – Inhibierungsexperimente	37
3.2 Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)	39
3.3 Heparin-induzierter Plättchenaktivierungstest (HIPA)	44
4. Diskussion	47
5. Zusammenfassung und Ausblick	51
6. Anhang	54
6.1 Literaturverzeichnis	54
6.2 Lebenslauf	57
6.3 Danksagung	58

I. Abkürzungsverzeichnis

HIT	Heparin-induzierte Thrombozytopenie
PF4	Plättchenfaktor 4
UFH	Unfraktioniertes Heparin
LMWH	Niedermolekulares fraktioniertes Heparin (Low-Molecular-Weight Heparin)
MW	Molekulargewicht (Molecular weight)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline)
CD	Zirkulardichroismus (Circular Dichroism)
EIA	Enzymatisches Immunadsorptionsverfahren
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
AK	Antikörper
Ag	Antigen
HIPA	Heparin-induzierter Plättchenaktivierungstest (Heparin-induced platelet activation test)
BCA	Bicinchoninsäure-Assay (Bicinchoninic Acid Assay)
LCPL	Links zirkular polarisiertes Licht
RCPL	Rechts zirkular polarisiertes Licht
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine serum albumin)
Faktor AT III	Antithrombin III
Faktor IIa	Thrombin
Faktor VIIa	Faktor Convertin
Faktor Xa	Stuart-Prower-Faktor
Faktor Xia	Rosenthal-Faktor
Faktor XIIa	Hagemann-Faktor
RT	Raumtemperatur
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Ak-bedingte HIT II,	14
Abbildung 2: PF4, ein CXC-Chemokin.....	16
Abbildung 3: Die Strukturformeln der einzelnen Heparine.....	18
Abbildung 4: Das Prinzip der CD-Technik.....	24
Abbildung 5 : Die Sekundärstrukturen von Proteinen,.....	25
Abbildung 6: Das Prinzip der ELISA-Technik.....	28
Abbildung 7.1: Die CD-Spektren der Standardheparine.	33
Abbildung 7.2: Die CD-Spektren der 12mer-Polysaccharide.....	36
Abbildung 7.3: Die CD-Spektren der Inhibierungsexperimente.....	38
Abbildung 8: Die ELISA-Auswertung.	43

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die Messparameter der CD-Standardexperimente	26
Tabelle 2: Die Messparameter der CD-Inhibierungsexperimente	27
Tabelle 3: Die ELISA-Daten.....	41
Tabelle 4: Die HIPA-Daten.....	45

1. Einleitung

Die Arbeit untersucht den Einfluss verschiedener **Heparine** aufsteigender Kettenlänge auf die Struktur von Plättchenfaktor 4 (**PF4**) und beschreibt inwieweit ein Polysaccharid mit einem bestimmten Sulfatierungsgrad in Kombination mit einem Standardheparin die Antigen/Antikörper-Interaktion von PF4/Heparin-Antikörper verändern kann.

Heparine sind Glykosaminoglykane mit einem Molekulargewicht zwischen 3,000 und 30,000 Da. Sie sind stark negativ geladen aufgrund von Sulfat- und Carboxylresten. Diese sind wichtig für den antikoagulatorischen Effekt der Heparine [1, 2]. Das menschliche Heparin wird in Mastzellen und basophilen Granulozyten produziert und in deren sekretorischen Granula gespeichert. Heparin interagiert mit einer Vielzahl an Proteinen, wodurch es zu Wechselwirkungen kommt, die das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung anregen [2].

Eine medizinische Indikation stellt die Hemmung der Blutgerinnung dar. Klinisch kann hierfür das höhermolekulare Unfraktionierte Heparin (**UFH**), welches aus der intestinalen Schweinedarmmukosa gewonnen wird und ein mittleres Molekulargewicht von 5,000 bis 30,000 Da besitzt, verwendet werden. Aber auch die niedermolekularen (fraktionierten) Heparine (low molecular weight heparin, **LMWHs**), die durch chemische oder enzymatische Fragmentierung des konventionellen Heparins erzeugt werden und ein mittleres Molekulargewicht von 3,000 bis 6,000 Da besitzen, kommen hierbei zur Anwendung. Beispiele hierfür wären Reviparin (Clivarin) mit einem Molekulargewicht von 3,900 Da und Enoxaparin (Clexane) mit einem Molekulargewicht von 4,500 Da. Des Weiteren variieren die verschiedenen Heparine in ihrer Kettenlänge und dem Sulfatierungsgrad [2, 3].

Der antikoagulatorische Effekt beruht darauf, dass die inhibitorische Wirkung von Antithrombin, einem Glykoprotein, potenziert wird. Der so entstandene

Heparin/Antithrombin-Komplex verbessert die Reaktion mit Serinproteasen wie Faktor IIa, VIIa, Xa, XIa und XIIa und führt zur Hemmung dieser Proteasen der Hämostase [1, 2]. Beide Heparinarten werden zur Prophylaxe und Therapie von Gerinnungsstörungen, insbesondere bei Thrombosen und Embolien, eingesetzt. LMWHs sind aufgrund ihrer höheren Bioverfügbarkeit, der längeren Halbwertszeit innerhalb des menschlichen Organismus, dem fehlenden Routinemonitoring und dem geringeren Risiko von Nebenwirkungen dem UFH vorzuziehen. LMWH hat einen geringen Effekt auf Thrombin und Fondaparinux inhibiert nur den Faktor Xa durch die Wirkung von AT [2].

Das positiv geladene Protein Protaminsulfat führt zur Neutralisierung der gerinnungshemmenden Wirkung von höhermolekularen Heparinen und findet daher in der Medizin bei einer Überdosierung von UFH als Antidot Verwendung. Bei LMWHs wird der gerinnungshemmende Effekt nur zu etwa 50 % antagonisiert. Hierfür können beim Auftreten lebensgefährlicher Blutungen ein rekombinanter FVIIa und Plasmakonzentrate gegeben werden, welche fast zu einer Aufhebung des Effekts der niedermolekularen Heparine führen [2, 12].

An der UNC Eshelmann School of Pharmacy in North Carolina unter Leitung von Professor Jian Liu werden Heparine synthetisch hergestellt. Diese Gruppe hat verschiedene Polysaccharide mit den Namen 12mer-1 bis 12mer-6 hergestellt, die sich anhand einer unterschiedlichen Anzahl an Sulfatgruppen unterscheiden.

In der Regel ist die Gabe des Antikoagulans Heparin gut verträglich, jedoch kann es in einigen Fällen zu einer erhöhten Blutungsneigung, allergischen Reaktionen, Haarausfall, Osteoporose und einer Heparin-induzierten Thrombozytopenie kommen [2, 3, 4].

Bei der Heparin-induzierten Thrombozytopenie (HIT) werden zwei Formen unterschieden, die nichtimmunologische Frühform (HIT I) und die immunologisch bedingte, einige Tage später auftretende HIT II. Die Inzidenz beider Varianten ist abhängig von der Dauer der Gabe, der Molekülgröße des Heparins und der verordneten Dosis [1, 2, 3, 5, 6, 7, 11]. Trotz der ähnlichen Aktivierung von Thrombozyten durch HIT-Ak, verursacht durch die Heparingabe, ist die Häufigkeit bei UFH größer als bei LMWHs. Dies ist durch die Formung von größeren PF4/Heparin-Komplexen und deren stärkerer Immunogenität, welche insbesondere für die Pathogenese der HIT II relevant ist, zu erklären [6, 9, 11].

Die Frühform tritt in den ersten fünf Tagen der Behandlung mit Heparin bei bis zu 30 % der Patienten auf. Der Thrombozytenabfall beträgt in diesem Fall maximal 30 % des Ausgangswertes. Die Ursache hierbei ist die proaggregatorische Wirkung des Heparins durch die Hemmung der Adenylatcyclase. Eine Spontanremission bei weiterer Heparingabe ist möglich [1, 7].

Die zweite Form, die durch Antikörper(AK)-Bildung gegen den PF4/Heparin-Komplex ausgelöst wird, manifestiert sich meist fünf bis zehn Tage nach Beginn der Heparintherapie. Deren Häufigkeit ist nicht nur von den oben genannten Faktoren abhängig, sondern auch von der klinischen Intervention und variiert zwischen verschiedenen Patientengruppen. Aufgrund der vermehrten Freisetzung von PF4 und darauffolgender Bildung von anti-PF4/Heparin-Ak kann bei großen chirurgischen Eingriffen, insbesondere bei kardialen und orthopädischen, die Frequenz der HIT II bei ca. 0,2 % bis 10 % liegen, wobei der Abfall der Thrombozytenzahl typischerweise mehr als 50% vom höchsten Thrombozytenwert nach Beginn der Heparingabe beträgt [1, 6, 7]. Frauen sind häufiger betroffen als Männer [2, 6, 7]. Die Pathogenese der HIT II lässt sich wie folgt erklären: Es kommt zur Komplexbildung zwischen dem positiv geladenen PF4 und dem negativ geladenen Heparin, wobei kurzkettige Heparine ein PF4-Tetramer und langkettige Heparine zwei oder mehr PF4-Tetramere binden können. Die Bindungsstärke und Komplexgröße erhöht sich demnach mit steigender Kettenlänge des

Heparins [6, 9]. Die Komplexbildung führt zur Konformationsänderung des PF4 mit der Expression von Neoepitopen. An diese Neoepitope, die eine Kette aus repetitiven Antigenen (Ags) bilden, können AKs vom Typ IgG₄ binden. Die so entstandenen Immunkomplexe binden mit ihrem Fc-Teil an die niederaffinen FcγIIa-Rezeptoren der Thrombozyten, wodurch es zur Quervernetzung der Rezeptoren kommt und die Thrombozyten intravasal aktiviert werden. Nachfolgend führt dies zur Freisetzung von prokoagulatorischen Substanzen, wie Thrombin und weiterem PF4, aus den Blutplättchen und damit zur zunehmenden Verstärkung von Komplex- und Antikörperbildung, welche letztendlich in der Aktivierung der Gerinnungskaskade endet (Abbildung 1) [2, 3, 5, 6].

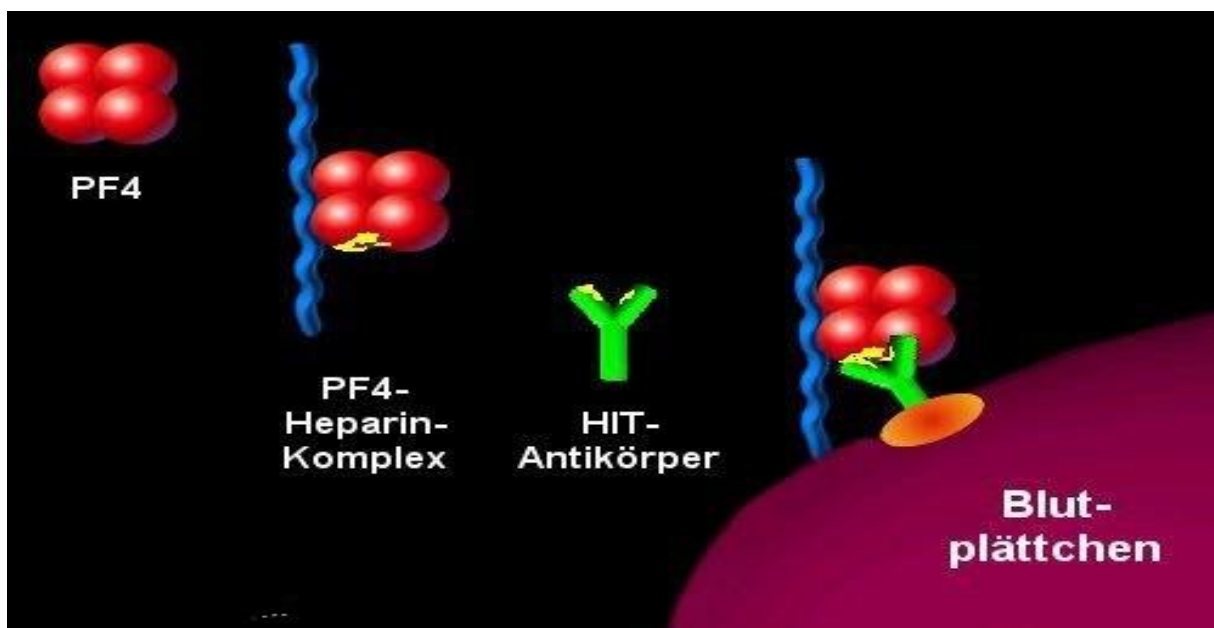


Abbildung 1: Die Ak-bedingte HIT II. Ein Komplex aus PF4 und Heparin führt zur AK-Bildung, welche die Thrombozyten und damit die Blutgerinnung aktiviert [8].

Diese Thrombusbildung kann letztendlich in 25 % der Fälle zur Thrombozytopenie mit lebensbedrohlichen Thrombosen und Embolien führen. Hierbei ist das venöse System fünfmal häufiger betroffen, als das arterielle System [2, 3, 5]. Es empfiehlt sich, die derzeitige Heparinmedikation sofort abzusetzen und heparinfreie Präparate, wie direkte

Thrombininhibitoren anzuwenden. Hierfür eignen sich besonders Argatroban und Dabigatran. Aber auch Danaparoid, welches den Gerinnungsfaktor Xa inhibiert, kann ebenfalls zur therapeutischen Behandlung eingesetzt werden [7]. Die Todesfallrate liegt trotzdem bei ca. 30 % [1, 2].

Durch die Aktivierung der Thrombozyten kommt es auch zu einer vermehrten PF4-Sekretion, wodurch die Antigenbildung aus PF4 und Heparin weiter ansteigt.

Plättchenfaktor 4 (PF4), ein Protein aus der Familie der CXC-Chemokine, besteht aus 70 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 7,800 Da. Der isoelektrische Punkt, der für jedes Protein genau definiert ist, beträgt hierbei 7,6. Bei diesem pH-Wert ist die Anzahl an positiven und negativen Ladungen genau gleich. Es wird in den α -Granula der im Blut zirkulierenden Thrombozyten gespeichert [2, 4, 5, 8]. Dieses Chemokin liegt in Form von Tetrameren mit insgesamt 32,000 Da, bestehend aus 4 Monomeren, vor und besitzt eine stark positive Ladung aufgrund positiv geladener Aminosäureseitenketten. Dies trägt zur hohen Affinität zu negativ geladenen Heparinen bei [2, 3, 6]. Die PF4-Konzentration im menschlichen Plasma ist normalerweise sehr gering, allerdings steigt diese mit zunehmender Plättchenkonzentration und Plättchenaktivierung auf über 200 nM an. Dies entspricht einer Konzentration von 6-7 $\mu\text{g/ml}$ [2, 6, 7].

PF4, dessen Struktur in Abbildung 2 dargestellt ist, neutralisiert die negativ geladene Struktur von Heparinmolekülen und reduziert deren antikoagulatorische Wirkung [2, 3, 5, 6].

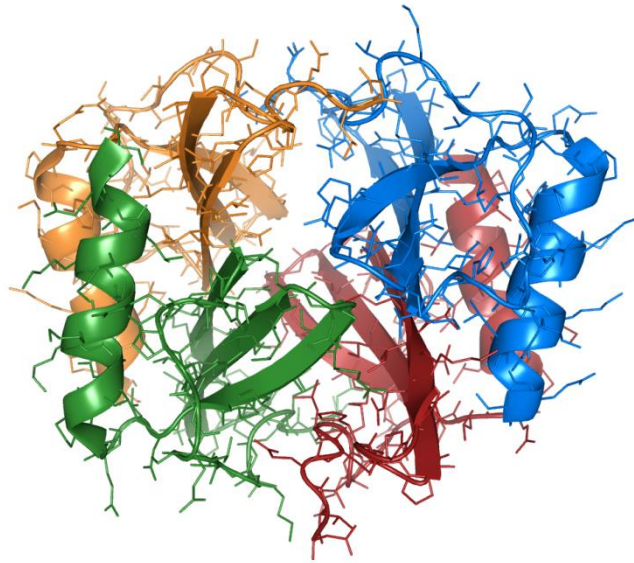


Abbildung 2: PF4, ein CXC-Chemokin. Das positiv geladene Homotetramer, welches aus den Thrombozyten freigesetzt wird, besteht aus 4x70 Aminosäuren und besitzt einen isoelektrischen Punkt von 7,6 (aus Sven Brandt. *Formation and CD-Spectroscopic Characterization of antigenic Protein/Polyanion Complexes*, 2014 [12]).

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Aufgabenstellungen beantwortet:

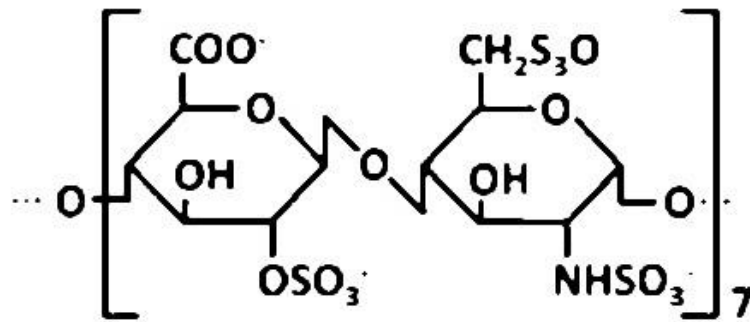
1. Die Analyse der Konformationsänderung von PF4 in Interaktion mit den Standardheparinen UFH, Reviparin und Enoxaparin.
2. Die Analyse der Konformationsänderung von PF4 in Interaktion mit den Polysacchariden 12mer-1 bis 12mer-6.
3. Die Analyse der Konformationsänderung von PF4 in Interaktion mit den Standardheparinen UFH, Reviparin und Enoxaparin und den Polysacchariden 12mer-1 bis 12mer-6.
4. Die Messung der Antikörperbindung an den verschiedenen PF4/Heparin-Komplexen.
5. Der Nachweis der Thrombozytenaggregation durch die Bindung von Antikörpern an die verschiedenen PF4/Heparin-Komplexe.

Hierfür kamen verschiedenste Testverfahren zur Anwendung. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration von PF4 wurde ein mehrstufiges Verfahren, der Bicinchoninsäure-Assay (BCA), verwendet. Mittels Zirkulardichroismus (CD) wurde die Sekundärstruktur und Konformationsänderung von PF4 in Wechselwirkung mit verschiedenen Heparinen untersucht. Für den Nachweis der antikörperbindenden Antigenität von PF4/Heparin-Komplexen wurden der antigenpräsentierende Enzym-gekoppelte Immunadsorptionstest (ELISA) und der funktionelle Heparin-induzierte Plättchenaktivierungstest (HIPA) angewandt.

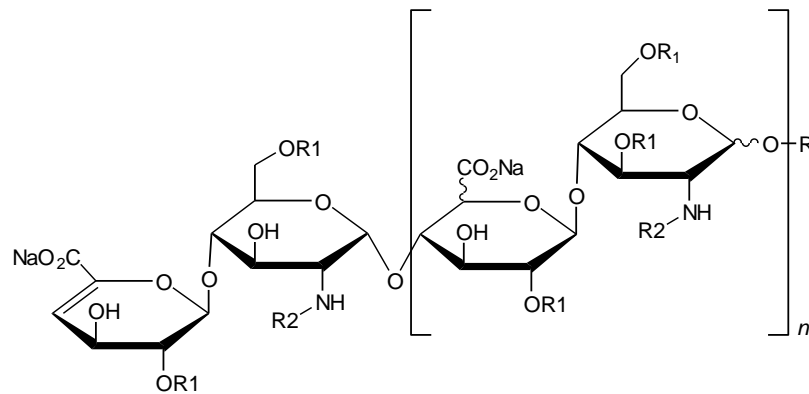
2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

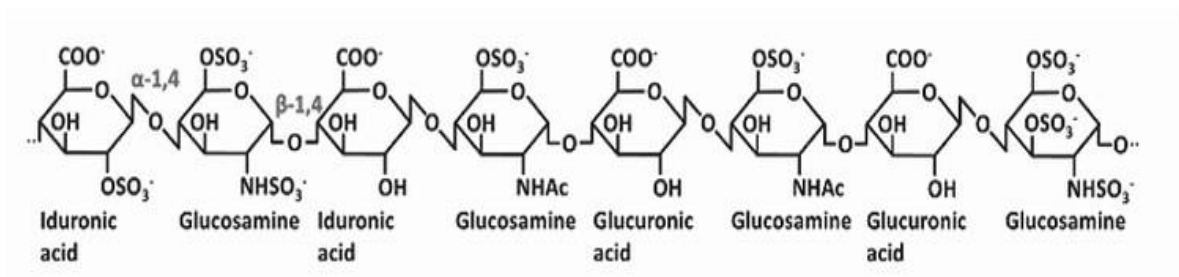
Plättchenfaktor 4 (PF4) (Chromatec, Greifswald, Deutschland) wurde in Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) gelöst. Verschiedene Heparine wurden in dieser Arbeit benutzt: Die klinisch relevanten Heparine: **Unfraktioniertes Heparin (UFH)** (Heparin – Natrium – 25000 von Ratiopharm, Ulm, Deutschland), **Reviparin-Natrium** (Clivarin von Abbott GmbH & Co. KG, Hannover, Deutschland) und **Enoxaparin-Natrium** (Clexane multidose 100 mg/ml von Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt, Deutschland). Die synthetisch hergestellten Polysaccharide **12mer-1, 12mer-2, 12mer-3, 12mer-4, 12mer-5** und **12mer-6** wurden von Professor Jian Liu von der University of North Carolina at Chapel Hill (UNC) Eshelmann School of Pharmacy (Chapel Hill, North Carolina, US) zur Verfügung gestellt. Die chemischen Strukturen der einzelnen Heparine sind in der Abbildung 3 zu finden. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bicinchoninsäure-Kit (Sigma – Aldrich, Taufkirchen, Deutschland).



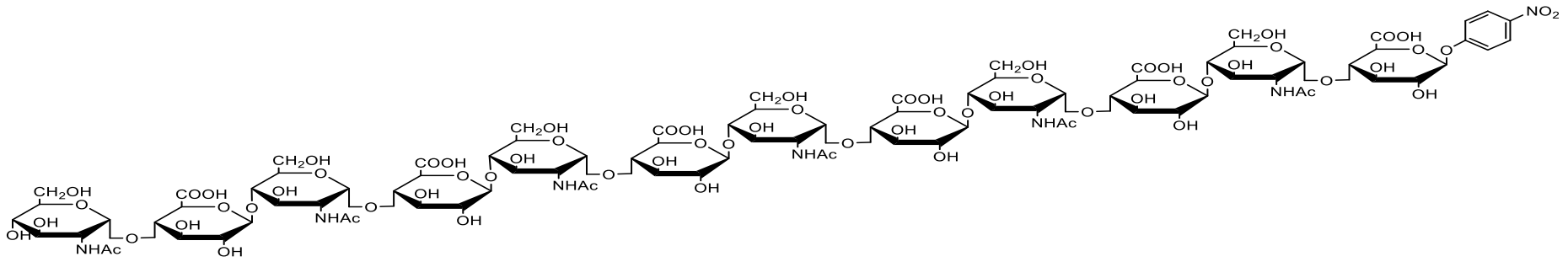
• a) *Reviparin*, MW=3,900 Da



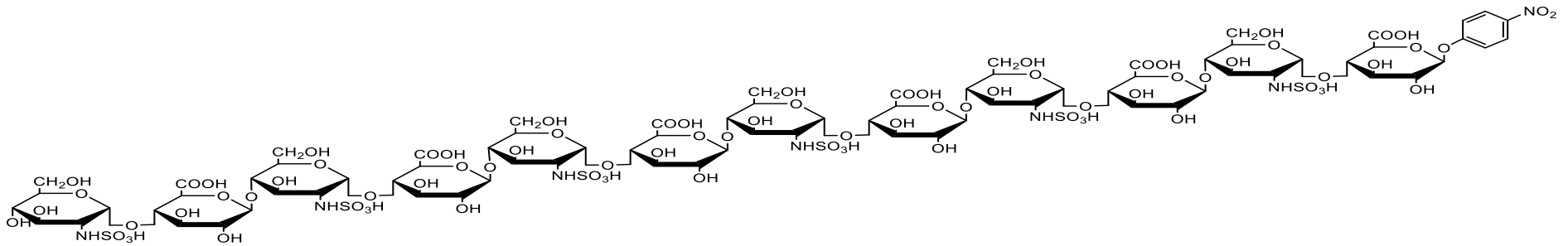
• b) *Enoxaparin*, MW=4,500 Da



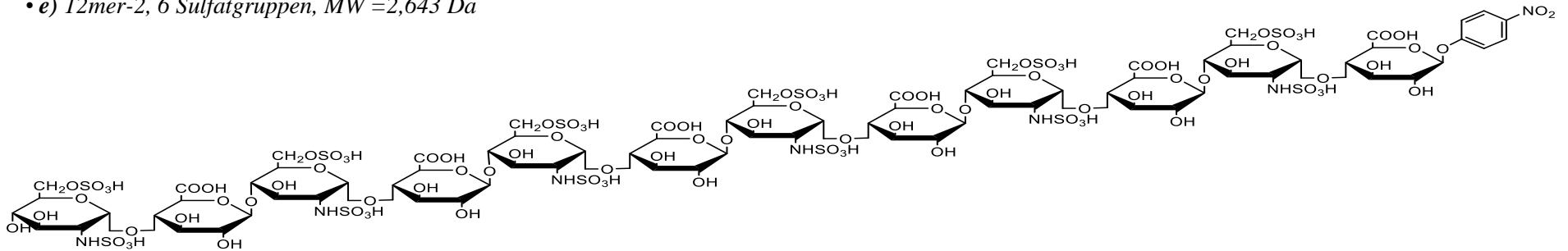
• c) *Unfraktioniertes Heparin (UFH)*, MW=15,000 Da



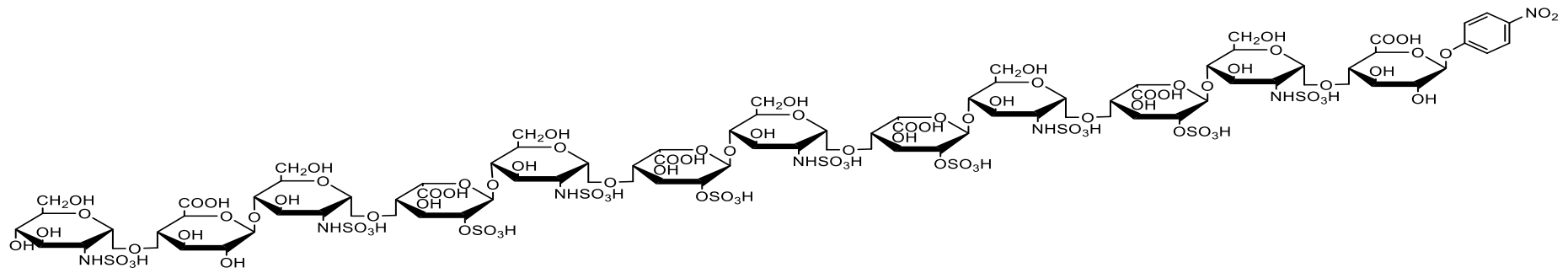
• d) 12mer-1, 0 Sulfatgruppen, MW = 2,415 Da



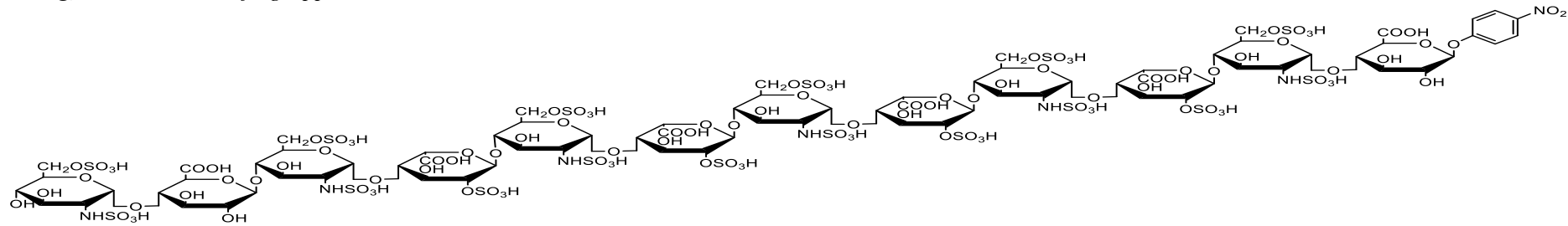
• e) 12mer-2, 6 Sulfatgruppen, MW = 2,643 Da



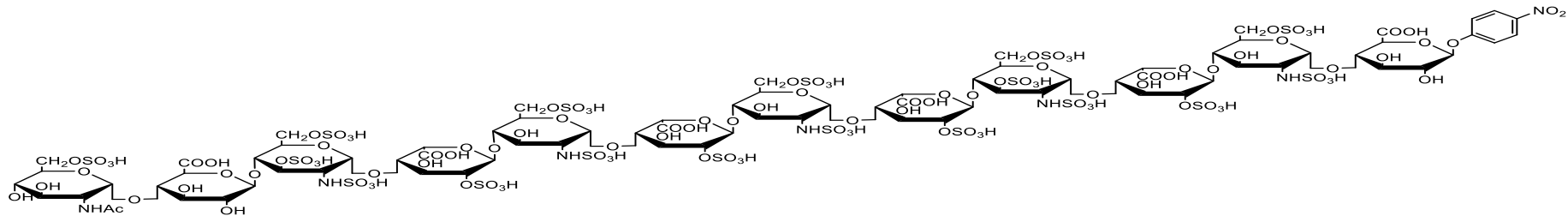
• f) 12mer-3, 12 Sulfatgruppen, MW = 3,123 Da



- **g)** 12mer-4, 10 Sulfatgruppen, MW = 2,963 Da



- **h)** 12mer-5, 16 Sulfatgruppen, MW = 3,444 Da



- **i)** 12-mer-6, 17 Sulfatgruppen, MW = 3,566 Da

Abbildung 3: Die Strukturformeln der Standardheparine Reviparin, Enoxaparin, UFH und der synthetischen Polysaccharide 12mer-1 bis 12mer-6 (Abbildung a bis c aus Sven Brandt. Formation and CD-Spectroscopic Characterization of antigenic Protein/Polyanion Complexes, 2014 [12] und Abbildung d bis j von Professor Jian Liu von der University of North Carolina at Chapel Hill (UNC) Eshelmann School of Pharmacy zur Verfügung gestellt).

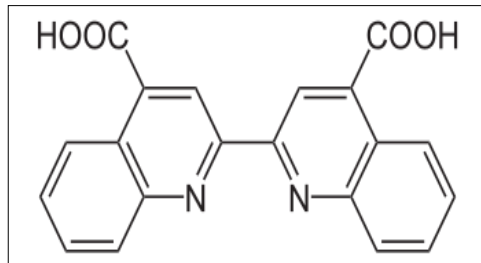
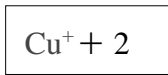
2.2 Methoden

2.2.1 Bicinchoninsäure (BCA-Assay)

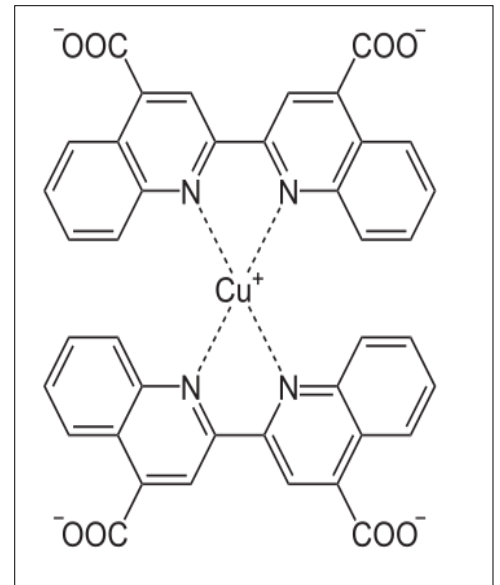
Das Bicinchoninsäure-Assay (BCA) wird zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen verwendet. Das Verfahren besteht aus einem mehrstufigen Prozess und basiert auf der Tatsache, dass Cystein, Cystin, Tyrosin, Tryptophan und Peptidbindungen unter geeigneten Bedingungen Cu^{2+} zu Cu^+ reduzieren [2, 13].

Bicinchoninsäure (2- (4-Carboxychinolin-2-yl) chinolin-4-carboxolsäure) wird chemisch als heterocyclische Verbindung bezeichnet, die aus zwei verknüpften Chinolinmolekülen mit Carboxylgruppen besteht. Dann bilden die Kupfer (Cu^+)-Ionen mit Bicinchonin einen purpurfarbenen Komplex in alkalischer Umgebung. Die Farbkomplexe sind sehr stabil und haben ein Absorptionsmaximum bei $\lambda = 562 \text{ nm}$ [2, 13].

Die Schritte der BCA-Reaktionen sind wie folgt dargestellt [2]:



Bicinchoninsäure



Bicinchoninsäure-Kupfer-Komplex

Schritte der BCA-Reaktion:

1. Protein (Cystein, Cystin, Tyrosin, Tryptophan) oder Peptidbindungen + $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$ (Biuret Komplex)
2. $\text{Cu}^+ + 2$ Moleküle Bicinchonin \rightarrow BCA-Cu + - Komplex (Absorptionsmaximum von 562 nm)

Zur Messung der Proteinkonzentration wurde ein Bicinchoninsäure - Kit zur Proteinbestimmung von Sigma - Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) verwendet. Das Reagenz besteht aus einer Lösung aus Bicinchoninsäure (1000 μl , Reagenz A) und einer Lösung aus Kupfer(II)-sulfat-Pentahydrat (20 μl , Reagenz B) in $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ Puffer enthaltendem Natriumtartrat bei einem pH-Wert von 11,25. Als Standard wurde Rinderserumalbumin (Bovine serum albumin (BSA)) verwendet. Die Reaktion wurde bei 60 °C für 30 Minuten durchgeführt. Zuletzt wurde die Absorption bei $\lambda = 562$ nm mit dem NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) gemessen und anhand der linearen Standardkurve die Proteinkonzentration errechnet.

2.2.2 Zirkulardichroismus (CD)

Zur Analyse der Sekundärstruktur und Konformationsänderung von Proteinen in Lösung, kann die Zirkulardichroismus-Technik (CD) verwendet werden. Durch deren Benutzung kann beobachtet werden, wie sich Sekundärstrukturen im Zusammenspiel mit verschiedenen Umgebungsbedingungen oder Interaktionen mit anderen Molekülen verändern. Hieraus können strukturelle Informationen über das zu untersuchende Protein abgeleitet werden [2].

Proteine besitzen chirale Strukturen und sind daher optisch aktive Substanzen, die links zirkular polarisiertes und rechts zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark absorbieren. Im Gegensatz zu linear polarisiertem Licht, bei dem der elektrische Vektor innerhalb einer Ebene seine Schwingungsrichtung im Raum beibehält, bewegen sich die Vektoren bei zirkular polarisiertem Licht entgegengesetzt zum Uhrzeigersinn und breiten sich mit konstanter Winkelgeschwindigkeit auf einer Ellipse bzw. einem Kreis aus (Abbildung 4) [2, 12, 14].

Proteine in Lösung

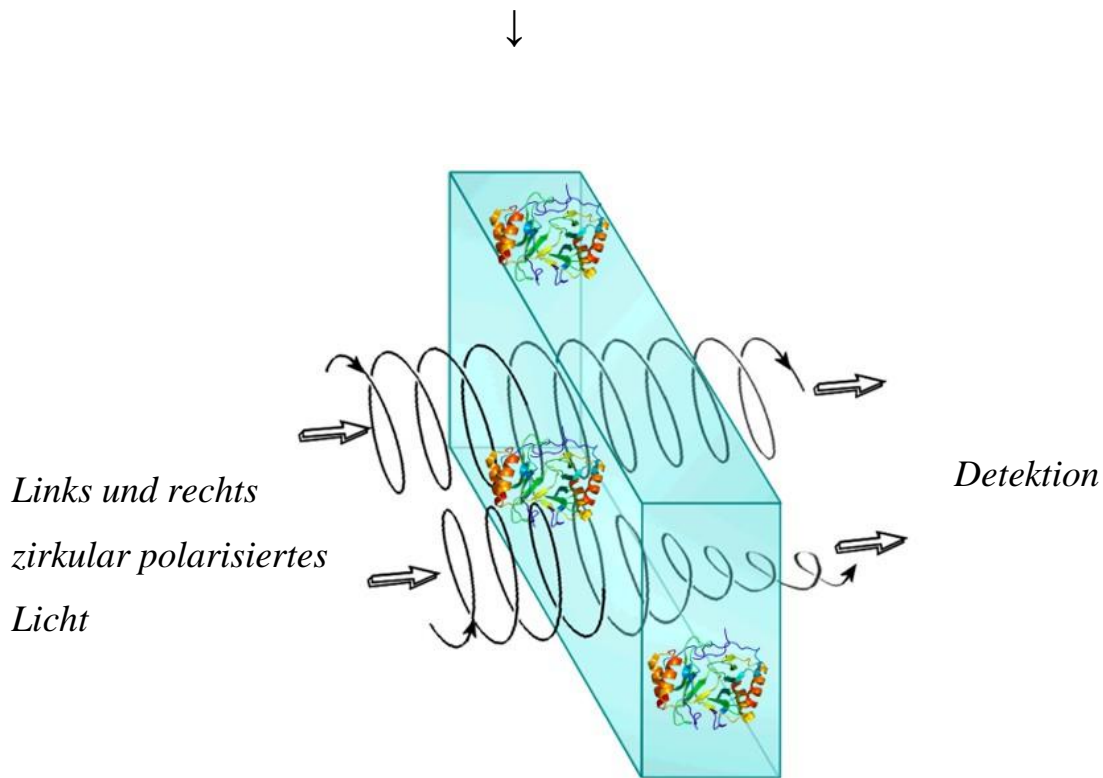


Abbildung 4: Das Prinzip der CD-Technik. Chirale Moleküle absorbieren links und rechts zirkular polarisiertes Licht unterschiedlich stark. Die Lichtstrahlen haben anfänglich die gleiche Amplitude. Nach dem Durchgang durch die Probenlösung besitzen sie jedoch eine unterschiedliche Amplitude und es entsteht ein kombinierter auftretender Lichtstrahl, der elliptisch polarisiert ist (erarbeitet von Sven Brandt [15]).

Die Differenz der Absorption des rechts und links zirkular polarisierten Lichts, die von der Wellenlänge abhängig ist, wird als Zirkulardichroismus bezeichnet:

$$\Delta A(\lambda) = A(\lambda)_{LCPL} - A(\lambda)_{RCPL} \quad A = \text{Absorption}$$
$$\lambda = \text{Wellenlänge}$$

Im Wechsel sendet das Gerät rechts und links zirkular polarisiertes Licht gleicher Intensität (I_R, I_L) durch die Probenlösung und zeichnet die Absorptionsdifferenz ΔA als Spektrum auf [2, 12, 14].

$$\Delta A(\lambda) = \lg \left(\frac{I_R(\lambda)}{I_L(\lambda)} \right)$$

Jeder Absorptionswert wurde nachträglich zu Millidegrees der Elliptizität Θ umgerechnet.

$$\Theta = 3298.2 \cdot \Delta A(\lambda) \text{ [mdeg]}$$

Jede Sekundärstruktur eines Proteins hat ein eigenes charakteristisches CD-Spektrum. Mittels CD-Spektroskopie ist es möglich das Verhältnis von α -Helix, antiparallelem und parallelem β -Faltblatt, β -Schleife und Random Coil zu detektieren (Abbildung 5) [2, 12, 14].

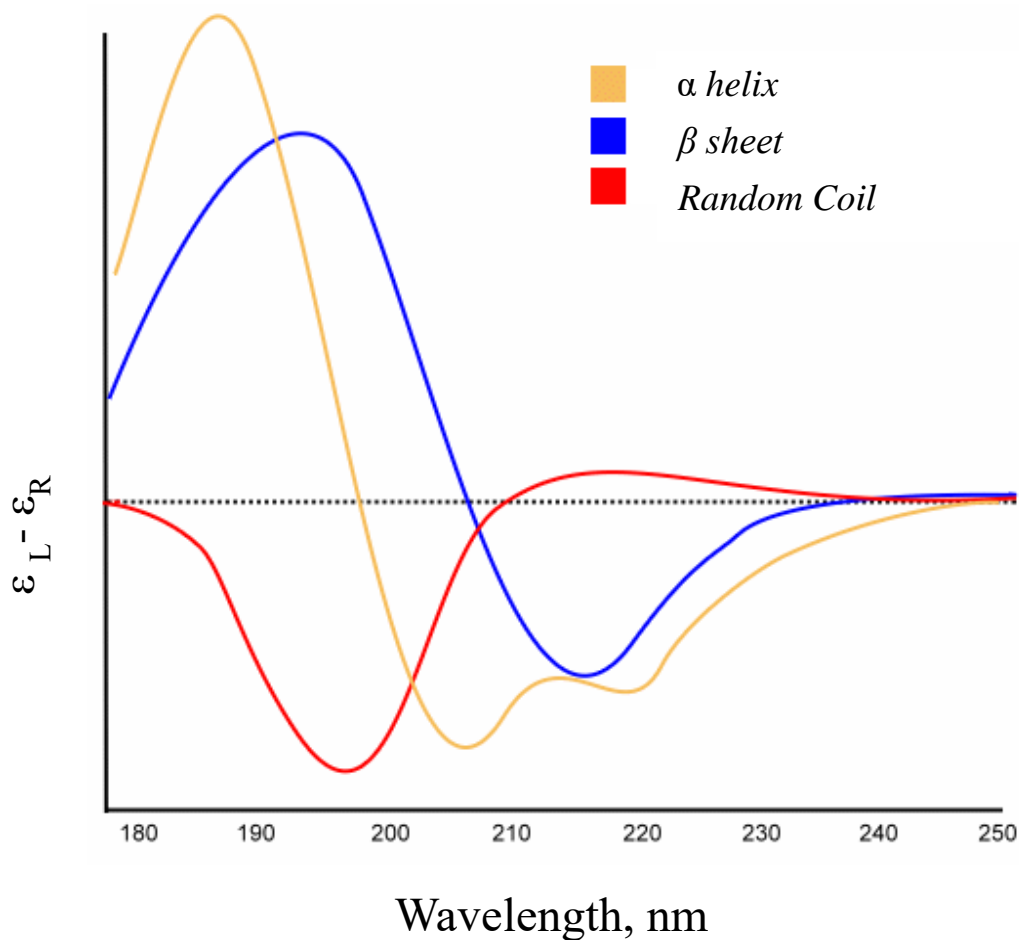


Abbildung 5 : Die Sekundärstrukturen von Proteinen. Zu den häufigsten Sekundärstrukturelementen, die durch die übergeordnete Primärstruktur und den sich zwischen den einzelnen Molekülen ausgebildeten Wasserstoffbrückenbindungen bestimmt wird, gehören α -Helix, antiparallelem und parallelem β -Faltblatt, β -Schleife und Random Coil [16].

In dieser Arbeit wurden Änderungen in der Sekundärstruktur von PF4 nach der Komplexbildung mit verschiedenen Heparinen bestimmt und durch Aufzeichnen von Fern-UV-CD-Spektren (270-190 nm) unter Verwendung eines Chirascan-CD-Spektrometers (Applied Photophysics, Letherhead, UK) untersucht. Die Spektren wurden für verschiedene Verhältnisse von PF4/Heparinen aufgezeichnet. Die initiale Konzentration von PF4 betrug 80 µg/ml und die Komplexbildung fand bei 25°C in einer speziellen CD-Küvette aus Quarz SUPRASIL mit 5 mm Schichtdicke (Typ-Nr. 110-QS, Hellma Analytics, Müllheim, Germany) statt. Alle Messungen, welche dreimal wiederholt wurden, erfolgten unter permanentem Stickstoffstrom und begannen mit einer Lösung aus PBS (pH 7,4) und PF4. Weitere ansteigende Mengen der verschiedenen Heparine (UFH, Enoxaparin, Revparin) und der Polysaccharide 12mer 1-6 wurden in die Küvette titriert und jedes CD-Spektrum aufgenommen. Vor jeder Messung gab es eine Equilibrierungszeit von fünf Minuten. Die Messparameter sind in Tabelle 1 zu finden.

Tabelle 1: Die Messparameter der CD-Standardexperimente

Parameter	Absorption, Millidegrees, Autosshutter
Initiale PF4-Konzentration (µg/ml)	80
Heparinkonzentration(µg/ml)	0-150
Temperatur (°C)	25
Equilibrierungszeit (min)	5
Wellenlänge (nm)	270-190
Bandbreite (nm)	1,5
Wiederholungen	10
Time-per-points (s)	1000
Current-Time-per-points (s)	1000

Des Weiteren wurden Inhibierungsexperimente mit PF4, 12mer-6, den Standardheparinen und 12mer-3 durchgeführt. Die Equilibrierungszeit von PF4 und UFH, Reviparin, Enoxaparin, sowie 12mer-6 betrug 60 Minuten. Es wurde die Konzentration des Standardheparins verwendet, bei welcher PF4 in den Standardexperimenten die größte Konfirmationsänderung

zeigte und anschließend wurde 12mer-3 (0 bis 32 µg/ml) hinzutitriert. Auch diese Messparameter sind in Tabelle 2 zu finden.

Tabelle 2: Die Messparameter der CD-Inhibierungsexperimente

Parameter	Absorption, Millidegrees, Autoshutter
Initiale PF4-Konzentration (µg/ml)	80
Heparinkonzentration (µg/ml)	
UFH	50
Enoxaparin	12
Reviparin	10
12mer-6	150
12mer-3	0-32
Temperatur (°C)	25
Equilibrierungszeit (min)	60 min für UFH, Enoxaparin, Reviparin, 12mer-6 und 5 min für 12mer-3
Wellenlänge (nm)	270-198
Bandbreite (nm)	1,5
Wiederholungen	10
Time-per-points (s)	1000
Current-Time-per-points (s)	1000

Die Dekonvolution von CD-Spektren wurde mit circular dichroism neural network (CDNN) Software, geschrieben von Dr. Gerald Böhm, Institut für Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg, Germany) durchgeführt [17]. Die CD-Spektren von PF4 und PF4/Heparin-Komplexen wurden basislinienkorrigiert und in Bezug auf Schichtdicke, Anzahl der Aminosäuren, Molekulargewicht und Konzentration normiert, um die wellenlängenabhängige mean residue ellipticity (MRDE) -Einheit zu erhalten [2, 12,17].

2.2.3 Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Mit Hilfe des antikörperbasierten Nachweisverfahrens, Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA), können bestimmte Moleküle in Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. Von besonderer Bedeutung sind hierbei Proteine wie z.B. Antikörper oder Marker für Virusinfektionen. Die Technik, die auf einer spezifischen Reaktivität eines AKs gegen ein Ag basiert, erlaubt eine quantitative Aussage bezüglich der Konzentration des

zu untersuchenden Moleküls. Ein potenzielles Ag ist auf der Oberfläche einer Mikrotiterplatte (CovaLink, Nunc, Langensfeld, Deutschland) gebunden. Dann bindet ein respektiver AK spezifisch an dem antigenen Substrat. Durch einen zweiten, enzymgekoppelten AK, wird dieser erkannt. Durch das Enzym, welches eine enzymatische Farbreaktion auslöst, kommt es zu einer Signalverstärkung und Visualisierung. Es wird umso mehr Substrat vom Enzym umgesetzt, je mehr AK am Ag gebunden werden. Die Farbintensität ist also direkt proportional zur Antikörperkonzentration der untersuchten Probe [2, 12].

In unserem Experiment wurde die Antikörperbindung an die verschiedenen PF4/Heparin-Komplexe gemessen (Abbildung 6).

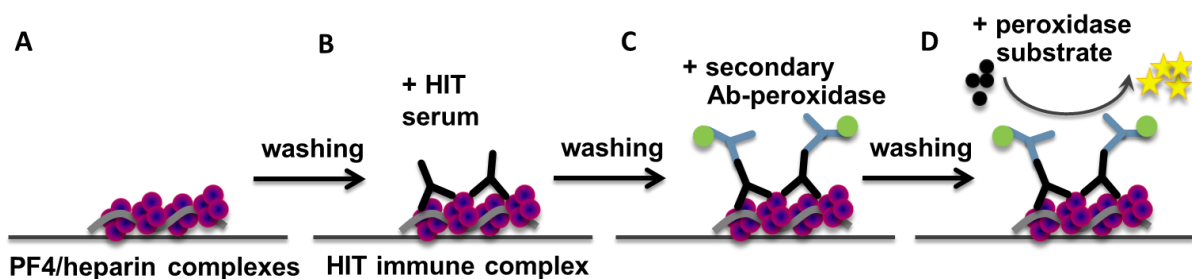


Abbildung 6: Das Prinzip der ELISA-Technik. A) PF4/Heparin-Komplexe sind nichtkovalent an einer Mikrotiterplatte gebunden. B) Der Komplex interagiert mit einem ersten AK aus HIT-Patienten. C) Ein zweiter enzymgekoppelter AK bindet spezifisch an dem ersten AK. D) Eine enzymatische Farbreaktion erfolgt (aus Sven Brandt. *Formation and CD-Spectroscopic Characterization of antigenic Protein/Polyanion Complexes*, 2014 [12]).

Der Anteil an gebundenen Ak kann mit dem Lambert-Beerschen Gesetz mittels eines Photometers bei einer Absorption von 492 nm bestimmt werden [2, 4]:

$$A = -\log_{10} \frac{I}{I_0} = \epsilon \cdot l \cdot c \quad I = \text{Intensität des transmittierten Lichtes}$$

I_0 = Intensität des einfallenden Lichtes

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient

l = Dicke des durchstrahlten Körpers

c = Konzentration des Analyts

Für die Analyse wurden sieben menschliche Seren mit enthaltenen Anti-PF4/Heparin-IgG-Antikörper verwendet und PF4 (20 µg/ml) mit UFH (0,5 I.E./ml PF4) und steigenden Konzentrationen der synthetischen Polysaccharide 12mer-1 bis 12mer-6 (2, 3 und 4 µg) hinzupipettiert. Weiterhin wurden zur Kontrolle entsprechende negative Seren verwendet. Die oben erwähnten Seren lassen sich anhand ihrer Extinktion bzw. des OD-Wertes in vier verschiedene Serenklassen unterteilen. Eine ausführliche Auswertung findet sich in der Tabelle 3. Die Serumklasse 1, dargestellt mit einer grünen Farbe, zeigt mit einem OD-Wert von < 0,5 keine Reaktion an, es handelt sich also um negative Seren. Bei den in der Tabelle 3 gelb unterlaufenen Feldern mit einem OD-Wert von 0,5 bis 1 (Serumklasse 2) handelt es sich um eine schwache Reaktion im ELISA-Test und die rot markierten Felder (Serumklasse 3 und 4) mit OD-Werten von 1 bis 2 bzw. > 2 verdeutlichen eine starke bis sehr starke Antikörperbindung zu den PF4/Heparin-Komplexen.

Der Test wurde wie folgt durchgeführt:

- 60-minütige Vorinkubation in einem Röhrchen von PF4 (20 µg/ml) mit UFH (0,5 I.E./ml PF4/Coating Puffer NaN₃) und steigenden Konzentration der Polysaccharide 12mer-1 bis 12mer-6 (2, 3 und 4 µg) bei Raumtemperatur
- mit 100 µl/well beschichten und über Nacht coat
- Mikrotiterplatte 5x mit Waschpuffer waschen (200 µl/well)
- Seren 1:200 mittels Verdünnungspuffer verdünnen (100 µl/well)
- 60-minütige Inkubation bei Raumtemperatur
- Mikrotiterplatte 5x mit Waschpuffer waschen (200 µl/well)
- anti-human IgG/A/M-Peroxidasekonjugat hinzupipettieren (100 µl/well)
- 60-minütige Inkubation bei Raumtemperatur
- Mikrotiterplatte 5x mit Waschpuffer waschen (200 µl/well)
- Substratlösung (TMB-Substrat) hinzupipettieren (100 µl/well)

- 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur
- 0,5 M Schwefelsäure (H₂SO₄) hinzupipettieren (100 µl/well)
- Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 492 nm
- positives Ergebnis bei einer Extinktion von > 0,5 [4, 10, 18]

2.2.4 Heparin-induzierter Plättchenaktivierungstest (HIPA)

Der funktionelle Heparin-induzierte Plättchenaktivierungstest (**HIPA**), bei dem das Waschen von Plättchen der wichtigste präanalytische Schritt ist, dient zum Nachweis von Plättchenaggregationen durch die Bindung von Axs an PF4/Heparin-Komplexe. Hierbei wird Blut von drei gesunden Spendern verwendet, die in den letzten zehn Tagen keine Medikamente eingenommen haben, die die Thrombozytenfunktion stören könnten.

Der Test wurde wie folgt durchgeführt:

- 2x10 ml ACD-A-Blut von 4 gesunden Spendern gewinnen (ACD-A: Blut im Verhältnis 1: 6,25)
- 20-minütige Zentrifugation bei 120xg
- ca. 5 ml plättchenreiches Plasma (PRP) von jedem Spender vorsichtig in neue Röhrchen abheben
- pro 1 ml PRP 111 µl ACD-A-Lösung und 5 µl Apyrase (1000 U/ml) zusetzen
- 7-minütige Zentrifugation bei 650xg
- Überstand abgießen
- Thrombozytenpellet in ca. 1 ml Suspensionslösung resuspendieren
- Einstellen der Thrombozytensuspension auf 300.000 Thr./µl mit Suspensionspuffer
- 45-minütige Inkubation bei 37°C, dabei die Röhrchen verschließen

Pipettieren in eine Rundbogen-Mikrotiterplatte, die mit 2 Stahlkugeln je Vertiefung versehen ist:

- 10 µl Heparin 2,1 U/ml, 1050 U/ml (Endkonzentration 0,2 U/ml bzw. 100 U/ml)
- je 2,5 µg/ml der 12mer-Polysaccharide
- +20 µl hitzeinaktiviertes Patientenserum
- +75 µl Thrombozytensuspension
- 45-minütige Inkubation der Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer bei ca. 500 rpm [19, 20]

In fünf-minütigen Abständen erfolgte zur Beurteilung der Transparenz der Thrombozytensuspension eine visuelle Auswertung der Plättchenaggregation. Kommt es dabei zur Aktivierung der Blutplättchen, so führt dies zur Aggregation und Sedimentation der Thrombozyten, der Reaktionsansatz ist klar. Eine trübe Suspension ist bei einer ausbleibenden Aktivierung zu erkennen. Der Nachweis einer HIT ist gegeben, wenn es zur Aggregation der Thrombozyten bei geringer Heparinkonzentration kommt [7, 19, 20, 21].

Eine Probe wird als positiv für HIT-Aks betrachtet, wenn positive Ergebnisse mit Testplättchen von mindestens einem der drei Spender erhalten wurden. Kommt es jedoch zur Thrombozytenaktivierung mit allen Testplättchen in Gegenwart von niedrigen und hohen Konzentrationen, so ist die Probe nicht verwertbar, da dies als nicht-spezifische Reaktion angesehen wird [20, 21].

3. Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob und in welchem Ausmaß unterschiedlich sulfatierte Polysaccharide das Protein PF4 strukturell verändern. Des Weiteren stellte sich die Frage, ob diese Polysaccharide in Wechselwirkung mit einem Standardheparin die Struktur von PF4 soweit strukturell verändern kann, dass es zu einer Beeinflussung der Antigen/Antikörper-Interaktion von PF4/Heparin-Antikörper kommt. Hierfür wurden eine Anzahl verschiedener experimenteller Testverfahren benutzt. Zur Untersuchung der Sekundärstruktur und Konformationsänderung von PF4 im Zusammenspiel mit verschiedenen Heparinen kam das CD-Verfahren zur Anwendung. Für den Nachweis der antikörperbindenden Antigenität der PF4/Heparin-Komplexe wurden die Tests ELISA und HIPA angewandt.

3.1 Zirkulardichroismus (CD)

3.1.1 Zirkulardichroismus der Standardheparine

Die Sekundärstruktur von PF4 änderte sich nach der Komplexbildung mit verschiedenen Standardheparinen.

Diese aufgezeichneten CD-Spektren, welche in Abbildung 7.1 zu finden sind, wurden in einem Wellenlängenbereich von 270-190 nm untersucht. Vor jeder Messung gab es eine Equilibrierungszeit von fünf Minuten.

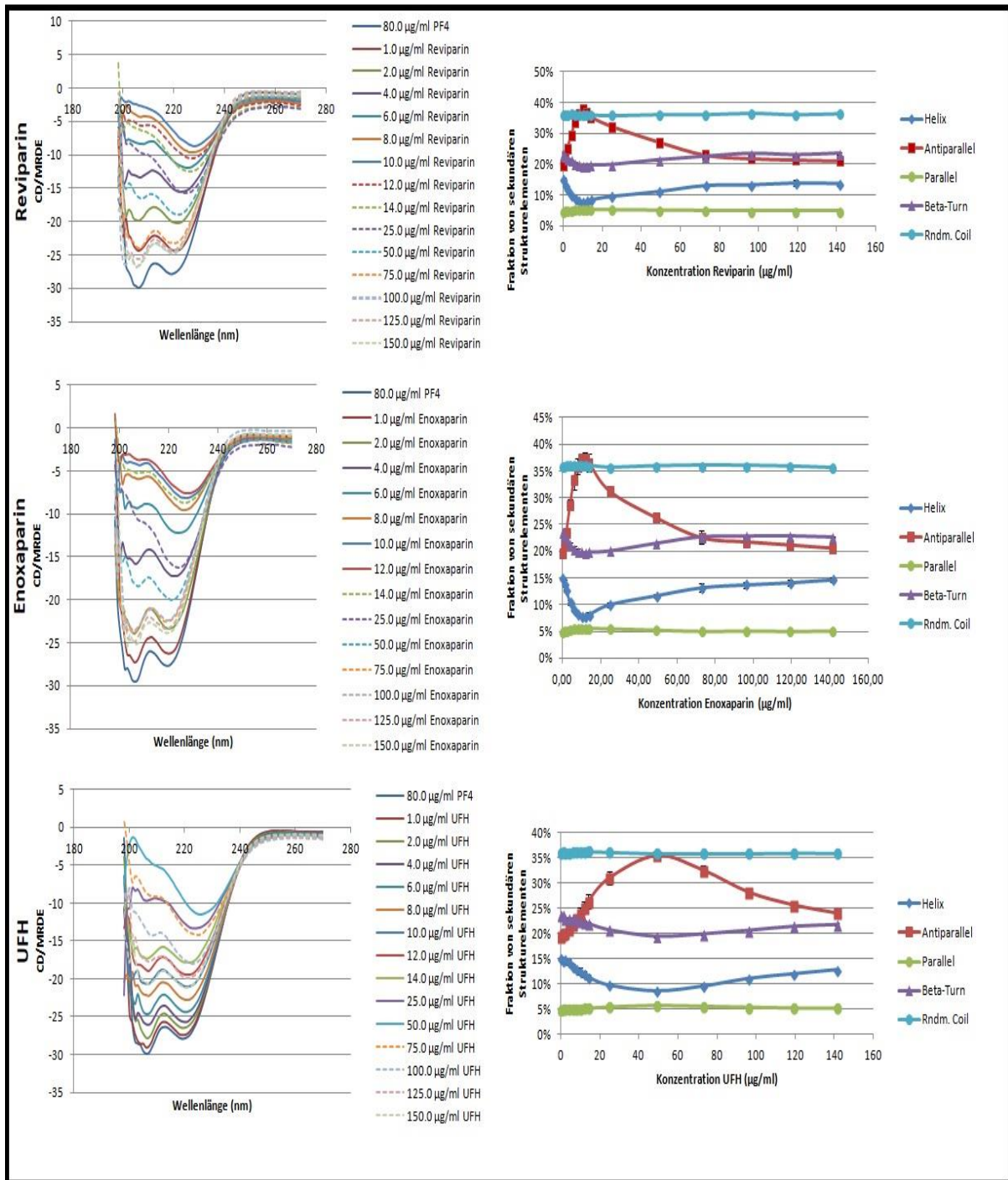


Abbildung 7.1: Die CD-Spektren der Standardheparine. Normalisierte CD-Daten (links) und die Dekonvolution (rechts) von PF4 im Komplex mit Reviparin, Enoxaparin und UFH, welche bei steigenden Heparinkonzentrationen geformt wurden. Die PF4-Konzentration liegt bei 80 µg/ml und die Titrationskonzentrationen der Standardheparine betragen 1-150 µg/ml. Die gestrichelten Kurven zeigen die Reversibilität der Konformationsänderung von PF4 an. Random coil, antiparallel, β -turn, α -helix und parallel β -sheet werden angezeigt. Alle Messungen wurden dreimal reproduziert.

Vergleicht man die Diagramme in Abbildung 7.1 aller drei Standardheparine Reviparin, Enoxaparin und UFH untereinander, so wird ersichtlich, dass es einen Zusammenhang zwischen der Kettenlänge des Heparins bzw. deren Molekulargewichte und der Änderung in der Sekundärstruktur des PF4s gibt. Die maximale strukturelle Veränderung von PF4 wurde von dem höhermolekularen Heparin UFH bei einer Konzentration von 50 µg/ml induziert, während bei den niedermolekularen Heparinen Reviparin und Enoxaparin die größte Konformationsänderung bereits bei einer Konzentration von 10 und 12 µg/ml erfolgte. Danach kam es jeweils zur Reversibilität der Strukturänderung von PF4, welche anhand der gestrichelten Kurven nach unten ersichtlich wird. Interessant ist hierbei, dass die strukturelle Veränderung des PF4s, ausgelöst durch UFH, erst bei höheren Konzentrationen von 50 µg/ml reversibel ist, wohingegen die Reversibilität bei einem niedermolekularem Heparin schon bei geringeren Konzentrationen von 10 bzw. 12 µg/ml stattfindet. Alle drei Standardheparine zeigen ähnliche maximale und reversible PF4-Änderungen mit einem Anteil der antiparallelen β -Blätter von 35-40 %. Bei Reviparin ist dieser Anteil mit fast 40 % am größten. Enoxaparin löste einen Anteil von etwa 38 % aus und UFH erreichte eine 35 %ige Fraktion von antiparallelen β -Blättern. Das antiparallele β -Blatt kann hier als Indikator für die Gesamtveränderungen der PF4-Struktur verwendet werden, da dies die einzige Form der Sekundärstruktur war, die während der PF4/Heparin-Wechselwirkungen erhöht wurde.

3.1.2 Zirkulardichroismus der 12mer-Polysaccharide

Zur weiteren Beantwortung der Fragestellung wurden die einzelnen Spektren der Komplexbildung aus PF4 und den synthetischen Polysaccharide 12mer-2, 12mer-3, 12mer-4, 12mer-5 und 12mer-6 aufgezeichnet, um auch hier die Änderung in der Sekundärstruktur von PF4 zu bestimmen. Die Messungen, deren Spektren in Abbildung 7.2 dargestellt sind, erfolgten bis auf den verkürzten Wellenlängenbereich (270-198 nm) unter denselben Bedingungen. Der verkürzte Bereich ist darauf zurückzuführen, dass die synthetischen Polysaccharide zu viele Fluktuationen im CD-Gerät hervorriefen und dadurch Schäden hätten verursacht werden können. Aufgrund der Materialknappheit konnte mit diesen Polysacchariden jeweils nur ein Experiment durchgeführt und bei 12mer-3 konnte nur bis zu einer Konzentration von 100 µg/ml auftitriert werden.

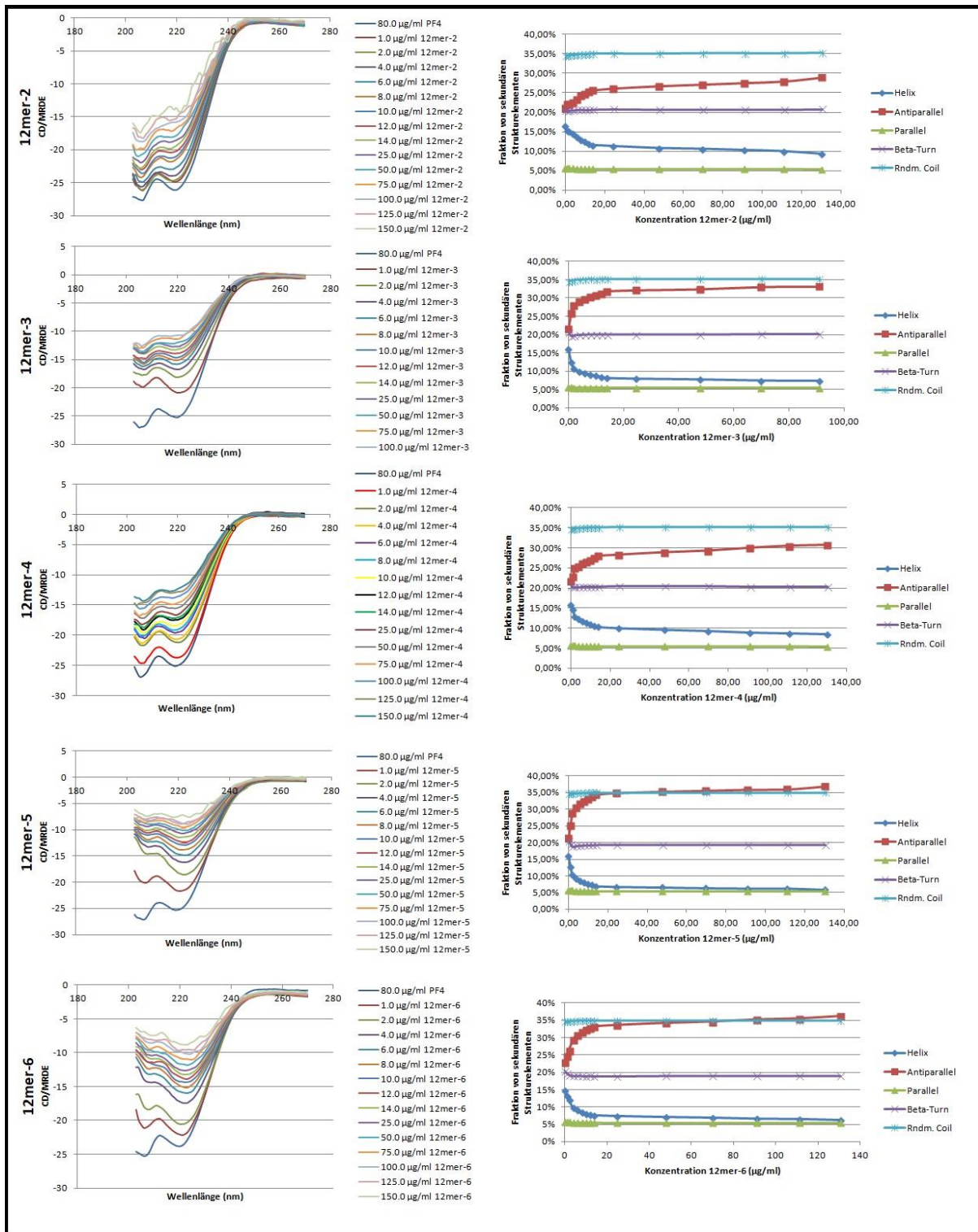


Abbildung 7.2: Die CD-Spektren der synthetischen Polysaccharide. Normalisierte CD-Daten (links) und die Dekonvolution (rechts) von PF4 im Komplex mit 12mer-2, 12mer-3, 12mer-4, 12mer-5 und 12mer-6, welche bei steigenden Heparinkonzentrationen geformt wurden. Die PF4-Konzentration liegt bei 80 µg/ml und die Titrationskonzentrationen der synthetischen Heparine beträgt 1-150 µg/ml. Random coil, antiparallel, β -turn, α -helix und parallel β -sheet werden angezeigt. Von jedem Polysaccharid wurde eine Messung durchgeführt.

Auch bei diesen Experimenten kann der Anteil an antiparallelen β -Blättern als Indikator für die Gesamtveränderungen der PF4-Struktur angewendet werden.

Dabei ist zu erkennen, dass der Anteil der antiparallelen β -Blätter in Abhängigkeit des Molekulargewichts und der Anzahl der Sulfatgruppen variiert. Je größer das Molekulargewicht und die Anzahl der Sulfatgruppen des Polysaccharids, desto größer ist die Konformationsänderung des Proteins PF4. Das synthetische Polysaccharid 12mer-2 mit 6 Sulfatgruppen hat einen prozentualen Anteil an antiparallelen β -Blättern von $< 29\%$ hervorgerufen. Der Anteil von dem aus 10 Sulfatgruppen bestehenden 12mer-4 liegt bei 31% . 12mer-3 mit 12 Sulfatgruppen verursachte einen Anteil von 33% und 12mer-5 mit 16 Sulfatgruppen und 12mer-6 mit 17 Sulfatgruppen führten jeweils einen Anteil von $> 36\%$ herbei. Bei keinem der synthetischen Polysaccharide konnte eine maximale Konzentration für die strukturelle Änderung des PF4s erkannt werden, auch bei einer Konzentration von $150\ \mu\text{g/ml}$ der Polysaccharide fand keine Reversibilität statt.

3.1.3 Zirkulardichroismus der Standardheparine und

12mer-Polysaccharide – Inhibierungsexperimente

Zum Abschluss wurden mittels CD-Technik Inhibierungsexperimente mit $80\ \mu\text{g/ml}$ PF4, den Standardheparinen, 12mer-6 sowie 12mer-3 durchgeführt. Die Equilibrierungszeit von PF4 in Wechselwirkung mit UFH, Reviparin, Enoxaparin, sowie 12mer-6 betrug 60 Minuten, um eine optimale Komplexbildung zwischen PF4 und dem Heparin zu erreichen. Es wurde die Konzentration des Standardheparins verwendet, bei welcher PF4 in den Standardexperimenten die größte Konformationsänderung zeigte. Anschließend wurde 12mer-3 von 0 bis $32\ \mu\text{g/ml}$ hinzutitriert. Diese Spektren wurden ebenfalls aufgrund der Fluktuationen in einem Wellenlängenbereich von 270-198 nm aufgenommen und sind in Abbildung 7.3 dargestellt.

Auch hier konnten hinsichtlich der Knappheit des Materials nur zwei Wiederholungen erfolgen.

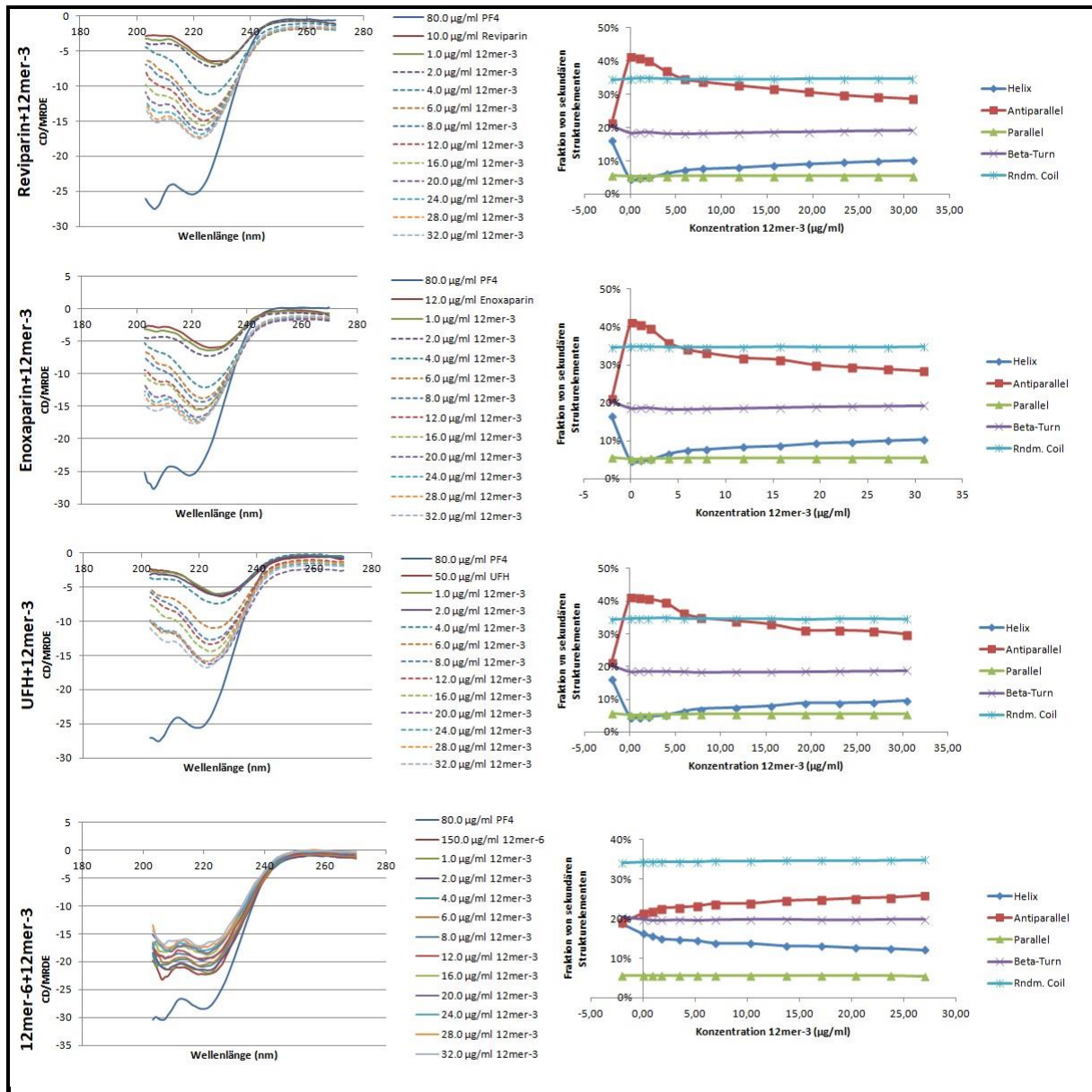


Abbildung 7.3: Die CD-Spektren der Inhibierungsexperimente. Normalisierte CD-Daten (links) und die Dekonvolution der Inhibierungsexperimente (rechts) mit 12mer-3 im Komplex mit Reviparin, Enoxaparin, UFH und 12mer-6. Die PF4-Konzentration liegt bei 80 µg/ml, bei Reviparin, Enoxaparin, UFH und 12mer-6 wurde die maximale Konzentration aus den vorhergehenden Experimenten genutzt und die Titrationskonzentrationen von 12mer-3 beträgt 1-32 µg/ml. Die gestrichelten Kurven zeigen die Reversibilität der Konformationsänderung von PF4 an. Random coil, antiparallel, β -turn, α -helix und parallel β -sheet werden angezeigt. Jedes Inhibierungsexperiment wurde einmal durchgeführt.

Aus den Diagrammen in Abbildung 7.3 lässt sich ableiten, dass das synthetisch hergestellte Polysaccharid 12mer-3 die Standardheparine Reviparin, Enoxaparin und UFH soweit beeinflussen kann, dass die durch die Heparine ausgelöste Konformationsänderung von PF4 reversibel ist. Dies lässt sich erneut an den gestrichelten Kurven nach unten erkennen. Bei den niedermolekularen Heparinen Reviparin und Enoxaparin in Wechselwirkung mit 12mer-3 geschah die Reversibilität der strukturellen Änderung von PF4 bereits bei einer Konzentration von 2,0 µg/ml 12mer-3, während dies bei dem höher molekularem Heparin UFH erst bei 4,0 µg/ml 12mer-3 erfolgte. Bei allen drei Standardheparinen liegt der Anteil an antiparallelen β-Blättern bei etwa 40-41 %. Jedoch kommt es durch 12mer-3 zu keiner Beeinflussung von 12mer-6 in Wechselwirkung mit PF4. Hier wurde nur ein 25 %iger Anteil erreicht.

3.2 Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Mittels CD-Technik wurden die Änderungen in den Sekundärstrukturen von PF4 gemessen und die daraus resultierende Antigenität durch das antikörperbasierende Nachweisverfahren ELISA untersucht.

Anhand des OD-Wertes lassen sich vier Serenklassen mit unterschiedlicher Reaktionsstärke unterscheiden. Die Serumklasse 1, dargestellt mit einer grünen Farbe, zeigt mit einem OD-Wert von < 0,5 keine Reaktion an, es handelt sich also um negative Seren. Bei den gelb unterlaufenen Feldern mit einem OD-Wert von 0,5 bis 1 handelt es sich um eine schwache Reaktion im ELISA-Test und die rot markierten Felder mit OD-Werten von 1 bis 2 bzw. > 2 verdeutlichen eine starke bis sehr starke Antikörperbindung zu den PF4/Heparin-Komplexen. Die erhaltenen Ergebnisse lassen sich in der Tabelle 3 und Abbildung 8 finden.

Table 3: Die ELISA-Daten. OD-Werte für die Kontrolle mit UFH und aller synthetischen Polysaccharide mit 2,3 und 4 µg und die Unterteilung in die entsprechende Serumklasse.

Serumklasse	Serum-Nr.	Kontrolle (UFH+PF4) anti IgG OD 450nm-LW	12mer-1			12mer-2			12mer-3			12mer-4			12mer-5			12mer-6		
			2 µg	3 µg	4 µg	2 µg	3 µg	4 µg	2 µg	3 µg	4 µg	2 µg	3 µg	4 µg	2 µg	3 µg	4 µg	2 µg	3 µg	4 µg
1	41738	0.01	0.02	0.06	-0.01	0.04	0.05	0.03	0.05	0.02	0.03	0.03	0.02	0.01	0.02	0.1	0.04	0.01	0.03	0.03
1	41821	0.07	0.04	0.07	0.02	0.04	0.06	0.06	0.07	0.02	0.05	0.07	0.05	0.03	0.12	0.09	0.08	0.07	0.07	0.07
2	33548	0.62	0.25	0.26	0.23	0.22	0.29	0.24	0.17	0.22	0.19	0.16	0.21	0.18	0.45	0.34	0.26	0.26	0.31	0.3
3	40768	1.39	0.18	0.22	0.13	0.25	0.2	0.18	0.2	0.17	0.2	0.24	0.3	0.29	1.26	0.93	1.28	0.62	0.82	0.85
3	39599	1.52	0.05	0.07	0.02	0.04	0.08	0.08	0.04	0.04	0.08	0.09	0.11	0.06	1.09	0.72	0.26	0.61	0.39	0.32
4	41702	2.08	0.06	0.09	0.04	0.12	0.08	0.08	0.08	0.05	0.07	0.12	0.16	0.07	1.25	0.97	0.15	0.26	0.59	0.65
4	37467	2.12	0.46	0.43	0.4	0.25	0.45	0.18	0.51	0.45	0.47	0.51	0.52	0.5	1.71	1.44	0.8	0.92	0.91	1.17

Serumklasse	OD-Wert
1	OD < 0.5
2	OD 0.5-1
3	OD 1-2
4	OD > 2

Anhand der Tabelle 3 lassen sich die Ergebnisse wie folgt zusammenfassen. Bei der Kontrolle aus PF4 und Unfraktioniertem Heparin wird anhand des OD-Wertes ersichtlich, dass die Seren 41738 und 41821 keine Reaktion im ELISA-Test zeigen und der Serumklasse 1 zugeordnet werden können. Das Serum 33548 reagiert sehr schwach und wird in die Klasse 2 eingeordnet. Stark haben die Seren 40768 und 39599 im Verfahren reagiert und gehören damit zur Klasse 3. Die beiden Seren 41702 und 37467, die der Serumklasse 4 zugeordnet werden, zeigten im Verlauf den höchsten OD-Wert und damit die stärkste Antikörperbindung zu den Komplexen aus PF4 und UFH.

Die Polysaccharide 12mer-1 bis 12mer-4 zeigten bei allen sieben verschiedenen Seren im ELISA-Test in allen drei Konzentrationsstufen 2 µg, 3 µg und 4 µg eine negative oder sehr schwache Reaktion.

Die stark reagierenden Polysaccharide 12mer-5 und 12mer-6 weisen hingegen positive Ergebnisse mit den letzten vier getesteten Seren (40768, 39599, 41702 und 37467) auf, die auch in der Kontrolle positiv reagiert haben. Die in der Kontrolle negativ bzw. schwach getesteten Seren 41738, 41821 und 33548 zeigten auch in Wechselwirkung mit 12mer-5 und 12mer-6 keine oder eine sehr schwache Reaktion, woraufhin dies als eine spezifische Reaktion angesehen werden kann.

Abbildung 8 verdeutlicht grafisch die gewonnenen Resultate im ELISA-Test.

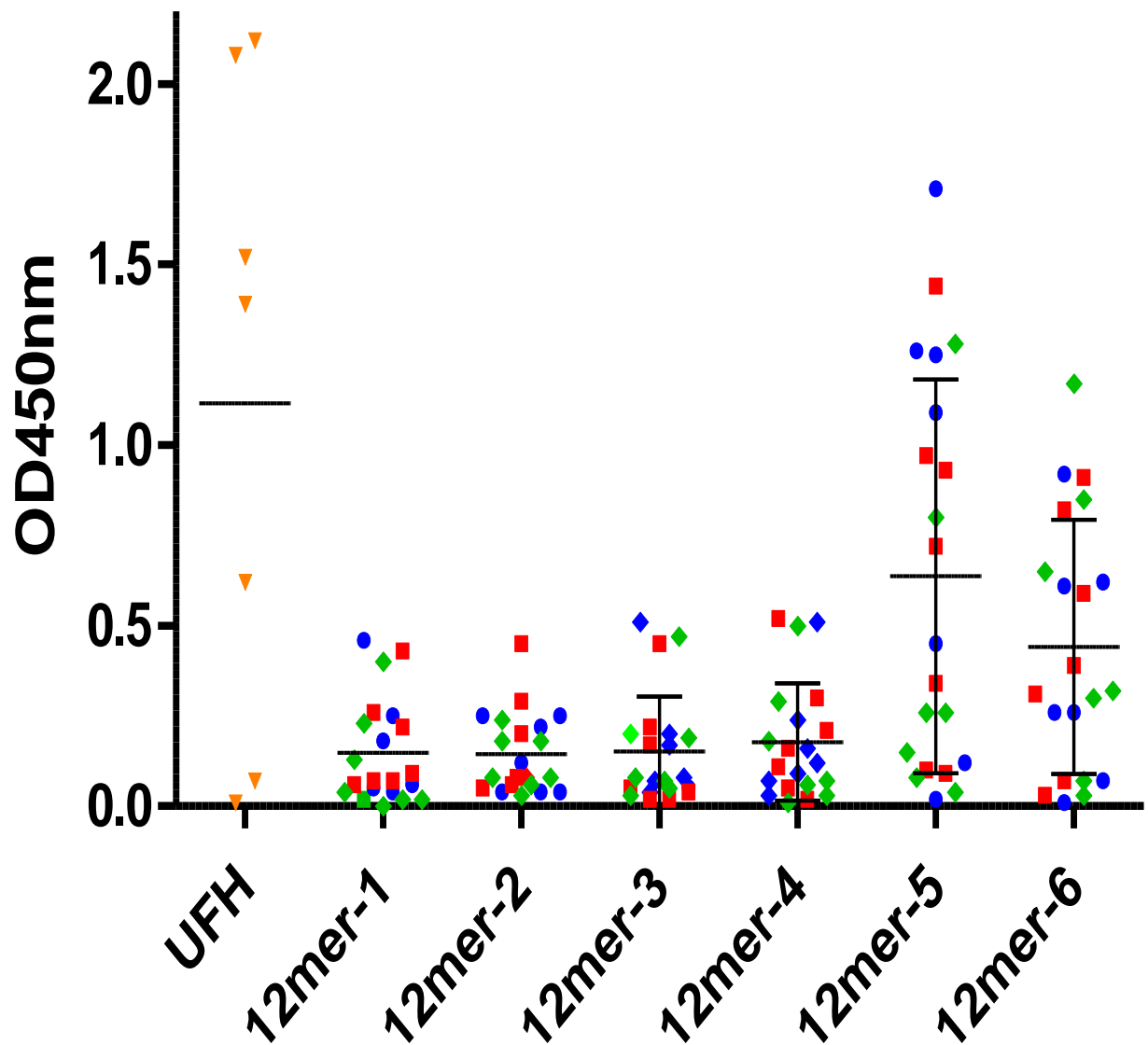


Abbildung 8: Die ELISA-Auswertung. Grafische Darstellung der OD-Werte für die Kontrolle mit UFH (orange) und aller synthetischen Polysaccharide mit 2 µg (blau), 3 µg (rot) und 4 µg (grün). Serumklasse 1 ist definiert bei einem OD-Wert < 0,5 und stellt eine negative Reaktion dar. Bei der Serumklasse 2 kommt es zu einer schwachen Antikörperbindung zu den PF4/Heparin-Komplexen und beginnt bei einem Wert von 0,5-1. Serumklasse 3 ergibt sich bei einem Wert von 1-2 und die Serumklasse 4 startet bei einem OD-Wert OD > 2. Beide Klassen zeigen eine starke Reaktion an.

3.3 Heparin-induzierter Plättchenaktivierungstest (HIPA)

Zum Nachweis der Plättchenaggregationen durch die Bindung von Aks an PF4/Heparin-Komplexe kam der funktionelle HIPA-Test zur Anwendung. Die Ergebnisse des HIPA wurden nach der Schnelle der Reaktion quantitativ beurteilt. Je schneller die Reaktion erfolgte, desto stärker war die Reaktion. In Analogie zur Darstellung der ELISA-Ergebnisse wurden diese in Tabelle 4 farbig kodiert. Erfolgt die Reaktion nach fünf Minuten (dunkelorange), so kann dies als eine starke funktionelle HIPA-Reaktion angesehen werden. Werte von zehn Minuten (orange) verdeutlichen eine mittelstarke Reaktion und Werte ab 15 (rosa) veranschaulichen eine schwache Reaktion. Bei Ergebnissen von 0 und > 30 (weiß), kann die Probe als negativ für enthaltene Aks betrachtet werden. Die Zunahme der Blautöne repräsentiert anhand der Aggregation der Thrombozyten die Stärke der Serumklasse im ELISA. Tabelle 4 zeigt die aus dem HIPA-Test abgeleiteten Resultate.

Tabelle 4: Die HIPA-Daten. Zu sehen sind die verwendeten Seren mit ihren jeweiligen Stärken. Bei jedem Polysaccharid erfolgte in fünfminütigen Abständen eine visuelle Auswertung der Plättchenaggregation, um die Transparenz der Thrombozytensuspension zu beurteilen.

Serumstärke	Serumklasse	Serumnummer	Kontrolle									12-mere																				
			Puffer			Reviparin			Heparin 100U/ml			1			2			3			4			5			6					
			D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3						
negativ	1	41738	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	41821	0	0	0	0	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	15	0	0	0	0
	2	33548	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
positiv	3	40768	0	0	0	10	10	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	3	39599	0	0	0	10	5	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	15	5	5	15	5	5	15
	4	41702	0	0	0	10	15	15	0	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0	5	0	0	5	10	0	5	15	0	5	15	0
	4	37467	0	0	0	10	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Serumklasse	1
Serumklasse	2
Serumklasse	3
Serumklasse	4

In der Tabelle 4 lassen sich die gewonnenen Daten erkennen. Für die Durchführung des funktionellen HIPA-Tests wurden die identischen sieben Seren verwendet, die zuvor im ELISA Anwendung fanden. Hier ist eine Übereinstimmung ersichtlich. Die im ELISA negativ getesteten Seren 41738, 41821 und 33548 reagieren in der Kontrolle auch im HIPA-Test negativ bzw. sehr schwach. Es konnte keine Thrombozytenaggregation nachgewiesen werden. Hingegen kommt es bei den Seren 40768, 39599, 41702 und 37467 zu einer starken funktionellen HIPA-Reaktion. Die Kontrollexperimente im funktionellen HIPA-Test sind repräsentabel und veranschaulichen, dass die im ELISA hochreagierenden Seren auch eine valide PF4/Reviparin-Reaktion im HIPA-Test aufweisen.

Die synthetischen Polysaccharide 12mer-1 bis 12mer-4 zeigten bei allen Seren (41738, 41821, 33548, 40768, 39599, 41702 und 37467) eine negative Reaktion bezüglich der Plättchenaggregation.

Die schon im ELISA stark reagierenden Polysaccharide 12mer-5 und 12mer-6 weisen hingegen positive Ergebnisse mit allen in der Kontrolle positiv getesteten Seren (40768, 39599, 41702 und 37467) auf. Die in der Kontrolle negativ getesteten Seren 41738, 41821 und 33548 zeigten auch, bis auf Nummer 41821, in Wechselwirkung mit 12mer-5 und 12mer-6 keine Reaktion und verdeutlichen eine Übereinstimmung hinsichtlich der ELISA-Auswertung. Es kann also als eine spezifische Reaktion angesehen werden. Auch zu den einzelnen CD-Experimenten ist damit eine Kongruenz hinsichtlich der fehlenden Inhibierung durch 12mer-3 ersichtlich und beweist die Stärke der synthetischen Polysaccharide 12mer-5 und 12mer-6, welche sich wieder anhand der höheren Anzahl an Sulfatgruppen erklären lässt.

4. Diskussion

Mit der hier vorliegenden Arbeit haben wir zeigen können, dass durch das Zusammenspiel des Proteins PF4, eines Standardheparins wie UFH, Reviparin oder Enoxaparin mit einem synthetisch hergestellten Polysaccharid die Antigen/Antikörper-Interaktion von PF4/Heparin-Antikörper beeinflusst und die Expression des Antigens auf PF4/Heparin-Komplexen in vitro verhindert werden kann. Hierfür wurden die Polysaccharide 12mer-1, 12mer-2, 12mer-3, 12mer-4, 12mer-5 und 12mer-6 getestet. All diese synthetisch hergestellten Polysaccharide enthielten eine unterschiedliche Anzahl an Sulfatgruppen, die für den Inhibierungsprozess relevant waren. Aus den Experimenten lässt sich mittels der Zirkulardichroismustechnik erkennen, dass das Polysaccharid 12mer-3 mit einer Anzahl an zwölf Sulfatgruppen in der Lage ist, die Konformationsänderung des Chemokins PF4, welche durch die Wechselwirkung mit einem Standardheparin zustande kommt, zu reduzieren.

Aufgrund seiner stark positiven Ladung bindet PF4 mit hoher Affinität an negativ geladenes Heparin. Dadurch wird eine strukturelle Veränderung von PF4 ausgelöst und es formieren sich antigene Komplexe bestehend aus PF4 und Heparin. Diese antigen-wirkenden Immunkomplexe führen zur Bildung von Antikörpern vom Typ IgG₄ mit anschließender Thrombozytenaggregation.

Durch die oben beschriebene Hemmung, mittels der Kombination aus einem Standardheparin, dem Protein PF4 und dem synthetischen Polysaccharid 12mer-3, könnte eventuell auch in vivo die Expression des Antigens auf PF4/Heparin-Komplexen gehemmt und dadurch die Heparin-induzierte Thrombozytopenie vom Typ II verhindert werden. Dies muss jedoch in klinischen Studien geprüft werden.

Um die Ak-Bindung und die Plättchenaggregation zu untersuchen, wurden die Polysaccharide 12mer-1 bis 12mer-6 dem ELISA und HIPA-Test unterzogen. Eine schwache oder sogar negative Reaktion zeigte sich bei den Polysacchariden 12mer-1, 12mer-2, 12mer-3 und 12mer-4. Positivergebnisse ließen sich bei 12mer-5 und 12mer-6 erkennen und verdeutlichen die Stärke der beiden Polysaccharide, welche durch die höhere Anzahl an Sulfatgruppen zu erklären ist.

Die bei dieser Arbeit verwendeten sieben Seren repräsentieren vermutlich nicht das volle Reaktionsmuster aller Anti-PF4/Heparin-Antikörper. Dabei führten die Polysaccharide 12mer-1, 12mer-2, 12mer-3 und 12mer-4 zu einer negativen oder sehr schwachen Reaktion, die Polysaccharide 12mer-5 und 12mer-6 jedoch zu positiven Ergebnissen. Alle Reaktionen können als spezifisch angesehen werden, da die Seren zuvor einer Positiv- und Negativkontrolle mit UFH bzw. Reviparin unterzogen wurden. Die Unterschiede in der Kapazität der Antikörperbindung für die verschiedenen Polysaccharide können durch die Ladungen verursacht werden (mehr Sulfatgruppen für 12mer-5 und 12mer-6). Jedoch haben frühere Studien gezeigt, dass die Ladung den Zugang eines IgG-Antikörpers zu den Epitopen nicht hemmt.

Obwohl bei den verschiedenen Seren im ELISA ein breites Spektrum an Reaktivität besteht, sind die Ergebnisse reproduzierbar. Dies zeigt uns, dass der Ansatz stabil ist und eine robuste Bewertung ermöglicht. Es gibt eine klare Korrelation zwischen den ELISA-Daten (höhere Reaktivität für 12mer-5 und 12mer-6) und den CD-Daten (12mer-5 und 12mer-6 führten jeweils einen Anteil von > 36 % herbei).

Die Erhöhung der Anzahl von Seren in zukünftigen Experimenten könnte die Genauigkeit der Korrelation verbessern und eine noch genauere in vitro-Bewertung der Antigenität ermöglichen.

Im HIPA-Test gibt es Schwankungen in der Reaktivität verschiedener Seren. Diese Reaktivität von 12mer-5 und 12mer-6 ist jedoch im Vergleich zu den anderen Polysacchariden höher und korreliert mit den ELISA-Daten.

Diese Ergebnisse lassen auch eine Kongruenz hinsichtlich der CD-Messungen erkennen. In den Inhibierungsexperimenten führte 12mer-3 zu keiner Beeinflussung, der durch 12mer-6 ausgelösten Konformationsänderung von PF4. Dies ist durch die höhere Anzahl an Sulfatgruppen des 12mer-6 zu erklären.

Schon in der Doktorarbeit von Martin Kreimann "Characterization of complexes between platelet factor 4 and heparin" [2] wurden Veränderungen in der Sekundärstruktur von PF4 nach der Heparinbindung mittels CD-Messungen und die resultierende Antigenität der PF4/Heparin-Komplexe durch das Testverfahren ELISA untersucht. Auch bei dieser Dissertation, in der die Heparine UFH, HO16, HO08, HO06 und Fondaparinux getestet wurden, konnte hinsichtlich der CD-Messungen das antiparallele β -Blatt als Indikator für die Gesamtveränderung der PF4-Struktur Verwendung finden. Hier ließ sich ein enger Zusammenhang zwischen der Kettenlänge des Heparins und der Änderungen in der Sekundärstruktur des PF4s und der Antigenität der PF4/Heparin-Komplexe beobachten. Langkettige Heparine wie UFH und HO16 lösten die maximale Strukturveränderungen von PF4 mit einem Anteil des antiparallelen β -Blattes von $> 35\%$ und eine Komplexantigenität von $OD > 1$ aus, wohingegen kurzkettige Heparine wie HO06 und HO08 einen OD-Wert von < 1 und irreversible strukturelle Veränderungen von PF4 verursachten. Fondaparinux, welches zu klein für die Formation von antigenen Komplexen ist, führten weder zu einer Strukturveränderung, noch zu einer Komplexantigenität [2].

In der Veröffentlichung "Partially desulfated heparin (ODSH) modulates the interaction between anti-protamine/heparin antibodies and platelets" [22] wurde die Auswirkung von ODSH auf die Interaktion zwischen anti-Protamin/Heparin-Antikörper und Thrombozyten

getestet. Das Antidot Protamin bildet Komplexe mit Heparin, die eine ähnliche Immunantwort wie bei der HIT auslösen. Hierbei konnte die Beobachtung gemacht werden, dass ODSH zu keiner Beeinträchtigung der Neutralisierung von Heparin durch Protamin führt, jedoch die durch die anti-Protamin/Heparin-Antikörper ausgelöste Thrombozytenaktivierung und -zerstörung sogar inhibiert werden kann.

Beide Studien dienen als Vorlage für die hier vorliegende Doktorarbeit.

Die Materialknappheit im Bereich der Menge der synthetischen 12mer-Polysaccharide führte bei den CD-Messungen zu einer Limitation bezüglich der Anzahl an Reproduktionen. Des Weiteren können die durch die Polysaccharide ausgelösten Fluktuationen im CD-Gerät und die damit verbundene Kürzung des Wellenlängenbereichs als Einschränkung angesehen werden. Erwähnenswert ist auch, dass wir eine Konformationsänderung des Proteins PF4 bei den Experimenten erkennen können, jedoch erlaubt die CD-Technik keinen Hinweis darauf, wo genau diese Änderung im Protein zustande kommt.

Die strukturelle Veränderung des Proteins PF4, welche durch das Standardheparin UFH ausgelöst wird, ist erst bei höheren Konzentrationen von 50 µg/ml reversibel. Dies stellt eine Besonderheit dar, da der Prozess bei den niedermolekularen Heparinen Reviparin und Enoxaparin bereits bei einer Konzentration von 10 bzw. 12 µg/ml stattfindet. Hinsichtlich der Kettenlänge der Heparine hätte man erwartet, dass niedermolekulare Heparine erst in höheren Konzentrationen hemmen.

In zukünftigen Messungen wäre es sinnvoll, die Reaktionen von 12mer-3 in Wechselwirkung mit den Standardheparinen UFH, Reviparin und Enoxaparin und 12mer-3 in Kombination mit 12mer-6 im ELISA und im HIPA zu testen. Diese könnten uns eine Übereinstimmung mit den bereits durchgeführten CD-Messungen liefern.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Für die Hemmung der plasmatischen Gerinnung kommen orale und parenterale Antikoagulantien in Betracht. Bei stationären Patienten spielt das parenteral verabreichte Heparin, vorkommend als höher- und niedermolekulares Heparin, die größte Rolle. Neben Blutungskomplikationen, kann Heparin auch die gefürchtete Nebenwirkung Heparin-induzierte Thrombozytopenie auslösen.

Aufgrund der Bildung von Immunkomplexen durch Bindung von Antikörpern an Komplexe aus PF4 und Heparin, kommt es zu einer Thrombozytenaggregation mit eventuell auftretenden Thromboembolien. Das Risiko für diese Entstehung erhöht sich mit steigender Kettenlänge des Heparins, mit einer zehnfach erhöhten Prävalenz bei UFH gegenüber LMWHs.

Das Protein PF4 ist ein tetrameres Protein aus der Familie der CXC-Chemokine und wird in den α -Granula der Thrombozyten gespeichert. Durch deren positive Ladung zeigt es eine hohe Affinität zu negativ geladenem Heparin, wodurch antigene Komplexe aufgrund der strukturellen Veränderung des PF4s formiert werden.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Heparine mit aufsteigender Kettenlänge auf die Struktur von PF4 getestet und untersucht, inwieweit ein Polysaccharid mit einem bestimmten Sulfatierungsgrad in Kombination mit einem Standardheparin die Antigen/Antikörper-Interaktion von PF4/Heparin-Antikörper verändern kann.

Hierfür kamen unterschiedliche Verfahren zum Einsatz. Hauptaugenmerk wurde auf den Zirkulardichroismus gelegt, mit deren Hilfe die Sekundärstruktur und Konformationsänderung von PF4 im Zusammenspiel mit den Heparinen und Polysacchariden

untersucht werden kann. Für den Nachweis von antigenen PF4/Heparin-Komplexen wurde der Enzym-gekoppelte Immunologische Test ELISA und der Heparin-induzierte Plättchenaktivierungstest (HIPA) angewendet.

Die durch die Standardheparine ausgelöste Änderung der Konformation von PF4 lässt sich durch die Zugabe des synthetisch hergestellten Polysaccharids 12mer-3, das 12 Sulfatgruppen hat, hemmen. Dies war nicht mit den anderen synthetischen 12mer-Polysacchariden möglich. Auch zeigte sich keine Interaktion von 12mer-3 auf die Wechselwirkung von PF4 mit 12mer-6, welche durch die geringere Anzahl an Sulfatgruppen des 12mer-3 zu interpretieren ist. Die Bindung von humanen anti-PF4/Heparin-Antikörpern wurde mit ELISA und dem Funktionstest HIPA untersucht. Hier wurden sieben menschliche Seren mit enthaltenen Anti-PF4/Heparin-IgG-Ak verwendet und nach Hinzugabe der synthetischen Polysaccharide die Ak-Bindung an den antigenen PF4/Heparin-Komplexen und die nachfolgende Thrombozytenaggregation getestet.

Das wichtigste Ergebnis dieser Arbeit ist, dass das Polysaccharid 12mer-3 die Struktur von PF4 in PF4/Heparin-Komplexen verändert und dadurch die Bindung von PF4/Heparin-Antikörper reduziert. Durch eine gleichzeitige Gabe von Heparin zusammen mit dem Polysaccharid 12mer-3, könnte das Risiko der unerwünschten Arzneimittelwirkung Heparin-induzierte Thrombozytopenie reduziert werden.

Neben der klinischen Wichtigkeit des Ergebnisses, bietet die hier vorliegende Dissertation auch eine Reihe von Ansatzpunkten für weitere Projekte. Zu nennen wäre hier beispielsweise die Testung der Reaktionen von 12mer-3 in Wechselwirkung mit den Standardheparinen UFH, Reviparin und Enoxaparin und 12mer-3 in Kombination mit 12mer-6 im ELISA und im HIPA, um eine Kongruenz hinsichtlich der bereits durchgeführten CD-Messungen zu liefern.

Auch wäre es in klinischen Studien interessant herauszufinden, ob die Expression des Antigens auf PF4/Heparin-Komplexe auch in vivo gehemmt werden könnte.

Weiterhin kann unser Ansatz zur Synthese von sichereren Wirkstoffen führen, die an PF4 binden.

6. Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

- [1] Gerd Herold und Mitarbeiter. Innere Medizin: Köln 2017, S. 829-831
- [2] Promotion of Martin Kreimann. Characterization of complexes between platelet factor 4 and heparin: September 2014
- [3] Promotion von Annika Schulze. Charakterisierung der anti-PF4/Heparin-Antikörper-sezernierenden B- Zellen im Mausmodell nach systemischer Immunisierung: 2014
- [4] Promotion von Catja Baumann. Interaktion von Plasmafaktoren mit Plättchenfaktor 4: 2015
- [5] Promotion von Krystin Krauel. Interaktion von Thrombozytenproteinen mit Bakterien als Brücke zwischen unspezifischer und spezifischer Immunabwehr: Januar 2012
- [6] A. Greinacher, S. Alban, M.A. Omer-Adam, W. Weitschies, T.E. Warkentin. Heparin-induced thrombocytopenia: A stoichiometry-based model to explain the differing immunogenicities of unfractionated heparin, low-molecular-weight heparin, and fondaparinux in different clinical settings:Thrombosis Research 2008, 122, 211-220
- [7] Andreas Greinacher, Theodore E. Warkentin and Beng H. Chong. Chapter 41. Heparin-induced Thrombocytopenia
- [8] http://www.med4you.at/laborbefunde/lbef2/hit_entstehung.jpg: 04.01.2017, um 10:48 Uhr
- [9] Thi-Houng Nguyen, Andreas Greinacher und Mihaela Delcea. Quantitative description of thermodynamic and kinetic properties of the platelet factor 4/heparin bonds: Nanoscale: 2015, 7, 10130-10139
- [10] Promotion von Sabine Kropf. Heparin-induzierte Thrombozytopenie: Inzidenz von Heparinantikörpern bei Patienten nach orthopädischen Operationen und nachfolgender Thromboseprophylaxe mit unfraktioniertem Heparin im Vergleich zu

niedermolekularem Heparin: 2010

- [11] http://www.med4you.at/laborbefunde/lbef2/hit_entstehung.jpg: 04.01.2017, um 10:48 Uhr
- [12] Promotion of Sven Brandt. Formation and CD-Spectroscopic Characterization of antigenic Protein/Polyanion Complexes: September 2014
- [13] <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/bicinchoninsaure-assay/8373>: 17.01.2016, um 10:32 Uhr
- [14] <https://www.photophysics.com/resources/tutorials/circular-dichroism-cd-spectroscopy>: 22.12.2016, um 14:18Uhr
- [15] Dieses Bild wurde von Sven Brandt erarbeitet.
- [16] Modifiziert von <http://www.proteinchemist.com/cd/cdspec.html>: 19.01.2018, um 13:27Uhr
- [17] G. Böhm, R. Muhr, and R. Jaenicke. Quantitative analysis of protein far uv circular dichroism spectra by neural networks. *Protein Eng*, 5(3): 191-195, April 1992
- [18] Heparin/PF4-ELISA zum Nachweis von Heparin-induzierten Antikörpern: PF4-ELISA Arbeitsanleitung. Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Abteilung Transfusionsmedizin: Stand 2014
- [19] http://www2.medizin.uni-greifswald.de/transfus/fileadmin/user_upload/doku_thrombo_gerinnung/anleitung_hipa.pdf 30.12.2016, um 12:33 Uhr
- [20] Standard Operating Procedure-HIPA-Test. SOP-Nr. TZ2, Version:1.0
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Abteilung Transfusionsmedizin
- [21] Anleitung HIPA-Test, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Abteilung Transfusionsmedizin
- [22] Rabie Jouni, Heike Zöllner, Ahmad Khadour, Jan Wesche; Anne Grotevendt, Sven Brandt, Mihaela Delcea, Krystin Krauel, Hansjörg Schwertz, Ulrich J. Sachs, Andreas Greinacher, Tamam Bakchoul. Partially desulfated heparin modulates

the interaction between anti-protamine/heparin antibodies and platelets: 115.2/2016

6.2 Lebenslauf

Mandy Berner

geboren am 24.07.1992 in Quedlinburg

Schulbildung

1999-2003 Grundschule Hoym
2003-2005 Gymnasium Ascaneum Aschersleben
2005-2011 Gymnasium Stephaneum Aschersleben mit Abschluss der
 Hochschulreife

Berufsausbildung

10/2011-09/2012 angefangene Berufsausbildung zur Rettungsassistentin in Halle/Saale

Hochschulausbildung

10/2012-06/2019 Studium der Humanmedizin an der Universität Greifswald
09/2014 1. Staatsexamen
04/2018 2. Staatsexamen
06 /2019 3. Staatsexamen
Seit Juni 2015 Dissertation in der Transfusionsmedizin bei Prof. Dr. med. Andreas
 Greinacher:
 *„Der Einfluss eines niedrig-sulfatierten 12mer-Heparins auf die Antigen/
 Antikörper-Interaktion bei der Bildung von PF4/Heparin-Antikörper“*

Praktisches Jahr

05/2018-04/2019 Krankenhaus Dresden Friedrichstadt: Chirurgie, Innere Medizin
 Universitätsklinikum Dresden: Rechtsmedizin

05/2019 Approbation als Arzt

6.3 Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. Andreas Greinacher für die Vergabe des interessanten und anspruchsvollen Themas und seine wissenschaftliche, methodische und finanzielle Unterstützung während des gesamten Zeitraums meiner experimentellen Doktorarbeit.

Mein Dank gilt weiterhin besonders Frau Prof. Dr. Mihaela Delcea, ohne die die Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Sie hat mich während der Bearbeitungsphase durch fachliche Gespräche, Diskussionen, Ratschläge, anhaltende Hilfestellung und finanziell betreut und unterstützt.

Frau Ina Buchholz, die ebenfalls am ZIKE HIKE ihre Promotion tätigt, danke ich recht herzlich für die Unterstützung bei der Dekonvolution der kompletten CD-Experimente.

Bei Frau Ulrike Strobel möchte ich mich für die Hilfe bezüglich der Generation der ELISA- und HIPA-Daten bedanken.

Herrn Jan Wesche danke ich vielmals für die Hilfe bei der Auswertung und Aufarbeitung meiner Arbeit.

Auch allen anderen Mitarbeitern des ZIK HIKE und der Abteilung Transfusionsmedizin der Universität Greifswald bin ich sehr dankbar für die gute und zahlreiche Zusammenarbeit. Besonders möchte ich mich an dieser Stelle auch bei meiner Familie und bei meinen Freunden bedanken, die mich während des gesamten Studiums begleitet und unterstützt haben.

Ohne deren Mithilfe aller wäre die Anfertigung dieser Promotionsarbeit nicht möglich gewesen.