

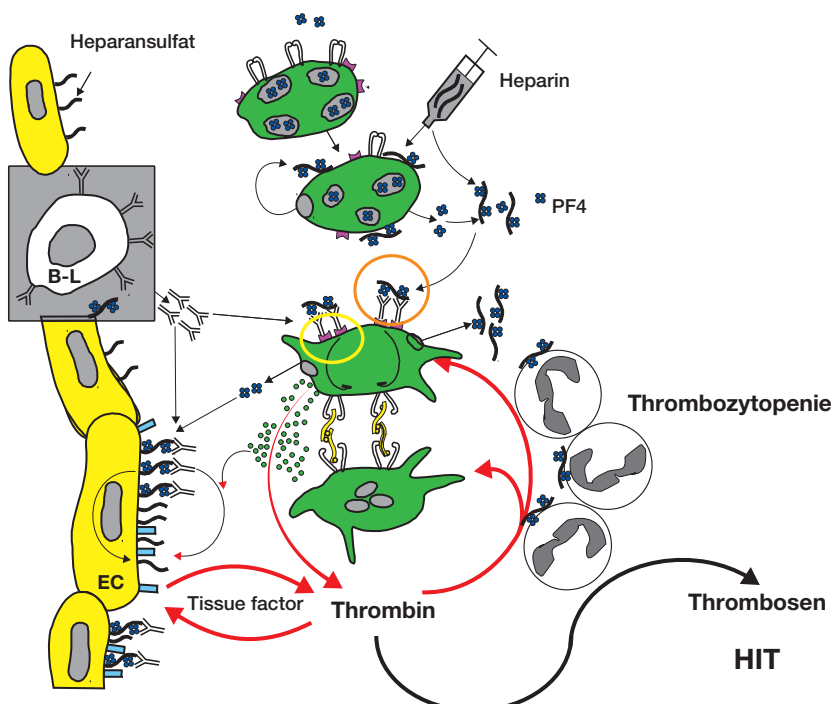
# Heparin-induzierte Thrombozytopenie: von der bakteriellen Abwehr zu einem neuen Mechanismus der Autoimmunität.

## Zusammenfassung

Die Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) ist eine unerwünschte Arzneimittelwirkung, bei der das endogene Chemokin Plättchenfaktor 4 (PF4) an Polyanionen bindet, dabei seine Konformation verändert und eine Immunreaktion auslöst. Die Immunreaktion gegen PF4/Polyanionen-Komplexe führt zu einem ganzen Spektrum von Antikörpern mit unterschiedlicher biologischer Relevanz. Die meisten Antikörper lassen sich in einem Enzym Immunoassay nachweisen, führen aber weder zur Thrombozytenaktivierung noch zu klinischen Problemen. Eine deutlich seltener auftretende Subgruppe dieser Antikörper aktiviert Thrombozyten und kann klinisch die vermehrte Produktion von Thrombin induzieren über eine Aktivierung von Thrombozyten, Monozyten und Endothelzellen. Noch viel seltener sind Anti-PF4/Polyanionen-Antikörper, die als Autoantikörper auftreten und ohne Zugabe von Heparin oder anderen Polyanionen schwere klinische Komplikationen auslösen können. Der vorliegende Beitrag fasst die immunologischen und biophysikalischen Experimente zusammen, mit denen die molekularen Mechanismen aufgeklärt wurden, wie es dazu kommen kann, dass ein endogenes (körpereigenes) Protein Antikörper induziert und welche Charakteristika diese Antikörper haben, wenn sie zu einer Autoimmunerkrankung führen. Es ist wahrscheinlich, dass ähnliche Mechanismen auch für Autoimmunreaktionen gegen andere Proteine des Körpers verantwortlich sind.

## Summary

Heparin-induced thrombocytopenia (aHIT) is an adverse drug effect. The endogenous chemokine platelet factor 4 (PF4) binds to polyanions. Hereby PF4 is changing its conformation and triggers an immune reaction. The immune reaction against PF4/polyanion complexes results in a large spectrum of antibodies with variable biological relevance. Most of these antibodies are reactive in enzyme immunoassays but do not cause platelet activation and no clinical complications. About 20 to 50 % of these antibodies activate platelets in vitro in the presence of heparin. In vivo, these antibodies together with heparin cause activation of platelets, monocytes and endothelial cells. This results in increased generation of thrombin and an increased risk for thrombotic complications. Much rarer are anti-PF4/polyanion antibodies, which react as autoantibodies and activate platelets and induce thrombotic complications without addition of heparin or other polyanions. They are causing autoimmune HIT. This review summarizes the immunological and biophysical experiments used to unravel the molecular mechanisms of autoimmune HIT. It shows how an endogenous (body's own) protein can induce antibodies and describes the characteristics of these antibodies required for induction of an autoimmune disease. It is highly likely that similar mechanisms are also responsible for other antibody mediated autoimmune diseases.



## EINLEITUNG

Die Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) ist eine mittlerweile sehr bekannte unerwünschte Arzneimittelwirkung der Therapie mit stark negativ geladenen Medikamenten. Heparin ist dabei das am häufigsten involvierte Medikament.<sup>1</sup> Heparin formt Komplexe mit dem positiv geladenen Chemokin Plättchenfaktor 4 (PF4). Dies induziert eine Immunantwort. IgG-Antikörper gegen PF4/Heparinkomplexe führen zur Aktivierung von Thrombozyten und Monozyten über den FcγR1a Rezeptor. Dies erhöht die Thrombin-Generierung und das Risiko für neue thromboembolische Komplikationen (**Abbildung 1**). Wird die HIT nicht erkannt, beträgt die Letalität ca. 20–30 %.

Abbildung 1: Pathomechanismus der Heparin-induzierten Thrombozytopenie (modifiziert nach<sup>2</sup>)

Risikofaktoren für die Entwicklung einer HIT sind die Gabe von unfraktioniertem Heparin und große Operationen, insbesondere an der Herz-Lungen-Maschine. Daneben gibt es genetische Dispositionen. Frauen haben ein etwas höheres Risiko als Männer und einige Polymorphismen in den Genen des FcR1a und an seiner Signalkonstruktion beteiligte Proteine erhöhen das Risiko ebenfalls.

Für die Diagnostik stehen Antikörpertests zur Verfügung, die die Bindung von IgG-Antikörpern an PF4/Heparinkomplexe messen und funktionelle Tests, die die Thrombozytenaktivierung durch die Antikörper messen. Der gegenwärtige Standard der Diagnostik und Behandlung der HIT und die aktuellen Empfehlungen sind zusammengefasst in den Ende 2018 erschienenen *Guidelines der American Society Hematology*<sup>3</sup> (open online). Mittlerweile stehen mehrere Medikamente zur alternativen Antikoagulation bei Patienten mit HIT zur Verfügung. Dieses sind vor allem Danaparoid und Argatroban, aber auch Bivalirudin, Fondaparinux und die direkten oralen Antikoagulantien werden mit Erfolg eingesetzt.

### Autoimmun HIT

Die HIT ist wahrscheinlich eine fehlgeleitete Abwehrreaktion gegen Bakterien. PF4 bindet auch an negativ geladene Oberflächenstrukturen auf Bakterien. Dies führt zur gleichen Immunreaktion wie die Bindung von PF4 an Heparin. Dies erklärt, warum in seltenen Fällen Infektionen eine HIT auslösen können, auch ohne dass Heparin gegeben wurde. Diese seltenen Verläufe werden als autoimmun HIT bezeichnet.<sup>4-6</sup> Die autoimmun HIT kann auch durch Heparin ausgelöst werden. Im Gegensatz zur Heparin-abhängigen HIT, besteht das Krankheitsbild auch nach Absetzen des Heparins weiter. Ein weiterer Trigger sind große Operationen, insbesondere Knieendoprothesen-Operationen. In diesen Fällen wird durch die Blutleere viel negativ geladene RNA freigesetzt, welche ebenfalls mit PF4 Komplexe bildet.<sup>7</sup> Die Behandlung von Patienten mit autoimmun HIT ist schwierig, weil der prothrombotische Zustand über Wochen bis Monate persistieren kann.

### Die Heparin-induzierte Thrombozytopenie als Modell für das bessere Verständnis von humanen Immunreaktionen

Die HIT unterscheidet sich von klassischen Antikörperreaktionen. Üblicherweise werden beim Erstkontakt mit einem Antigen IgM-Antikörper gebildet und erst nach dem Zweitkontakt hochtitrige IgG-Antikörper. Ein typisches Beispiel ist die Immunisierung gegen das Rhesus-D bei Rhesus inkompatibler Transfusion. Hier werden IgG Anti-D Antikörper oft erst nach vier bis sechs Wochen gebildet. Bei der HIT sind jedoch IgG-, IgM- und IgA-Antikörper ab Tag fünf nach Antigen Exposition nachweisbar und ab Tag elf sind Anti PF4/Heparin-Antikörper bei allen Patienten, die die Reaktion zeigen, nachweisbar<sup>8</sup> (Abbildung 2).

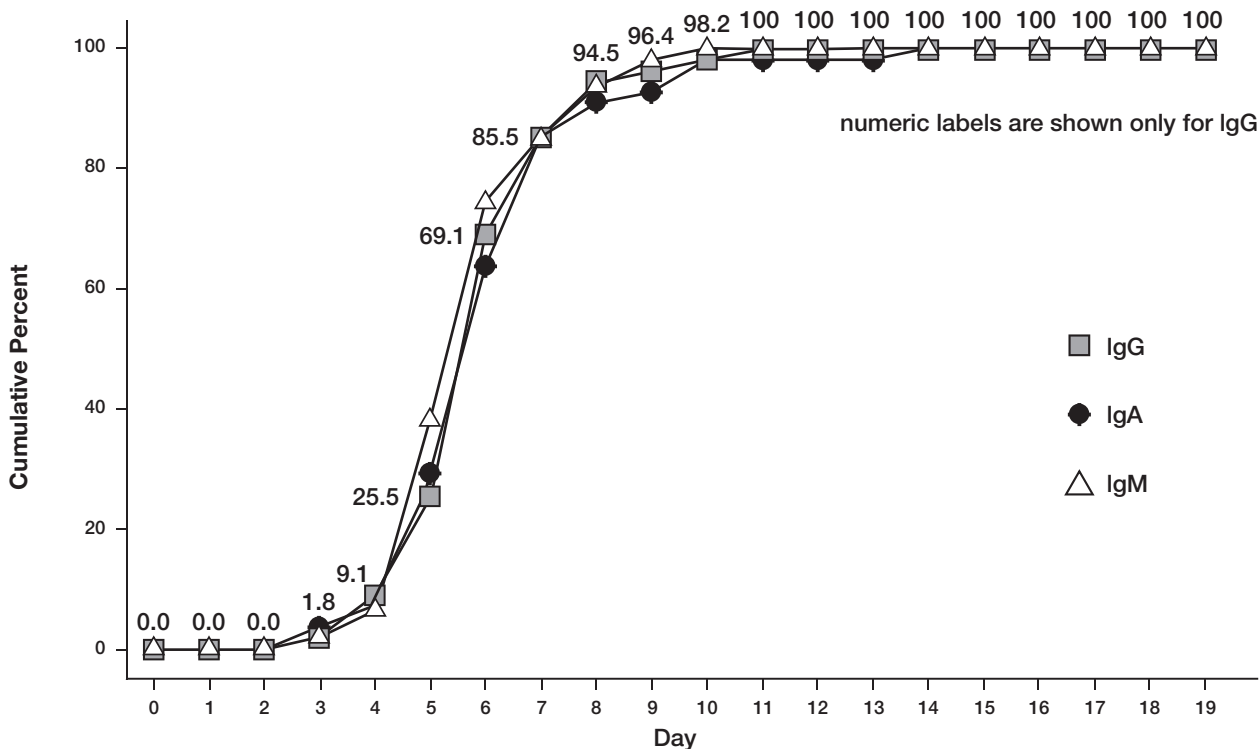
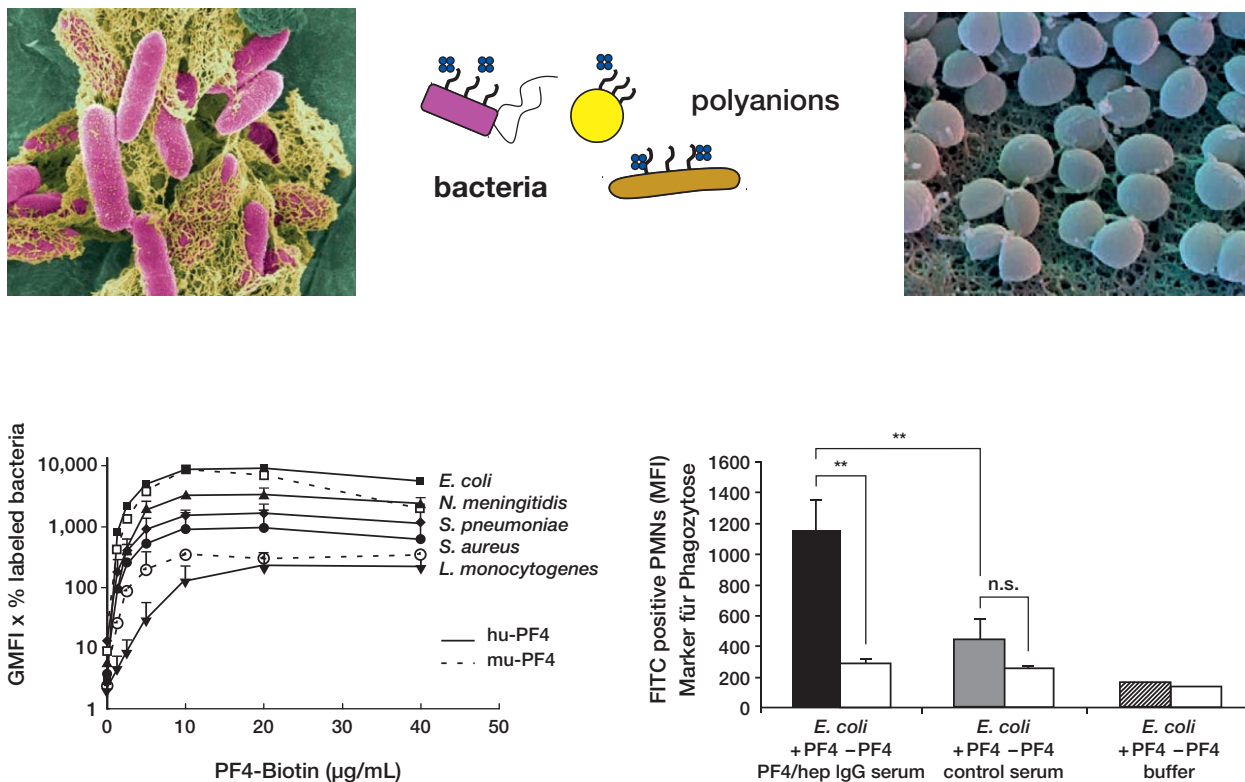


Abbildung 2: Bei der Heparin-induzierten Thrombozytopenie entwickeln die Patienten IgM-, IgG- und IgA-Antikörper zwischen Tag vier und Tag zehn (entnommen aus<sup>8</sup>).

Auch klinisch tritt die HIT bei den meisten Patienten zwischen Tag fünf und Tag 14 auf, unabhängig davon, ob der Patient bereits früher schon einmal Heparin erhalten hat oder nicht. Dies ist das gleiche Zeitfenster, in dem auch verzögerte hämolytische Transfusionsreaktionen auftreten. Die Bildung von hochtitrigem IgG zwischen Tag fünf und Tag zwölf nach Antigenexposition ist das typische Zeitfenster für eine sekundäre Immunreaktion. Die HIT ist immer eine sekundäre Immunreaktion.<sup>9</sup> Bei der Suche nach dem primär immunisierenden Stimulus haben wir gefunden, dass PF4 auch an Bakterien bindet. Die Bindung erfolgt sowohl an Gram-negative als auch an Gram-positive Bakterien. Werden diese Bakterien mit PF4 und HIT-Antikörpern inkubiert, werden sie von Leukozyten viel effizienter phagozytiert (**Abbildung 3**).



**Abbildung 3:** PF4 bindet an Bakterien und PF4/H-Antikörper verstärken deren Phagozytose (modifiziert nach<sup>10</sup>)

Die Immunreaktion gegen PF4/Polyanionen-Komplexe ist wahrscheinlich ein evolutionär alter Mechanismus der bakteriellen Immunabwehr. Wenn Mäuse, die für die ersten sechs Lebenswochen unter reinen Bedingungen gehalten werden, mit Bakterien infiziert werden, bilden sie PF4/Heparin-Antikörper.

Darüber hinaus können Thrombozyten *E. coli* Bakterien direkt abtöten. Dieser Mechanismus wird durch HIT-Antikörper deutlich verstärkt. Werden Bakterien zusammen mit PF4- und HIT-Antikörpern inkubiert, ist das Wachstum der Bakterien stark gehemmt<sup>11</sup> (**Abbildung 4**).

Die HIT ist am ehesten ein fehlgeleiteter bakterieller Abwehrmechanismus. Unter der Heparin-Therapie bindet Heparin an die Thrombozyten, damit exprimieren die Thrombozyten Polyanionen auf der Oberfläche wie Bakterien. An diese Polyanionen bindet PF4. Daran binden die Antikörper und da Thrombozyten Fc-Rezeptoren besitzen, werden Thrombozyten aktiviert und das Bild der prothrombotischen Gerinnungsentgleisung mit Thrombozytopenie und erhöhtem Risiko für Thrombosen entsteht (**Abbildung 5**).

Zwischen Tag fünf und Tag zehn nach großen Operationen, wie Operationen unter Verwendung der Herz-Lungen-Maschine, lassen sich bei bis zu 65 % der Patienten Anti-PF4/Heparin-Antikörper nachweisen. Damit muss die primäre Immunisierung gegen PF4/Heparin-Komplexe durch eine sehr häufige bakterielle Infektionserkrankung ausgelöst sein.

## Thrombozyten töten *E. coli* mit Hilfe von PF4 und anti-PF4/H IgG

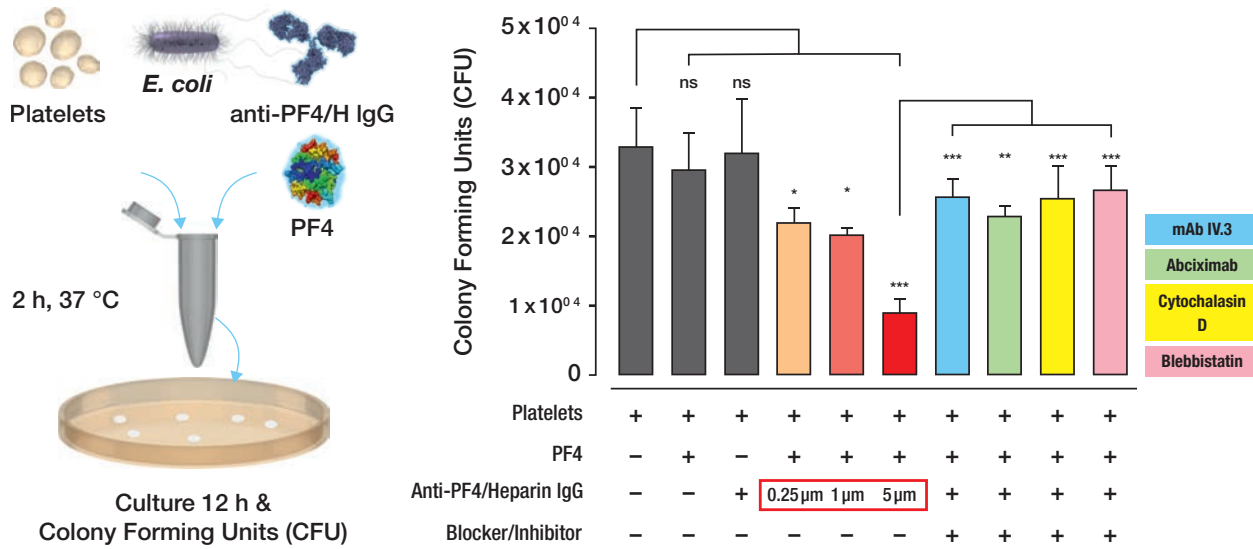


Abbildung 4: Werden *E. coli* Bakterien zusammen mit PF4, Thrombozyten und HIT-Antikörpern inkubiert, werden die Bakterien abgetötet. Dieser Mechanismus ist abhängig vom Fc-Rezeptor der Thrombozyten und von einem funktionierenden Zytoskelett der Thrombozyten (modifiziert nach<sup>11</sup>).

## HIT ist ein fehlgeleiteter Abwehrmechanismus

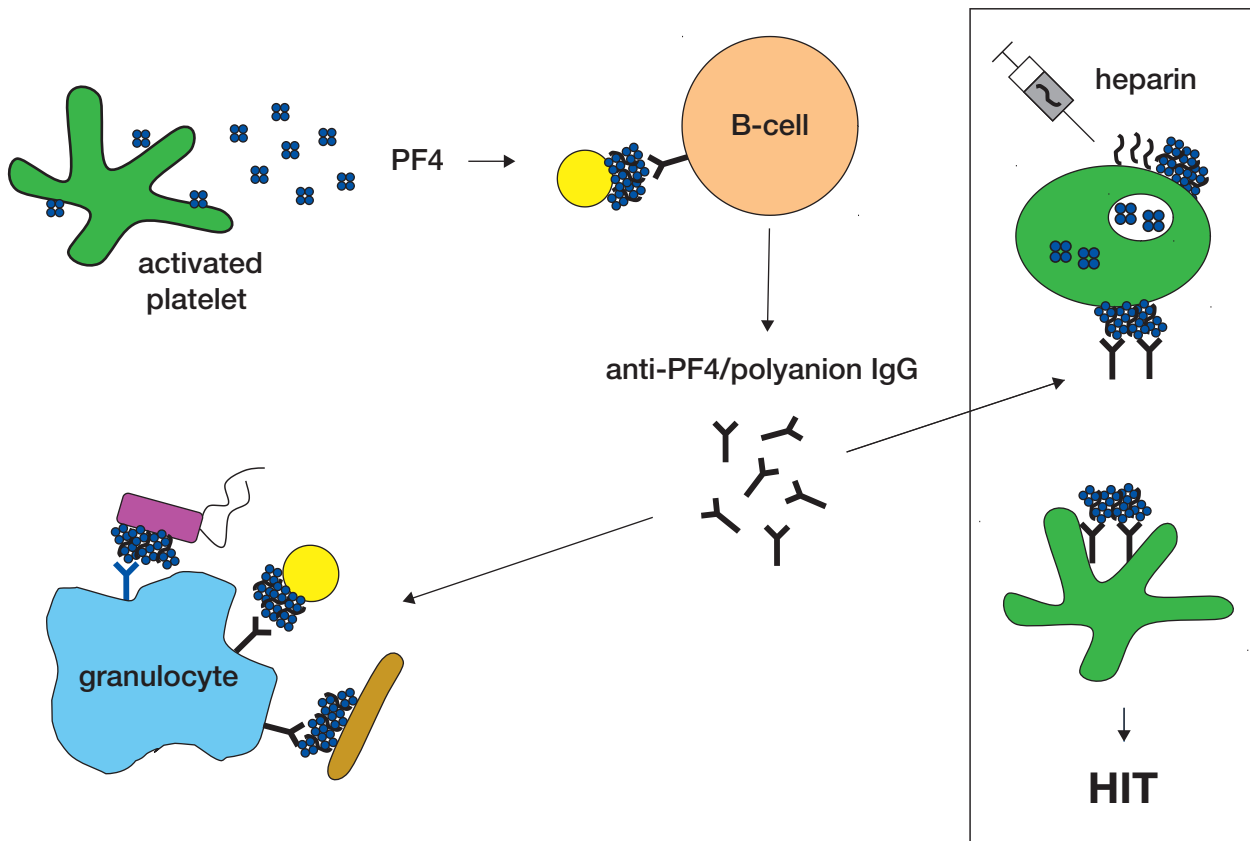
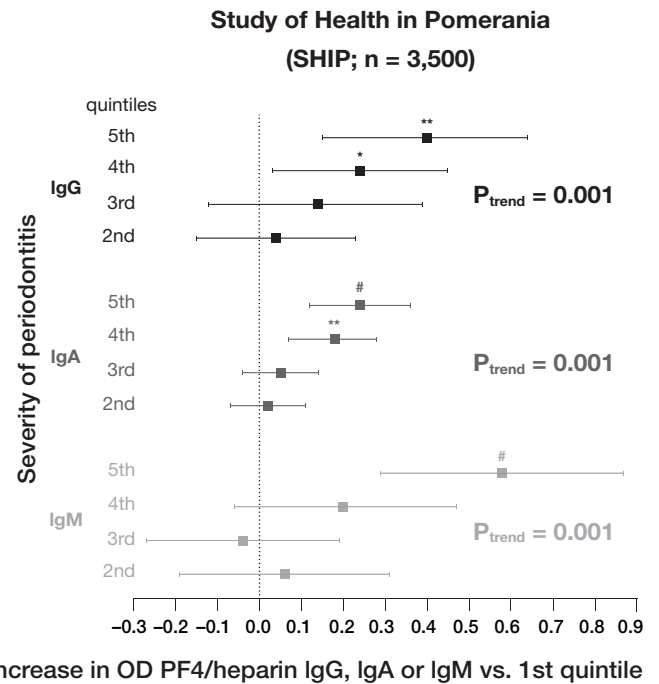
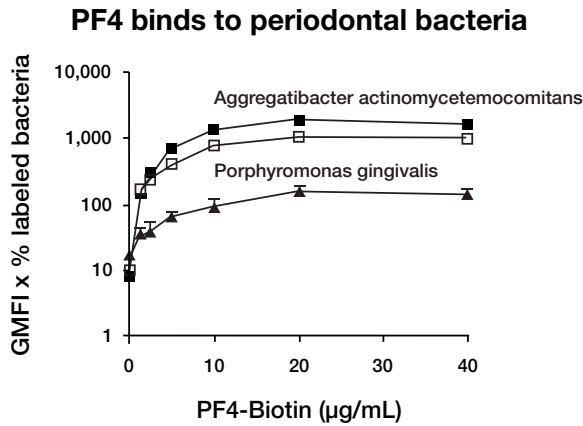
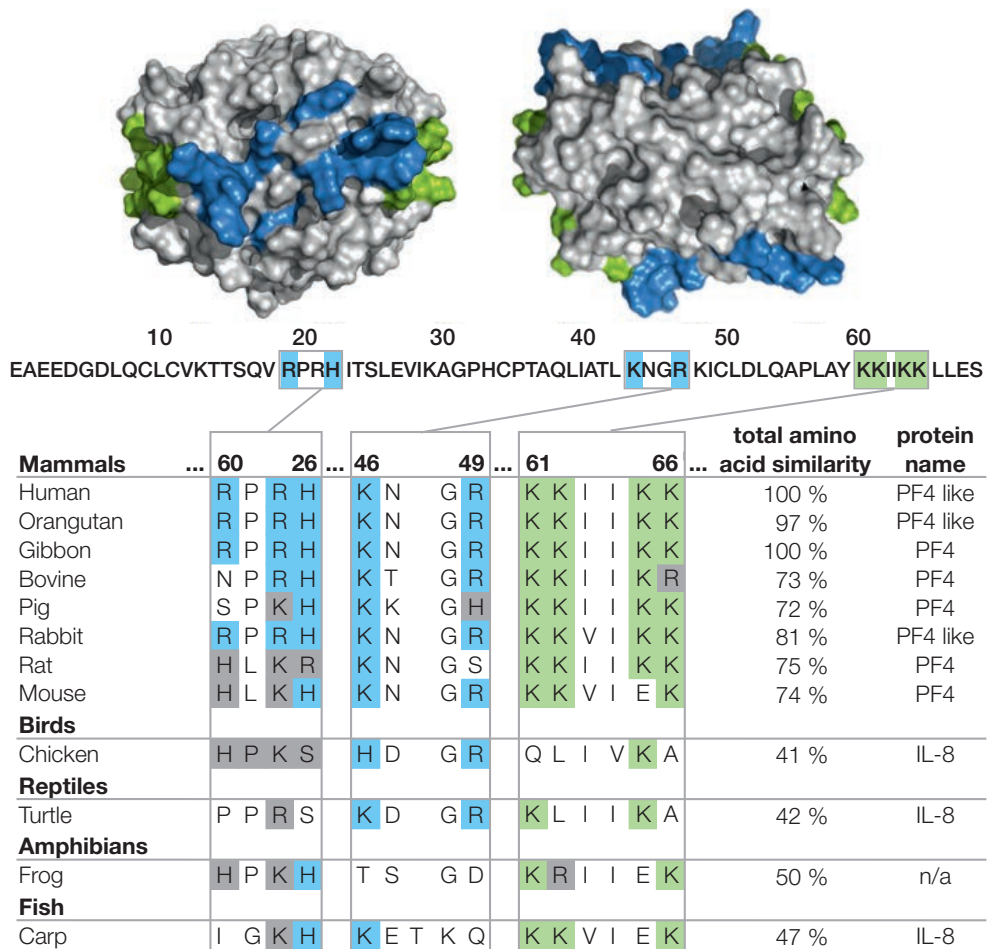


Abbildung 5: Die HIT ist ein fehlgeleiteter bakterieller Abwehrmechanismus (modifiziert nach<sup>12</sup>).

# Parodontitis induziert PF4/Heparin-Antikörper



**Abbildung 6:** Bei Menschen mit chronischen Infektionen wie einer Parodontitis finden sich auch ohne Heparin-Behandlung Anti-PF4/Heparin-Antikörper. Die an der Parodontitis beteiligten Bakterien binden PF4. Durch die aufgrund der Entzündung gestörten GefäÙe gelangen Bakterien die mit PF4 beladen sind in Kontakt mit Immunzellen (modifiziert nach<sup>13</sup>).



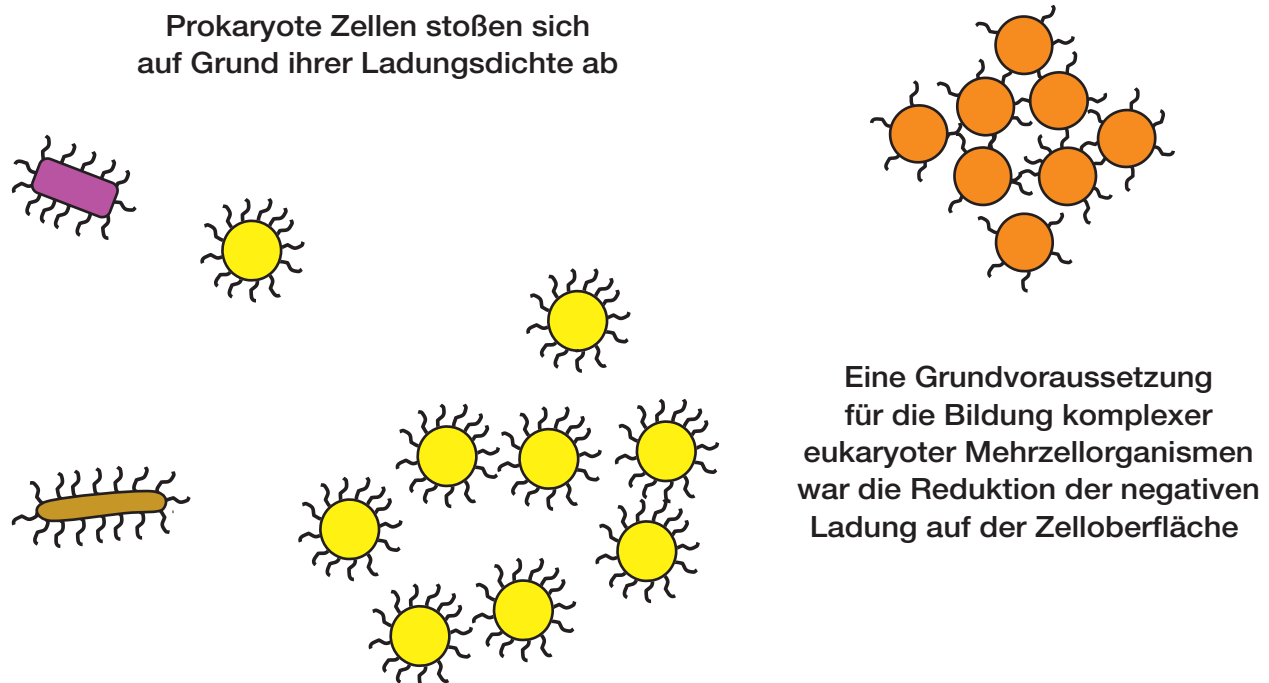
**Abbildung 7:** PF4 ist ein in der Evolution stark konserviertes Chemokin (entnommen aus<sup>14</sup>).

Chronische bakterielle Entzündungen, wie die Parodontitis sind hierfür wahrscheinlich eine Ursache. In der Normalbevölkerung ist die Ausprägung von Parodontitis eng assoziiert mit dem Vorhandensein von PF4/Heparin-Antikörpern im Serum dieser Patienten, ohne dass diese Heparin erhalten haben<sup>13</sup> (**Abbildung 6**).

Der bakterielle Abwehrmechanismus über PF4/Polyanion-Antikörper ist wahrscheinlich ein evolutionär sehr alter Abwehrmechanismus. PF4 ist ein Chemokin, welches in der Evolution konserviert ist<sup>14</sup> (**Abbildung 7**).

### Negative Ladung als Warnsignal

Im Vergleich zu eukaryonten Zellen sind Bakterien auf ihrer Oberfläche sehr stark negativ geladen. Dies ist aus der Evolution gut zu erklären. Negativ geladene Partikel stoßen sich ab. Durch eine ausreichende Ladungsdichte auf ihrer Oberfläche waren Bakterien so davor geschützt, von anderen Bakterien gefressen zu werden, weil bei der Annäherung eine Abstoßung zwischen den beiden Bakterien erfolgte. Hierzu musste keine Energie aufgewendet werden. Die starke negative Ladung ist jedoch ein Hindernis größere Zellverbände zu bilden. Damit muss es eine Grundvoraussetzung für die Bildung komplexer Organismen gewesen sein, dass diese auf ihrer Zelloberfläche einen Teil der negativen Ladung verloren haben. Folgt man diesen Überlegungen, ist eine stark ausgeprägte negative Ladung ein Charakteristikum für prokaryote Zellen (**Abbildung 8**).



**Abbildung 8:** Bakterien sind auf ihrer Oberfläche stark negativ geladen. Eukaryote Zellen tragen wesentlich weniger negative Ladungen auf ihrer Oberfläche, wodurch sie leichter Zellverbände bilden können.

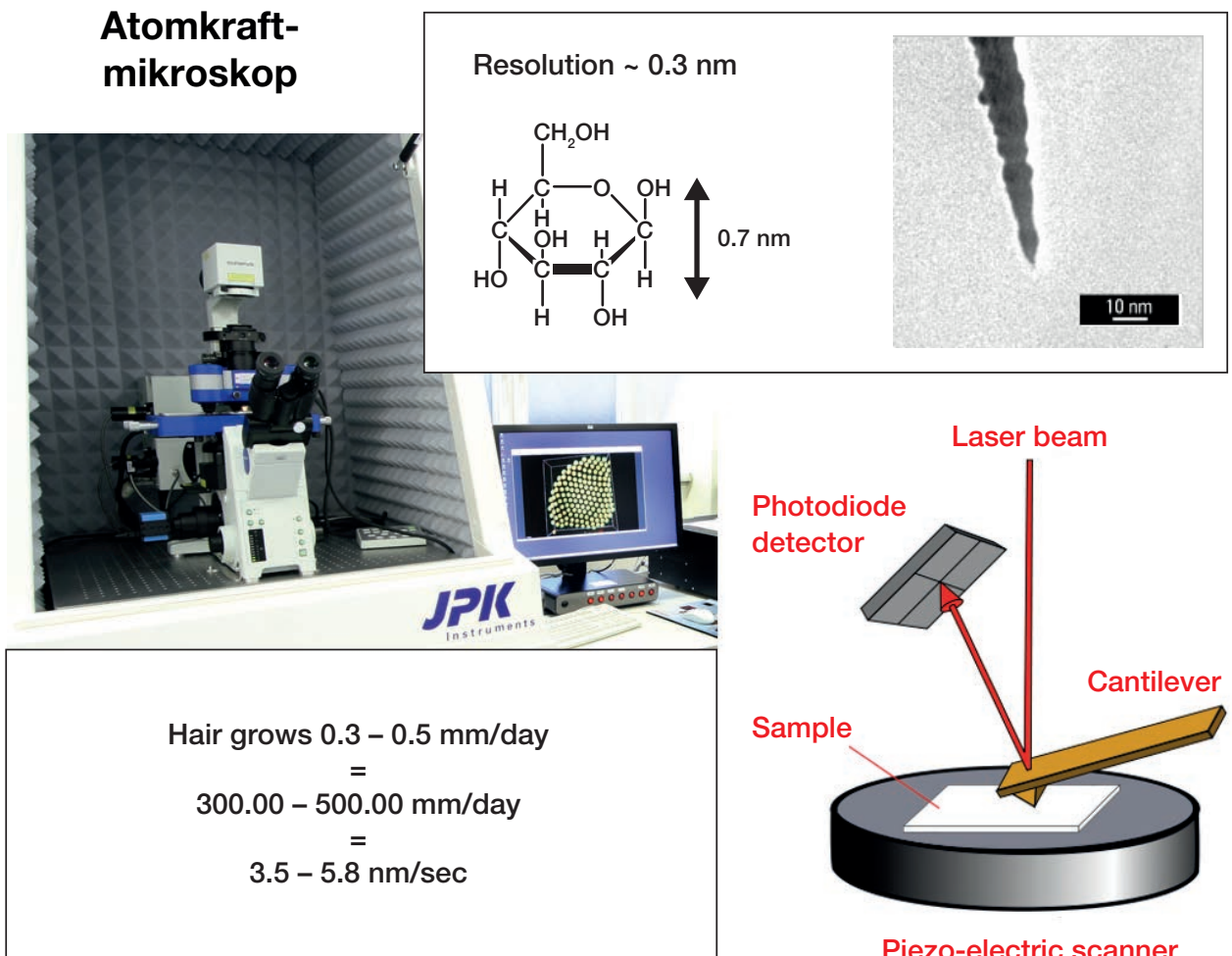
Dies erklärt, warum starke negative Ladungen Aktivatoren des angeborenen Immunsystems sind. Das Komplementsystem wird durch starke negative Ladungen aktiviert, das Kontaktphasensystem, das Kininogen-Bradykin-System, und einige Toll-like-Rezeptoren, ebenso wie Granulozyten. Das erworbene Immunsystem kann jedoch negative Ladungen nicht erkennen. B-Zellrezeptoren und T-Zellrezeptoren erkennen Strukturen aber keine Ladungen. Wir haben im Folgenden die Hypothese verfolgt, dass PF4 Ladung in Struktur „übersetzt“, in dem es nach Bindung an starke negative Ladungen seine Konformation ändert.

### Die Heparin-induzierte Thrombozytopenie als Modell für das Verständnis von Autoimmunerkrankungen

Die HIT ist ein Modell, welches es erlaubt, Immunreaktionen des Menschen besser zu untersuchen. Die typische HIT ist dabei eine Immunreaktion gegen ein Fremdantigen. Die autoimmun HIT entspricht einer Fehlsteuerung dieser Immunreaktion die zur Autoimmunität führt.

Wir haben die HIT als Modell genutzt, um mithilfe der Biophysik besser zu verstehen, wie ein endogenes Protein, in diesem Fall PF4, immunogen werden kann.

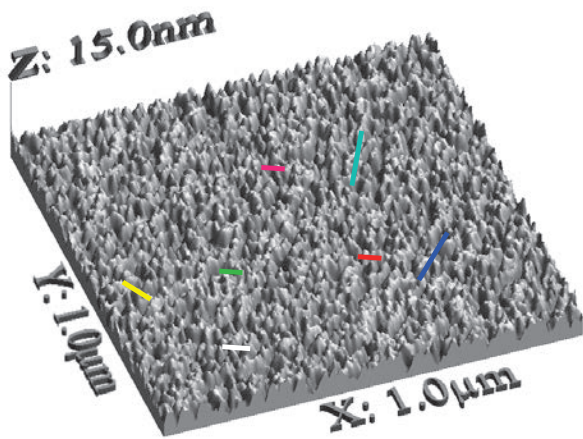
**Biophysikalische Untersuchungen führen zum besseren Verständnis der Pathophysiologie der HIT**  
 Zunächst haben wir die Struktur von PF4 mit der Atomkraftmikroskopie untersucht.<sup>15</sup> Das Atomkraftmikroskop misst die Ablenkung einer sehr feinen Spitze auf einer Oberfläche. Die Auflösung beträgt bis zu 0,3 nm. Dies entspricht dem halben Durchmesser eines Glukosering. Das menschliche Haar wächst ca. 0,3–0,5 mm pro Tag. Dies entspricht 3,5–5,8 nm/s. Damit kann das Atomkraftmikroskop messen um wie viel ein Haar innerhalb einer Zehntelsekunde wächst (**Abbildung 9**).



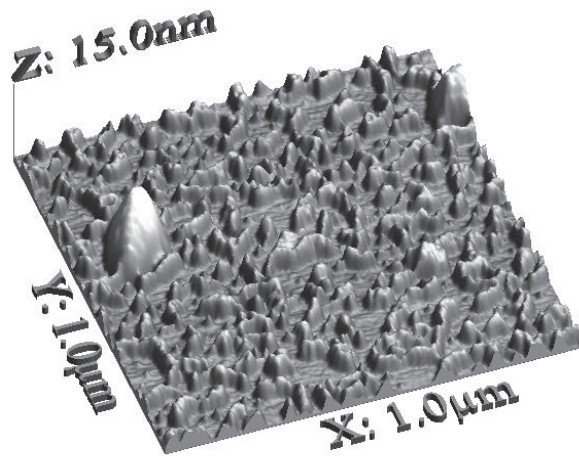
**Abbildung 9:** Das Atomkraftmikroskop misst die Ablenkung einer sehr feinen Spitze auf einer Oberfläche. Das Signal wird über einen Laserstrahl aufgenommen. Die Auflösung beträgt bis zu 0,3 nm. Ein Glukosering hat einen Durchmesser von 0,7 nm.

Wir haben mit dieser Methode einzelne PF4-Moleküle (**Abbildung 10**) oder PF4/Heparin-Komplexe untersucht. In den PF4/Heparin-Komplexen haben sich die einzelnen PF4-Moleküle entlang der Heparinkette wie Perlen einer Perlenkette aufgereiht.

Die nachfolgende Abbildung zeigt das Querschnittsprofil einzelner PF4-Moleküle. Einzelne PF4-Moleküle haben exakt die gleiche Höhe (**Abbildung 11** links). Wenn wir ein Längsprofil über einzelne PF4-Moleküle mit den Querprofilen verglichen haben, passten diese genau ineinander (**Abbildung 11** rechts oben). Haben wir hierfür die Längsprofile von PF4/Heparin-Komplexen genutzt, war deren Höhe niedriger als die Profile einzelner PF4-Moleküle (**Abbildung 11** rechts unten). Die Spitzen der Einzelprofile ragen über die Linie des Längsprofils hinaus. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass PF4 im Komplex mit Heparin seine Konformation ändert.

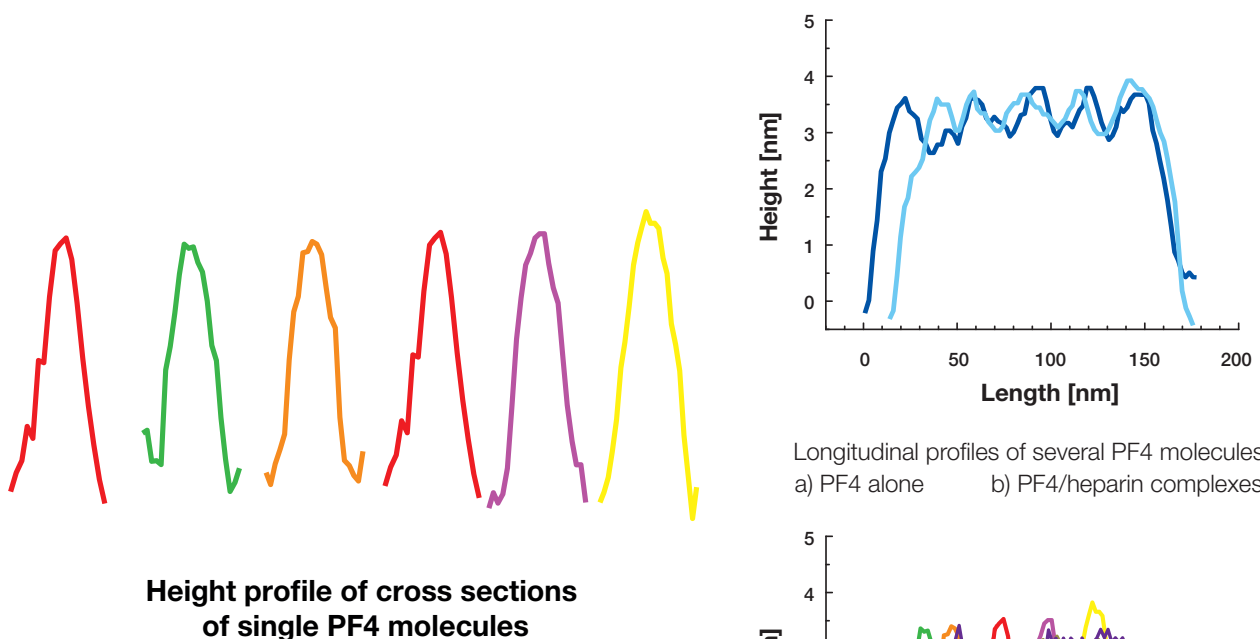


PF4



PF4/Heparin-Komplexe

**Abbildung 10:** Wenn auf einer sehr glatten Oberfläche (Mica/Glimmer) einzelne Moleküle aufgetragen werden, können diese durch das Atomkraftmikroskop vermessen werden. Die obere linke Abbildung zeigt einzelne PF4-Moleküle, die untere rechte Abbildung zeigt Komplex aus Heparin und PF4, bei denen sich PF4-Moleküle entlang des Heparinmoleküls aufgereiht haben. Die Linien zeigen die Messlinien für die Bestimmung von Molekülprofilen, die in Abbildung 11 dargestellt sind (modifiziert nach<sup>15</sup>).



Height profile of cross sections of single PF4 molecules

Longitudinal profiles of several PF4 molecules  
 a) PF4 alone      b) PF4/heparin complexes

**Abbildung 11:** Die Höhenprofile einzelner PF4-Moleküle passen in die Längsprofile, die von einzelnen PF4-Molekülen erhoben wurden. Sie passen aber nicht mehr in die Längsprofile von PF4/Heparin-Komplexen. Dies ist ein deutlicher Hinweis, dass PF4 im Komplex mit Heparin seine Struktur verändert (modifiziert nach<sup>15</sup>).



# Circular Dichroism (CD) Spectroscopy von PF4 und PF4/Heparin-Komplexen

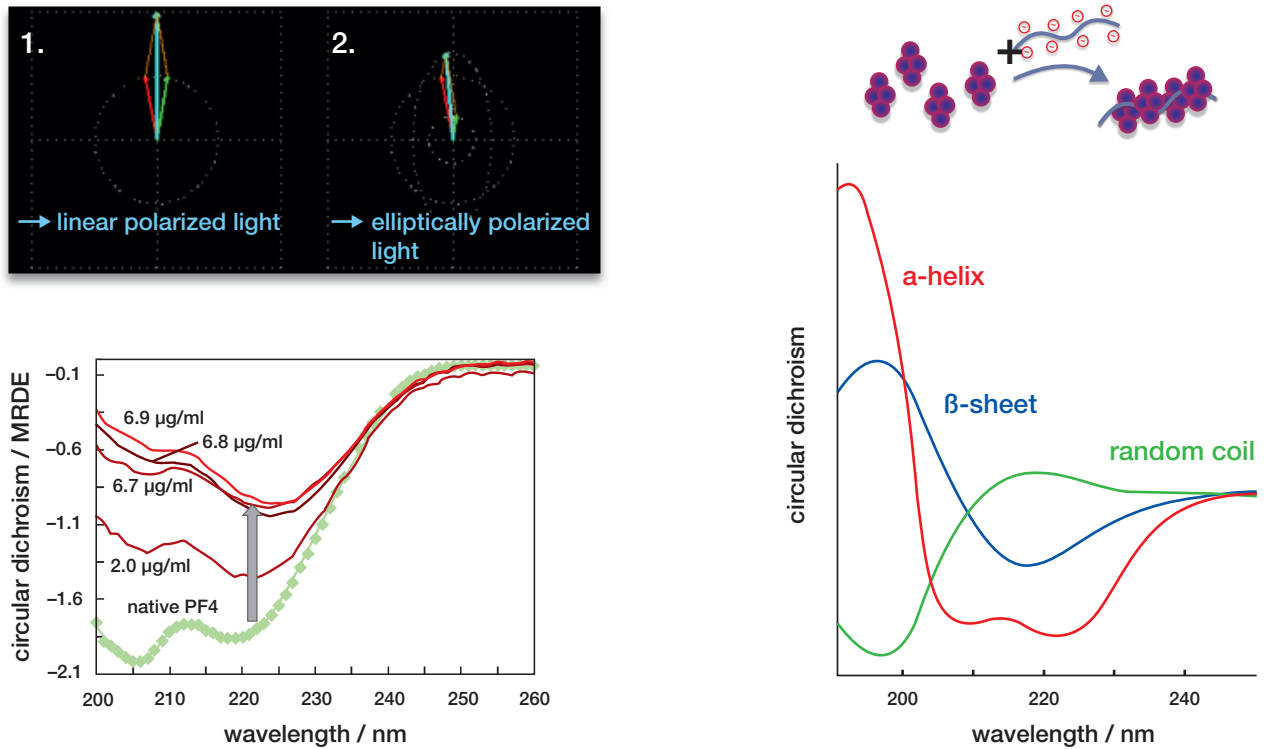


Abbildung 12: In der Circular Dichroism (CD)-Spektroskopie werden Moleküle in polarisiertem Licht untersucht. Das resultierende Spektrum zeigt den Anteil an Alpha Helices, antiparallelen Beta Sheets und Random Coils (modifiziert nach<sup>16</sup>). Die Zugabe von Heparin verändert die Struktur von PF4.

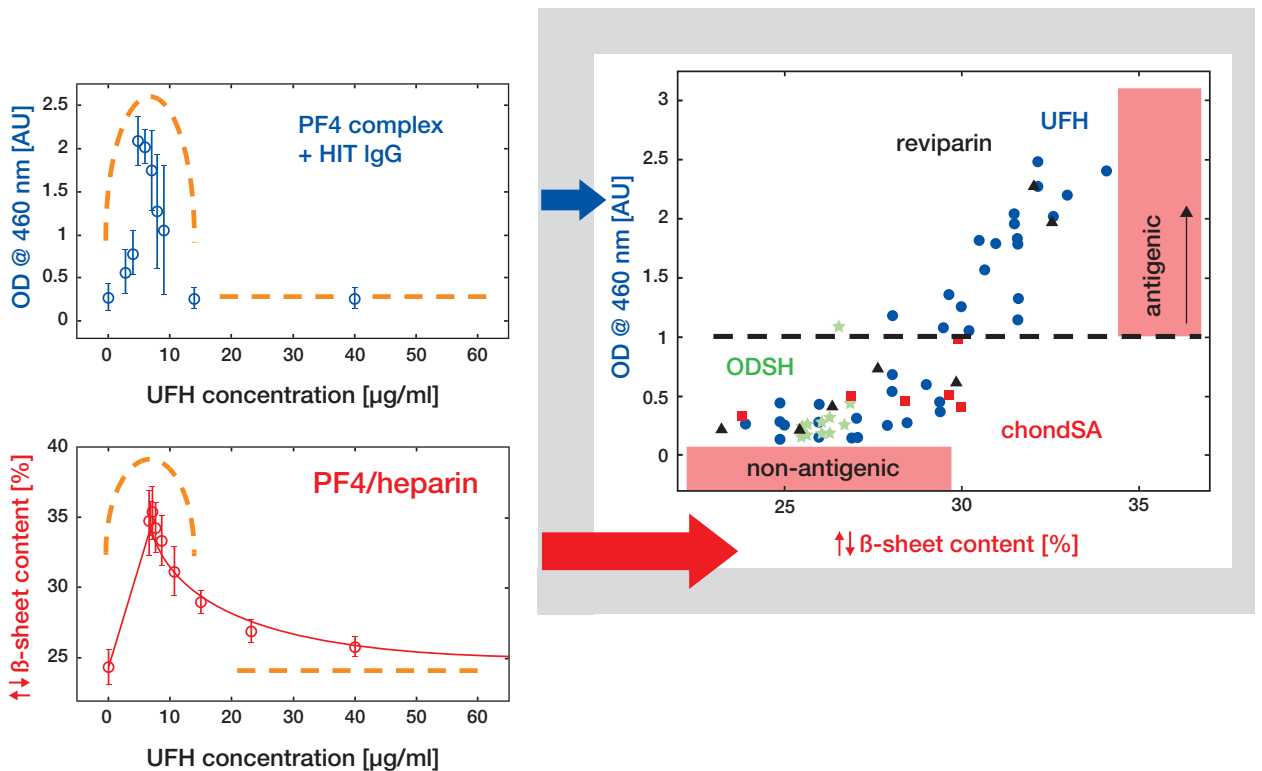


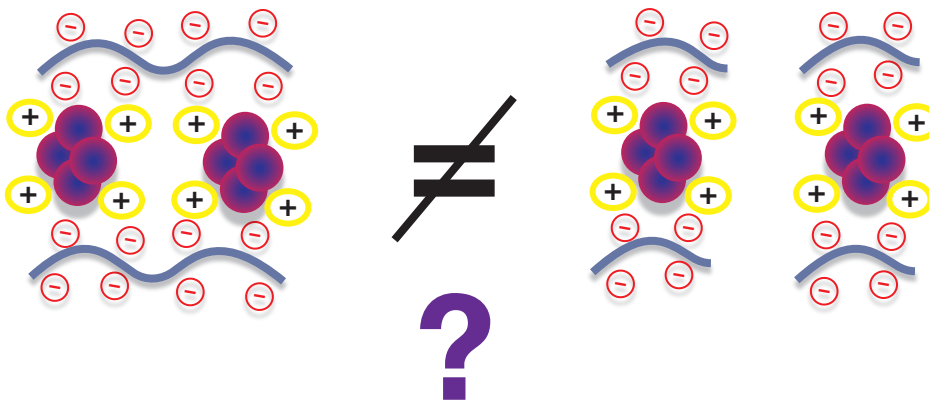
Abbildung 13: Das Risiko eines negativ geladenen Medikamentes mit PF4 zu komplexieren und dort eine Konformationsänderung auszulösen, die immunogen ist, kann aufgrund der starken Ähnlichkeit der Ergebnisse im Antikörper-Test und der CD-Spektroskopie gut mit biophysikalischen Methoden abgeschätzt werden. Dies ist das erste Beispiel für eine hochsensitive in vitro-Testmöglichkeit um die mögliche Immunogenität eines Arzneimittels abzuschätzen (modifiziert nach<sup>16, 17</sup>).

Diese Änderungen der Struktur lassen sich in der CD-Spektroskopie quantitativ bestimmen. Bei dieser Untersuchung werden Moleküle in polarisiertem Licht untersucht. Die Zugabe von Heparin zu PF4 führt zu einer deutlichen Verschiebung der Absorptionsspektren, die vor allen Dingen auf eine Zunahme von antiparallelen Beta Sheets zurückzuführen ist (**Abbildung 12**). Damit ist der Beweis erbracht, dass PF4 seine Konformation ändert, wenn es mit Heparin Komplexe bildet.

Wenn man nun die Veränderungen der Struktur in PF4 und die Bindung von PF4/Antikörpern an die so geformten Komplexe misst, zeigt sich eine Übereinstimmung der Kurven (**Abbildung 13**). Durch die starke Korrelation der Antikörperbindungsteste mit den Messergebnissen der CD-Spektroskopie ergibt sich das erste Mal die Möglichkeit, mit biophysikalischen Methoden das Immunogenitätsrisiko eines Medikamentes abzuschätzen.

Jede chemische Reaktion setzt Energie frei oder verbraucht Energie. Die Freisetzung von Energie lässt sich mit der Isothermalen Titrations-Kalometrie messen. Hierbei zeigen sich große Unterschiede in der freigesetzten Energie, je nachdem ob PF4 mit einem kurzkettingen Heparin oder mit einem langkettigen Heparin inkubiert wurde<sup>18</sup> (**Abbildung 14**). Da die Interaktion von PF4 und Heparin ladungsabhängig ist, war nicht verständlich, warum die Zugabe von vielen kurzkettingen Heparinen nicht die gleiche Energie freisetzen sollte wie die Zugabe von wenigen langtätigen Heparinen, da in beiden Fällen die gleiche Ladungsneutralisation erfolgen sollte.

Complexes	Enthalpy, $\Delta H$ [cal/mol]
PF4/UFH	-6682 $\pm$ 1150
PF4/HO16	-7260 $\pm$ 1365
PF4/HO08	-4240 $\pm$ 1467
PF4/HO06	-2071 $\pm$ 35
PF4/fondaparinux	-1333 $\pm$ 57

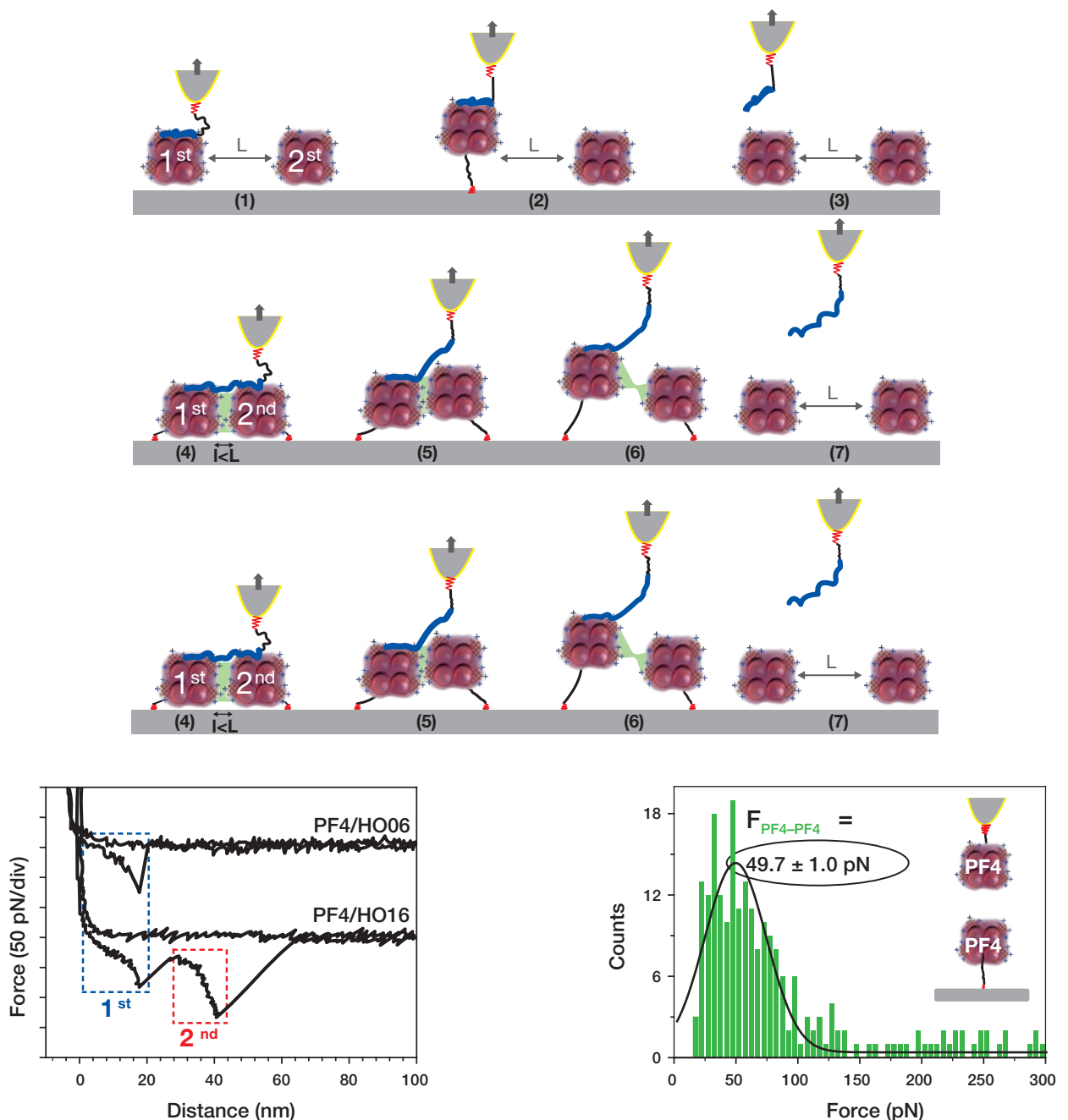


**Abbildung 14:** Die Interaktion von PF4 mit Polyanionen ist ladungsabhängig. Bei der Zugabe vieler negativ geladenen Moleküle mit kurzer Kette sollte die gleiche Energie freigesetzt werden, wie bei der Zugabe von langkettigen negativ geladenen Molekülen. Dies ist jedoch nicht der Fall. Längere negativ geladene Moleküle setzen sehr viel mehr Energie frei, wenn sie mit PF4 interagieren, als kurze negativ geladene Moleküle (modifiziert nach<sup>18</sup>).

Wir haben deshalb das Atomkraftmikroskop genutzt um die Bindungsstärken zwischen einzelnen Heparinmolekülen unterschiedlicher Länge mit PF4-Molekülen zu messen. Die Bindungsstärken sind direkt proportional zur Energie, die in einer Bindung zwischen zwei Molekülen steckt. Hierbei zeigen kurze Heparine eine Kraft-Spitze. Dies bedeutet, dass das Heparin einmal von PF4 abreißt. Längere Heparinmoleküle zeigten zwei Kraft-Spitzen. Dies bedeutet, dass die langen Heparinmoleküle von zwei PF4-Molekülen abreißen. Jede der Kraft-Spitzen zeigt einen Abrissvorgang. Während dieses Ergebnis der Erwartung entsprach, war völlig unklar, warum die zweite Bindung eine höhere Kraft aufweist als die erste Bindung. Beide Bindungen sind ladungsabhängig und bei beiden Bindungen sind die Charakteristika der Bindungspart-

ner die gleichen. Deshalb hätte die gleiche Kraft erforderlich sein sollen, um die Moleküle voneinander zu trennen. Die Erklärung hierfür ist, dass PF4-Moleküle stark positiv geladen sind und eine Ladungshülle um sich herumtragen. Werden diese Ladungen eng aneinandergedrückt, verschmelzen die Ladungshüllen miteinander.<sup>19</sup> Diese gemeinsame Ladungshülle kann nur durch zusätzliche Kraft getrennt werden. Wir haben die Interaktion von zwei PF4-Molekülen miteinander gemessen. Die resultierende Kraft beträgt ca. 50 nN. Dies ist exakt die Kraft, die dem Unterschied zwischen der ersten und zweiten Kraft-Spitze beim Abreißen langer Heparinmoleküle von PF4 entspricht<sup>19</sup> (Abbildung 15).

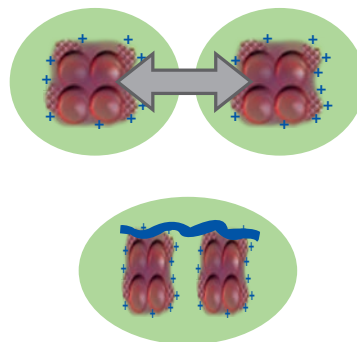
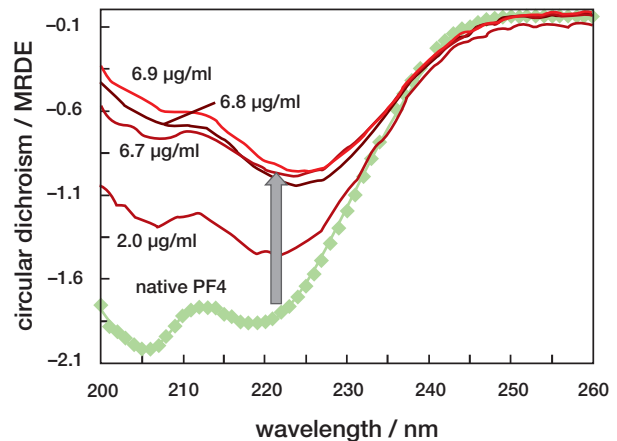
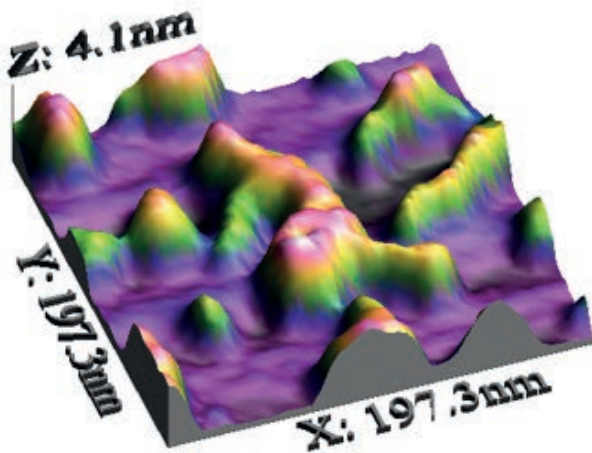
## PF4/Heparin Interaktion in Einzel-Molekül Atomkraftmikroskop Experimenten



**Abbildung 15:** Werden kurze Heparinmoleküle an die Spitze eines Atomkraftmikroskops gebunden und mit PF4 inkubiert, bindet das kurze Heparinmolekül an ein PF4-Molekül. Wird die Spitze angehoben, reißt diese Bindung ab und die entsprechende Kraft kann mit einem Peak gemessen werden. Werden lange Heparinmoleküle an die Spitze eines Atomkraftmikroskops gebunden, binden diese an zwei PF4-Moleküle. Wird die Spitze angehoben, reißen beide Bindungen ab und es entstehen zwei Peaks. Der Größenunterschied zwischen den beiden Peaks entspricht der Kraft, welche benötigt wird fusionierte Ladungshüllen von zwei PF4-Molekülen auseinander zu ziehen (modifiziert nach<sup>19</sup>).

Damit lassen sich die bisherigen Experimente wie folgt zusammenfassen: PF4 wird zu einem Antigen, wenn es mit Polyanionen komplexiert (**Abbildung 16** oben links), dadurch seine Konformation ändert, indem es vermehrt antiparallele Beta Sheets ausbildet (**Abbildung 16** oben rechts) und durch lange Polyanionen zwei PF4-Moleküle so eng aneinander gebracht werden, dass deren Ladungshüllen fusionieren. Dadurch wird zusätzliche Energie freigesetzt, die dazu führt, dass PF4 seine Konformation verändert (**Abbildung 16** unten).

## PF4 wird immunogen



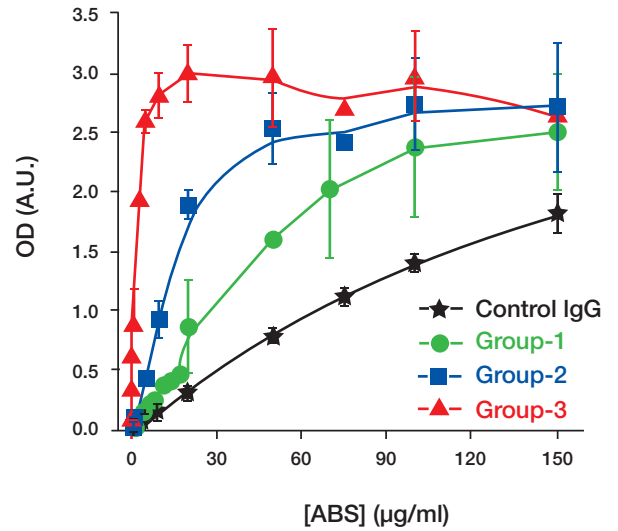
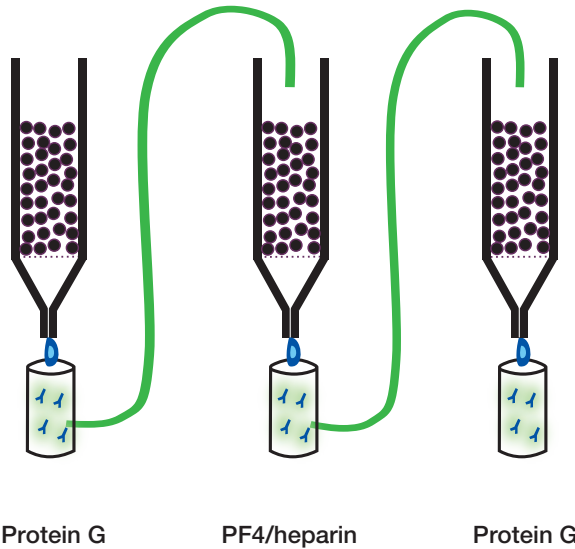
**Abbildung 16:** PF4 bildet Komplexe mit Heparin, fusioniert die Ladungshüllen von zwei stark positiv geladenen PF4-Molekülen. Die dadurch freigesetzte Kraft führt zu einer Konformationsänderung von PF4 (modifiziert nach<sup>20</sup>).

### Ein neuer Mechanismus der Autoimmunität

Mit dem Verständnis, wie das Antigen der HIT gebildet wird, stellte sich jetzt die spannende Frage, ob sich hierüber besser verstehen lässt, wie ein gewünschter Abwehrmechanismus zur Autoimmunerkrankung wird. Bei der autoimmun HIT bilden Patienten HIT-Antikörper und zeigen das volle klinische Bild der HIT, ohne dass sie Heparin erhalten.

Bei der autoimmun HIT entstehen Antikörper, die Thrombozyten auch ohne Zugabe von Heparin aktivieren. Durch diese Eigenschaft lassen sich autoimmun HIT-Antikörper im Funktionstest von normalen HIT-Antikörpern unterscheiden. In einem Antigentest (PF4/Heparin ELISA) reagieren sie gleich.

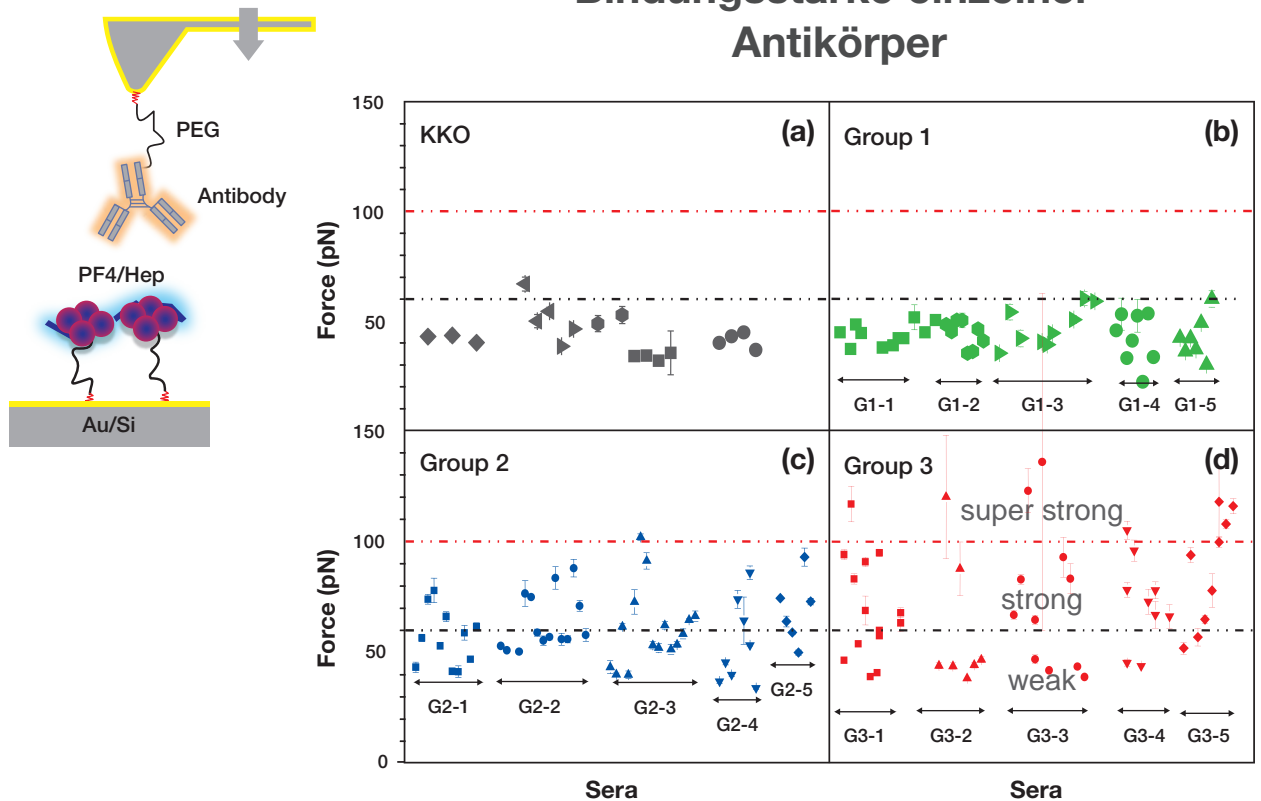
Über mehrfache Säulenchromatographie haben wir die entsprechenden Antikörper aus dem Serum von Patienten aufgereinigt. Dabei konnten drei Antikörperklassen aufgereinigt werden. Gruppe 1-Antikörper reagieren nur im Antigentest positiv, Gruppe 2-Antikörper aktivieren in vitro Thrombozyten nach Zugabe von Heparin und Gruppe 3-Antikörper aktivieren Thrombozyten auch ohne Zugabe von Heparin. Wie **Abbildung 17** zeigt, reagieren die Gruppe 3-Autoantikörper viel stärker als die anderen Antikörper mit PF4/Heparin-Komplexen im Antigentest, wenn die gleiche Antikörpermenge eingesetzt wird.



**Abbildung 17:** Wenn PF4/Heparin-Antikörper aus Patientenserum aufgereinigt werden, lassen sich drei Antikörperklassen unterscheiden, Gruppe 1, Gruppe 2 und Gruppe 3-Antikörper. Bei Verwendung der gleichen Antikörpermenge reagieren die Antikörper unterschiedlich stark mit PF4/Heparin-Komplexen: Gruppe 1 < Gruppe 2 < Gruppe 3 (modifiziert nach<sup>4</sup>).

Mit dem Atomkraftmikroskop lässt sich die Bindungsstärke eines einzelnen Antikörpers an sein Antigen messen. Wir haben dafür an die Spitze eines Atomkraftmikroskops jeweils einen einzigen aufgereinigten Antikörper gebunden. Wie **Abbildung 18** zeigt, binden Gruppe 1-Antikörper schwächer als Gruppe 2-Antikörper an PF4/Heparin-Komplexe und am stärksten binden Gruppe 3-Antikörper. Aus der Abbildung ist auch ersichtlich, dass die Seren, die Gruppe 2- und Gruppe 3-Antikörper enthalten polyklonal sind und Antikörper unterschiedlicher Bindungsstärke enthalten<sup>4</sup>.

## Bindungsstärke einzelner Antikörper



**Abbildung 18:** Werden einzelne IgG-Antikörper an die Spitze eines Atomkraftmikroskops gebunden, kann deren Bindungskraft an PF4/Heparin-Komplexe gemessen werden. Jeder Datenpunkt zeigt die Bindungsstärke von ca. 1.000 Messungen und die dazugehörige Standardabweichung an. Gruppe 2- und Gruppe 3-Antikörper sind polyklonal und enthalten Populationen von Antikörpern mit unterschiedlichen Bindungsstärken. KKO ist ein monoklonaler Antikörper. Die Unterschiede zwischen den gemessenen Bindungsstärken bei KKO zeigt die Variabilität des Testverfahrens (modifiziert nach<sup>4</sup>).

Die Gruppe 3-Antikörper binden jedoch auch an PF4 alleine (Abbildung 19). Dies ist typisch für Autoantikörper.

## Gruppe 3-Antikörper binden PF4

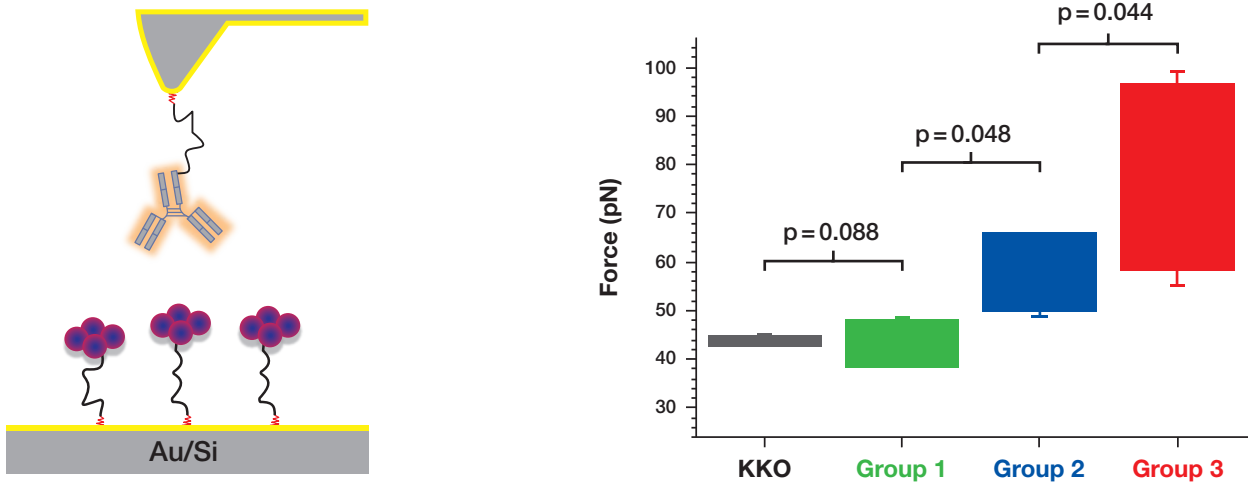


Abbildung 19: Gruppe 3-Antikörper binden stark an PF4 alleine, während der monoklonale Antikörper KKO und Gruppe 1-Antikörper nicht an PF4 binden. Gruppe 2-Antikörper enthalten einige wenige IgG-Moleküle, die auch an PF4 alleine binden können (die meisten Antikörper binden an PF4/Heparin-Komplexe; modifiziert nach<sup>4</sup>).

## Gruppe 3-Antikörper komplexieren PF4

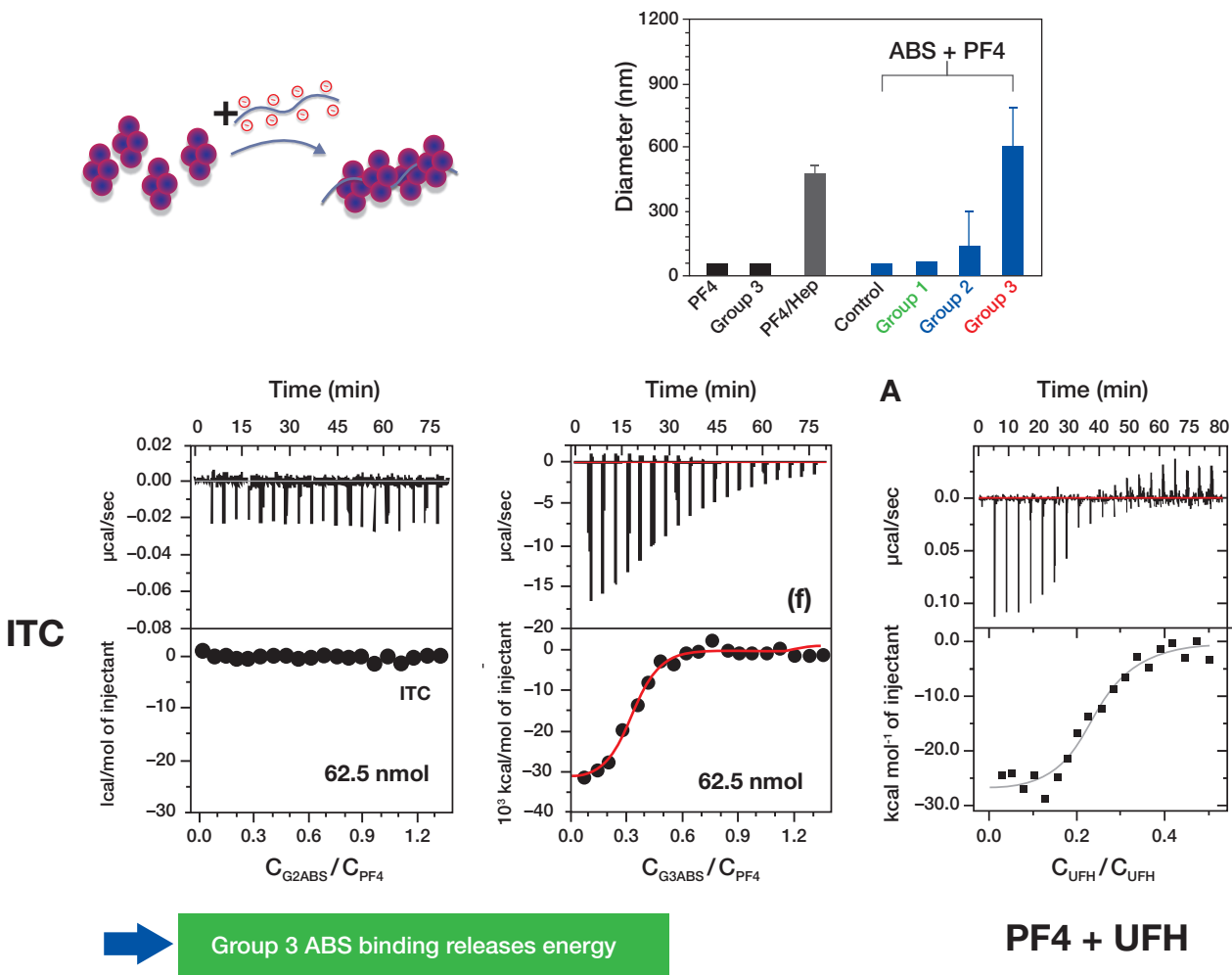
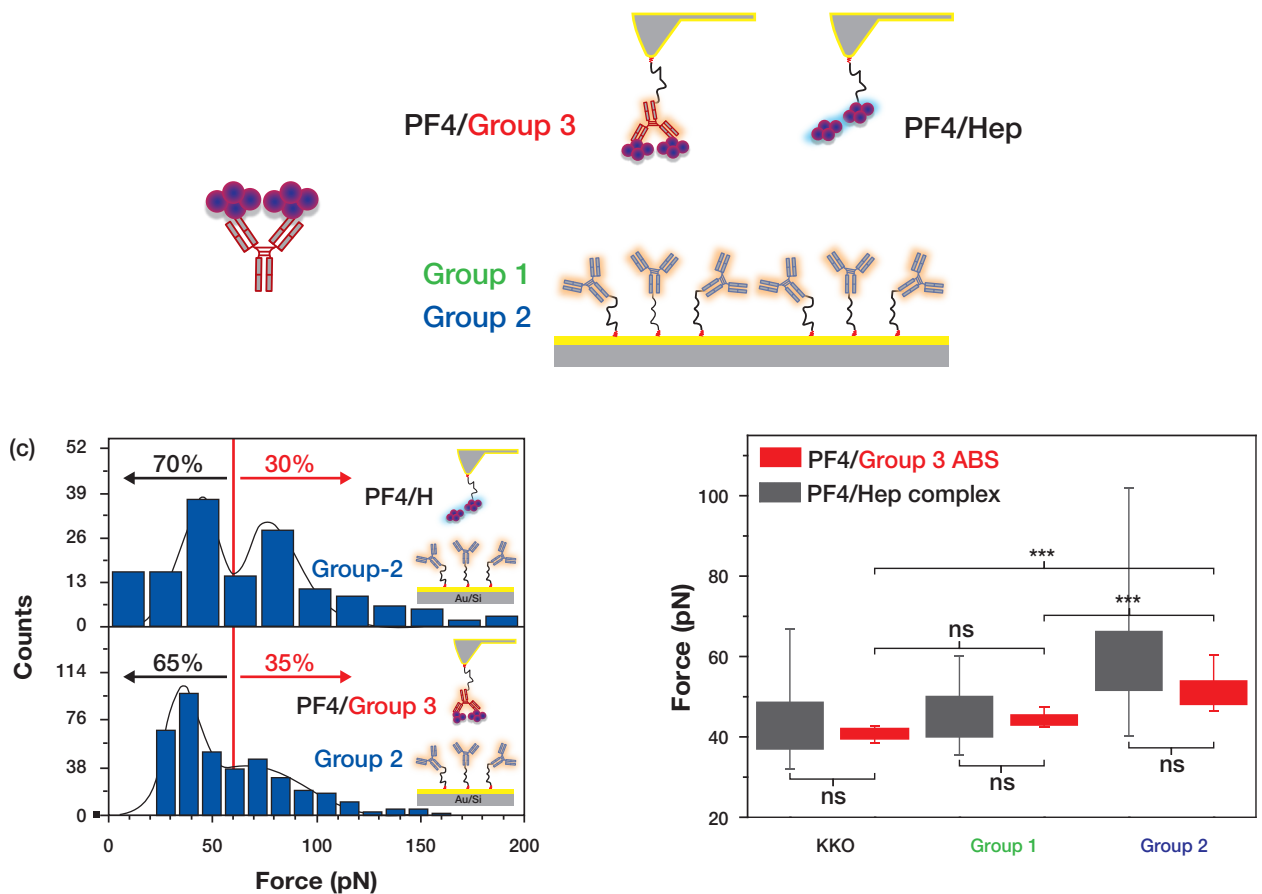


Abbildung 20: Gruppe 3-Antikörper interagieren mit PF4. Sie setzen dabei mehr Energie frei, als wenn PF4 mit Heparin Komplexe bildet (unterer Teil der Abbildung). Die entstehenden Komplexe sind größer als PF4/Heparin-Komplexe (oberer Teil der Abbildung, modifiziert nach<sup>4</sup>).

Wenn Gruppe 3-Antikörper mit PF4 inkubiert werden, setzen sie viel Energie frei, während Gruppe 2-Antikörper dies nicht machen. Die Energie, die durch Gruppe 3-Antikörper freigesetzt wird, ist sogar größer als die Energie, die entsteht, wenn Heparin mit PF4 reagiert. Gruppe 3-Antikörper bilden wie Heparin Komplexe mit PF4. Diese Komplexe sind mindestens so groß sind wie die Komplexe die durch die Reaktion von PF4 mit Heparin entstehen (**Abbildung 20**).

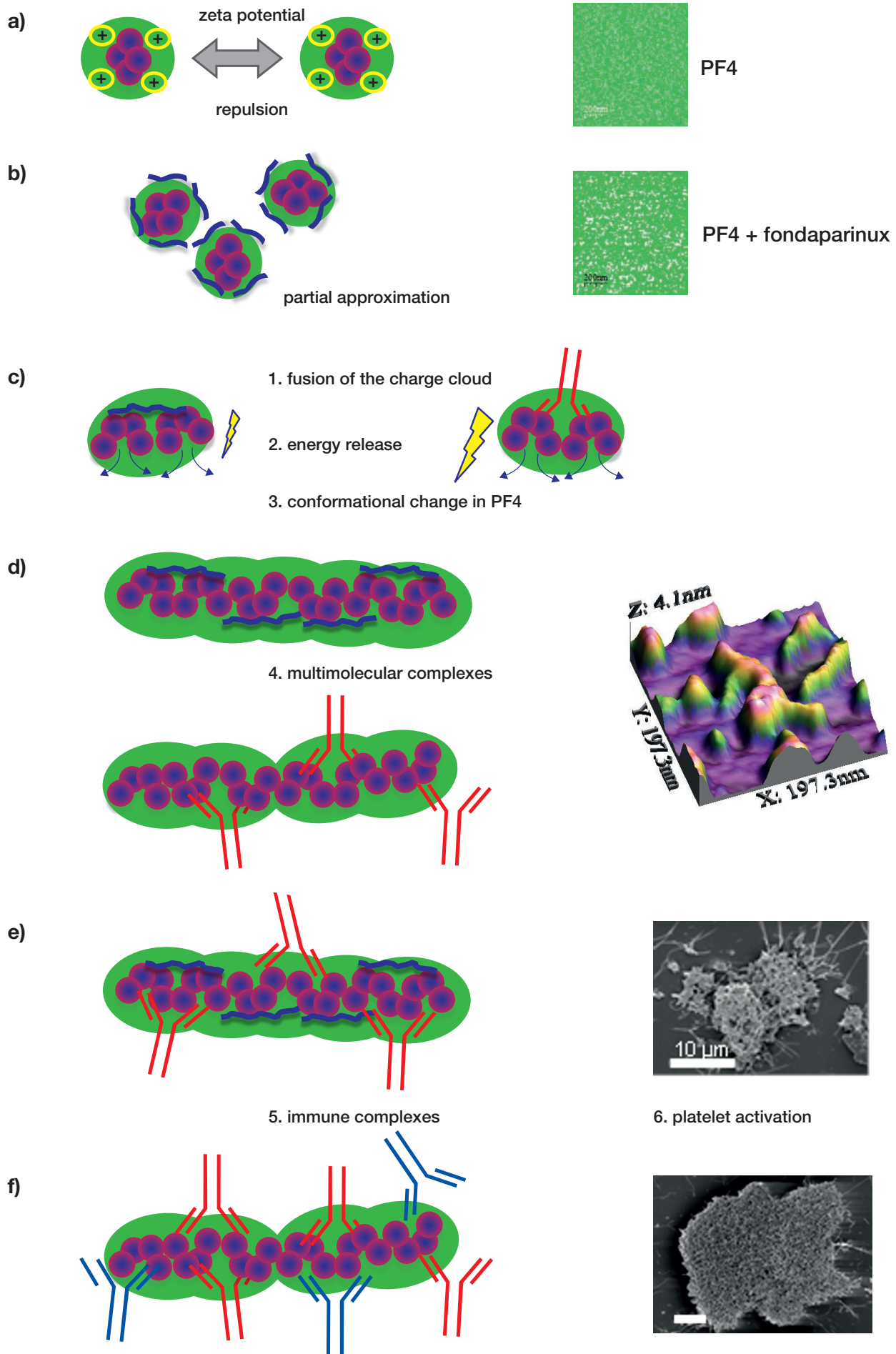
Um zu prüfen, ob Gruppe 3-Antikörper PF4 genauso komplexieren können wie Heparin und ob dadurch PF4 das Epitop exprimiert, welches von Anti-PF4/Heparin-Antikörpern erkannt wird, haben wir an die Spitze des Atomkraftmikroskops entweder PF4/Heparin-Komplexe gebunden, oder Gruppe 3-Antikörper an die PF4 gebunden hat. Auf die Festphase wurden Gruppe 2-Antikörper gebunden, d. h. Antikörper welche nur PF4/Heparin-Komplexe erkennen (aber nicht PF4 alleine). Dann haben wir die Kräfte gemessen, die entstehen, wenn die Spitze mit den daran gebundenen Antigenen mit den an der Festphase gebundenen Heparin-abhängigen Antikörpern reagiert. Aus **Abbildung 21** ist zu sehen, dass die resultierenden Kräfte sehr vergleichbar sind. Damit ist bewiesen, dass PF4 nach Bindung an Gruppe 3-Antikörper seine Konformation ändert und das Epitop exprimiert an welches Gruppe 2-Antikörper binden können.

## Gruppe 3-Antikörper ersetzen Heparin



➔ Group 3 ABS: mimic heparin

**Abbildung 21:** Die Bindungskraft zwischen PF4/Heparin-Komplexen an der Spitze des Atomkraftmikroskops und Heparin-abhängigen Gruppe 2-Antikörper an der Festphase ist sehr vergleichbar mit der Bindungskraft zwischen PF4, welches an Gruppe 3 gebunden ist und den Heparin-abhängigen Gruppe 2-Antikörpern an der Festphase. Dies bedeutet, dass beide Antigene die gleiche Struktur exprimieren und in gleicher Weise von den an der Festphase gebundenen Gruppe 2-Antikörpern erkannt werden (modifiziert nach4).



**Abbildung 22:** Modell der Interaktion von PF4 mit kurzen und langen Polianionen, daraus resultierende Veränderung der Konformation von PF4 und Bindung von Anti-PF4/Heparin-Antikörpern. Blau sind die Heparin-abhängigen Gruppe 2-Anti-PF4/Heparin-Antikörper dargestellt, rot sind die Anti-PF4 Gruppe 3-Autoantikörper (entnommen aus<sup>5</sup>).



Zusammengefasst stoßen sich PF4-Moleküle aufgrund ihrer stark positiven Ladung voneinander ab. Wenn sie mit kurzkettigen Polyanionen reagieren, können Sie sich zwar annähern, aber keine Komplexe bilden, in denen PF4 seine Konformation ändert. Reagiert PF4 mit langkettigen Polyanionen, werden die Ladungshüllen von zwei PF4-Molekülen miteinander fusioniert. Dabei entsteht Energie welche die Konformation von PF4 ändert. Anti-PF4-Autoantikörper können die gleiche Reaktion auslösen, zwei PF4-Moleküle eng aneinander bringen und damit eine Konformationsänderung auslösen. Damit entstehen multimolekulare Komplexe aus PF4 und Polyanionen oder PF4 und autoimmun HIT-Antikörpern. An beide Komplexe können Heparin-abhängige HIT-Antikörper binden. Allerdings sind an den autoimmun HIT-Immunkomplexen vielmehr IgG-Moleküle gebunden, sodass diese mehr Fc-Rezeptoren vernetzen und damit Thrombozyten besser aktivieren können. Dadurch entstehen größere und dichtere Thrombozyten-Aggregate in vitro und in vivo ein klinisch schwereres Bild der HIT (**Abbildung 22**).

Wir vermuten derzeit, dass ein ähnlicher Mechanismus auch für die Entstehung von Auto-Antigenen verantwortlich ist beim Antiphospholipid-Syndrom, bei der thrombotisch thrombozytopenischen Purpura, bei der Post-transfusionellen Purpura und möglicherweise auch bei einigen Formen der Autoimmun-hämolytischen Anämie und der Autoimmun-Thrombozytopenie.

### Der Autor



**Prof. Dr. med. Andreas Greinacher**  
Universitätsmedizin KdöR Greifswald  
Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin  
Abteilung Transfusionsmedizin  
andreas.greinacher@med.uni-greifswald.de

Die Literaturhinweise zu diesem Artikel finden Sie im Internet zum Download unter: [www.drk-haemotherapie.de](http://www.drk-haemotherapie.de)