

Aus dem Centrum für Thrombose und Hämostase (CTH)  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Funktionelle und zellbiologische Untersuchungen von genetisch determinierten  
Thrombozytopathien

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Dr. phil. nat. Daniele Pillitteri  
aus Darmstadt

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher

Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Betreuer:

Tag der Promotion:

08.12.2020

**Teile dieser Dissertation wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:**

Döhrmann M, Makhoul S, Gross K, Krause M, **Pillitteri D**, von Auer C, Walter U, Lutz J, Volf I, Kehrel BE, Jurk K. CD36-fibrin interaction propagates FXI-dependent thrombin generation of human platelets. *FASEB J.* 2020 May 28. doi: 10.1096/fj.201903189R. Online ahead of print.

Makhoul S, Trabold K, Gambaryan S, Tenzer S, **Pillitteri D**, Walter U, Jurk K. cAMP- and cGMP-elevating agents inhibit GPIIb $\alpha$ -mediated aggregation but not GPIIb $\alpha$ -stimulated Syk activation in human platelets. *Cell Commun Signal.* 2019 Sep 13;17(1):122.

van Geffen JP, Brouns SLN, Batista J, McKinney H, Kempster C, Nagy M, Sivapalaratnam S, Baaten CCFMJ, Bourry N, Frontini M, Jurk K, Krause M, **Pillitteri D**, Swieringa F, Verdoodt R, Cavill R, Kuijpers MJE, Ouwehand WH, Downes K, Heemskerk JWM. High-throughput elucidation of thrombus formation reveals sources of platelet function variability. *Haematologica.* 2019 Jun;104(6):1256-1267.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XI</b>
<b>1 Einleitung und Ziel der Arbeit .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturdiskussion .....</b>	<b>3</b>
2.1 Physiologie und Pathophysiologie der Hämostase .....	3
2.2 Thrombozyten .....	5
2.2.1 Morphologie der Thrombozyten .....	5
2.2.2 Thrombozytenfunktion in der primären Hämostase .....	7
2.2.3 Thrombozytäre Membranglykoproteine .....	11
2.3 Hereditäre Thrombozytopathien.....	14
2.3.1 Glanzmann-Thrombasthenie .....	14
2.3.2 Storage-Pool-Erkrankungen.....	16
2.4 <i>Phenotyping</i> und <i>Genotyping</i> von hereditären Thrombozytopathien .....	20
2.4.1 <i>Phenotyping</i> von Thrombozytopathien.....	21
2.4.2 <i>Genotyping</i> von Thrombozytopathien .....	23
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>27</b>
3.1 Geräte .....	27
3.2 Verbrauchsmaterialien .....	28
3.3 Reagenzien .....	29
3.4 Antikörper.....	30
3.5 Software.....	30
3.6 Studiendesign .....	31
3.7 Probanden und Patienteneinschluss.....	31
3.7.1 Genehmigung .....	31
3.7.2 Patienten-/ Probandenrekrutierung und Ein-/ Ausschlusskriterien .....	31
3.7.3 Datenschutz, Dokumentation und Datenspeicherung .....	32
3.7.4 Statistische Datenauswertung.....	33
3.8 Venöse Blutentnahme.....	34
3.9 Herstellung von Plättchen-reichem (PRP, „platelet-rich plasma“) und Plättchen-armen Plasma (PPP, „platelet-poor plasma“)......	34
3.9.1 Herstellung von PRP.....	34
3.9.2 Herstellung von PPP.....	34
3.10 Durchflusszytometrie.....	35

## Inhaltsverzeichnis

3.10.1	Durchflusszytometrische Analyse der Thrombozytenfunktion.....	35
3.10.2	Probenvorbereitung und Durchführung.....	37
3.10.3	Durchflusszytometrische Bestimmung der Fibrinogen-Bindung und der Oberflächen-Rezeptoren.....	39
3.10.4	Darstellung der Messung.....	43
3.11	Detektion von Thrombozytenproteinen mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse.....	44
3.11.1	Isolierung der Thrombozyten durch Gelfiltration.....	44
3.11.2	Probenvorbereitung.....	45
3.11.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	46
3.11.4	Western Blotting.....	47
3.12	Molekulargenetische Untersuchungen.....	49
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>51</b>
4.1	Patienten mit Glanzmann Thrombasthenie.....	51
4.1.1	Anamnese der Index-Patientin GT-1-Index.....	52
4.1.2	Patienten mit Glanzmann Thrombasthenie.....	62
4.2	Patienten mit thrombozytären Kombinationsdefekten.....	65
4.2.1	Anamnese des Index-Patienten SPD-1-Index.....	65
4.2.2	Anamnese der Index-Patientin SPD-2-Index.....	76
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>83</b>
5.1	Thrombozyten-Funktionsuntersuchungen und molekulargenetische Analyse bei Patienten mit Glanzmann Thrombasthenie.....	83
5.1.1	Expression lysosomaler Membranglykoproteine auf Thrombozyten bei Patienten mit Glanzmann Thrombasthenie.....	88
5.2	Patienten mit thrombozytären GPIIb-IIIa Kombinationsdefekten.....	90
5.2.1	Patient SPD-1-Index: Schwere Thrombozytopenie und Granula-Dysfunktion assoziiert mit zwei kombinierten heterozygoten Varianten im <i>TUBB1</i> - und <i>ITGB3</i> -Gen	90
5.2.2	Patientin SPD-2-Index: Schwere Thrombozytopathie und $\delta$ -Granula-Dysfunktion assoziiert mit zwei neuen heterozygoten Varianten im <i>ITGA2B</i> - und <i>F2RL3</i> -Gen.....	93
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>98</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>100</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>115</b>
	<b>Schriftliche Erklärung.....</b>	<b>120</b>

## Abkürzungsverzeichnis

2	Quadrat-
3	Kubik-
°C	Grad Celcius
%	Vol. Volumenprozent
α	alpha
β	beta
μ	Mikro-
Abb.	Abbildung
ACS	Akutes Koronarsyndrom („acute coronary syndrome“)
ALT	Alanin-Aminotransferase
APC	Allophycocyanin
ASS	Acetylsalicylsäure
AST	Aspartat-Aminotransferase
AU	arbitrary units
BD	Becton Dickinson
bzw.	Beziehungsweise
CAT	Kalibrierte automatisierte Thrombographie („calibrated automated thrombography“)
CD	Cluster of differentiation
cm	Zentimeter
COX	Cyclooxygenase
CT	Computertomographie
Cvx	Convulxin
d	Tag
dest.	Destilliert
DNA	Deoxyribonucleic acid (dt. Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
ETP	Endogenes Thrombin Potential
FACS	Durchfluszytometrie („fluorescence-activated cell sorting“)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht („forward scatter channel“)

## Abkürzungsverzeichnis

g	Gramm
xg	g-Kraft
GP	Glykoprotein
h	Stunde
ICAM	„Intercellular adhesion molecule 1“
i.d.R.	In der Regel
IgG	Immunglobulin G
KHK	Koronare Herzkrankheit
l	Liter
LDL	„Low-density lipoprotein“
LMWH	Niedermolekulares Heparin („low molecular weight heparin“)
LVEF	„Left ventricular ejection fraction“
m	Meter
M	Molar
max.	Maximal
Mep	Mepacrine
min	Minute
mm	Millimeter
mM	Millimolar
ms	Millisekunde
nm	Nanometer
PAR	„Proteinase-activated-receptors“
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung („phosphate buffered solution“)
PDGF	„Platelet derived growth factor“
PE	R-Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-a-Protein
PPP	„Platelet-poor plasma“ (dt. Plättchen-armes Plasma)
PRP	„Platelet-rich plasma“ (dt. Plättchen-reiches Plasma)
PSGL-1	„P-Selectin glycoprotein ligand 1“
RNA	Ribonucleic acid (dt. Ribonukleinsäure)

## Abkürzungsverzeichnis

rpm	revolutions per minute (dt. Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
SSC	Seitwärtsstreulicht („side scatter channel“)
TAT-Level	Thrombin-Antithrombin-Level
teilw.	teilweise
TF	Tissue Faktor
TFPI	„Tissue factor pathway inhibitor“
TIA	Transitorische ischämische Attacke
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TSP-1	Thrombospondin-1
VEGF	„Vascular endothelial cell growth factor“
vWF	Von-Willebrand-Faktor
z.B.	Zum Beispiel
z.T.	Zum Teil



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Thrombozytenaktivierung. Elektronenmikroskopische Aufnahme. ....	5
Abbildung 2: Reaktionsschema der Entwicklung der PVDF-Membran.....	48
Abbildung 3: Index-Patientin GT-1-Index mit multiplen Hämatomen an den Extremitäten. .....	53
Abbildung 4: Agonisten-induzierte Thrombozytenaggregation bei der Index-Patientin GT- 1-Index und Familienangehörigen .....	55
Abbildung 5: Besatz der Membranrezeptoren CD41, CD42a, CD42b und CD36 auf der Thrombozytenoberfläche bei der Index-Patientin GT-1-Index und ihrer Familienangehörigen.....	56
Abbildung 6: <i>in vitro</i> Aktivierungskapazität von GPIIb-IIIa auf der Thrombozytenoberfläche nach Stimulierung mit 10 µM ADP oder 10 µM TRAP bei der Index-Patientin GT-1-Index und ihrer Familienangehörigen.....	57
Abbildung 7: CD62P- und CD63-Expression bei der Index-Patientin GT-1-Index und ihren Familienangehörigen nach Stimulierung mit 0.25 U/ml Thrombin. ....	58
Abbildung 8: Thrombozytäre Mepacrine-Aufnahme und Thrombin-induzierte Freisetzung von Mepacrine bei der Index-Patientin GT-1-Index und ihren Familienangehörigen.....	59
Abbildung 9: Convulxin-induzierte Freisetzung von Mepacrine bei der Index-Patientin GT- 1-Index und ihren Familienangehörigen. ....	59
Abbildung 10: LAMP-1-Oberflächen-Expression der Thrombozyten bei der Index-Patientin GT-1-Index und ihren Familienangehörigen nach Stimulierung mit Thrombin.....	60
Abbildung 11: LAMP-1-Expression der Thrombozyten bei der Index-Patientin GT-1-Index und ihren Familienangehörigen nach Stimulierung mit Convulxin. ....	61
Abbildung 12: Western Blot Analyse der Proteinexpression von LAMP-1, LAMP-, GPIIb und vWF .....	62
Abbildung 13: Besatz der Membranrezeptoren CD41 (GPIIb), CD42a und CD42b auf der Thrombozytenoberfläche bei Patienten mit GT Typ I und Patienten mit heterozygoter GPIIb-IIIa-Variante. ....	63
Abbildung 14: <i>in vitro</i> Aktivierungskapazität von GPIIb-IIIa auf der Thrombozytenoberfläche nach Stimulierung mit 10 µM ADP oder 10 µM TRAP bei Patienten mit GT. ....	64

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 15: CD62P- und CD63-Expression in Thrombozyten von Patienten mit GT nach Stimulierung mit 0.25 U/ml Thrombin.....	65
Abbildung 16: Index-Patient SPD-1-Index mit multiplen Hämatomen. ....	66
Abbildung 17: Durchflusszytometrische Quantifizierung der thrombozytären Oberflächen-Rezeptoren .....	67
Abbildung 18: <i>in vitro</i> Aktivierungskapazität von GPIIb-IIIa auf der Thrombozytenoberfläche nach Stimulierung mit 10 µM ADP oder 10 µM TRAP beim Index-Patienten SPD-1-Index und seinen Eltern .....	68
Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse der P-Selektin- und CD63-Expression nach Stimulierung mit Thrombin.....	69
Abbildung 20: Convulxin-induzierte Exozytose der α- und δ--Granula. ....	70
Abbildung 21: Durchflusszytometrische Analyse der δ-Granula und Lysosomen-Expression.....	71
Abbildung 22: Darstellung der Mutation im TUBB1-Gen beim Index-Patienten und Mutter im Elektropherogramm .....	72
Abbildung 23: Darstellung der Mutation im ITGB3-Gen beim Index-Patienten und Eltern im Elektropherogramm .....	73
Abbildung 24: Immunhistochemischer Nachweis von β-Tubulin in den Thrombozyten des Index-Patienten (A) und bei einem gesunden Probanden (B) .....	75
Abbildung 25: Immunhistochemischer Nachweis von thrombozytärem CD62P (A), CD63 (B) und LAMP-1 (C) beim Index-Patienten (rechts) und bei einem gesunden Probanden (links).....	76
Abbildung 26: Agonisten-induzierte Thrombozytenaggregation bei der Index-Patientin SPD-2-Index .....	77
Abbildung 27: Durchflusszytometrische Quantifizierung der thrombozytären Membran-Rezeptoren CD41, CD42b und CD42a bei der Index-Patientin sowie ihren Eltern und Zwillingsschwestern .....	78
Abbildung 28: <i>in vitro</i> Aktivierungskapazität von GPIIb-IIIa auf der Thrombozytenoberfläche nach Stimulierung mit 10 µM ADP oder 10 µM TRAP bei der Index-Patientin SPD-2-Index und Familienangehörigen.....	79
Abbildung 29: Durchflusszytometrische Analyse der thrombozytären P-Selektin- und CD63-Expression nach Stimulierung mit Thrombin.....	80

## Tabellenverzeichnis

### Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Inhaltsstoffe der thrombozytären Speichergranula (2) .....	9
Tabelle 2: Glanzmann Thrombasthenie-Typisierung. Modifiziert nach Nurden (2006). (64) .....	15
Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Geräte und Hersteller .....	27
Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Gebrauchsmaterialien .....	28
Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Puffer, Reagenzien, deren Stammlösung und Bezugsquelle.....	29
Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Antikörper.....	30
Tabelle 5: Verwendete Programme.....	30
Tabelle 8: Pipettierschema für die Versuche mit dem Durchflusszytometer (Methode I)	38
Tabelle 9: Benötigte Laborgeräte und Reagenzien für die PAC1- und P-Selektin-Messung. .....	40
Tabelle 10: Durchführung der PAC1- und P-Selektin-Messung. ....	41
Tabelle 11: Funktionen der verwendeten Antikörper .....	42
Tabelle 12: Funktionen der verwendeten Antikörper .....	42
Tabelle 13: Durchführung der Rezeptorzahlanalyse .....	43
Tabelle 14: Pipettierschema für vier SDS-Gele mit 8% Acrylamid .....	46
Tabelle 15: Verwendete Antikörper .....	49
Tabelle 16: Charakteristika der untersuchten Patienten mit Glanzmann Thrombasthenie .....	51
Tabelle 17: Nachgewiesene Mutationen bei den untersuchten Typ I GT-Patienten .....	52
Tabelle 18: Nachgewiesene Mutationen bei dem Index-Patienten und den Eltern.....	74
Tabelle 19: Rezeptor-Besatz bei der Index-Patienten SPD-2-Index und Familienangehörigen.....	78
Tabelle 20: <i>in vitro</i> Aktivierungskapazität von GPIIb-IIIa bei der Index-Patientin und Familienangehörigen.....	79
Tabelle 21: Sequenzierungsergebnisse der Index-Pat. SPD-2-Index, ihrer Zwillingschwester und den Eltern .....	81

## 1 Einleitung und Ziel der Arbeit

Als Thrombozytopathien bezeichnet man Thrombozyten-Funktionsstörungen, die zu zumeist milden bis schweren hämorrhagischen Diathesen führen können. Demgegenüber kann eine gesteigerte Thrombozytenfunktion zu einer Thromboseneigung führen.

Thrombozytopathien können erworben oder angeboren (hereditär) auftreten. Hereditäre Thrombozytopathien stellen eine heterogene Gruppe von Erkrankungen dar, die als Teil eines Symptomenkomplexes („Syndrom“) oder auch isoliert als hämorrhagische Diathese auftreten können. Die Erkrankungen – insbesondere die milden Formen - sind häufig schwierig zu diagnostizieren und es gelingt oft nicht, sie einem klassifizierten Krankheitsbild zuzuordnen. Angeborene Störungen der Thrombozyten insbesondere ohne Erniedrigung der Thrombozyten-Konzentration unter 110.000/ $\mu$ l bleiben häufig bis zum Eintritt von Blutungssymptomen unentdeckt. Klinische Folge einer thrombozytären Störung ist in den meisten Fällen eine leichte bis moderate Blutungsneigung. Durch koexistierende Faktoren, wie Medikamente, Operationen oder andere Herausforderungen der Hämostase kann es zu einer klinisch relevanten Blutungsneigung kommen. Typische Symptome von Störungen der Thrombozyten sind Schleimhautblutungen, Epistaxis, Menorrhagien, Hämatome, Petechien und Blutungen bei invasiven Eingriffen und Operationen (1).

Hereditäre Veränderungen sind vor allem wegen ihrer Bedeutung für das Verständnis der Funktion des normalen Blutplättchens eingehend untersucht worden. Zu den am häufigsten diagnostizierten angeborenen Thrombozytopathien gehören Defekte der Thrombozytengranula. Eine Verminderung der dichten Granula oder der komplette oder partielle Verlust ihrer Inhaltsstoffe, welche als „ $\delta$ --storage pool disease“ ( $\delta$ -SPD) bekannt ist, spielt in dieser Gruppe eine wichtige Rolle. Eine weitere große Gruppe der angeborenen Thrombozytopathien umfasst die autosomal-rezessiv vererbte Glanzmann Thrombasthenie (GT), welche durch eine funktionelle Störung oder das Fehlen des Fibrinogenrezeptors Glykoprotein (GP) IIb-IIIa (Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3; CD41/61) auf der Oberfläche der Thrombozyten ausgelöst wird und dazu führt, dass die Aggregation der Thrombozyten ausbleibt.

Mit Hilfe molekulargenetischer Diagnostik kann bei Nachweis einer oder mehrerer krankheitsverursachender Varianten die Verdachtsdiagnose einer hereditären

## Einleitung und Zielsetzung der Arbeit

Thrombozytopathie gesichert werden. Im Rahmen einer prädiktiven Analyse können Familienangehörige durch den Nachweis oder den Ausschluss der familienspezifischen Variante ihren Anlageträgerstatus bestimmen. Ein fehlender Mutationsnachweis bei einem Betroffenen schließt die Verdachtsdiagnose einer angeborenen Thrombozytopathie nicht aus, weil im Rahmen der molekulargenetischen Routinediagnostik in der Regel nur die kodierenden Sequenzen untersucht werden.

Im Rahmen dieser Dissertation soll unter Verwendung funktioneller, zellbiologischer und genetischer Methoden die Charakterisierung von Thrombozyten bei Patienten mit Verdacht auf hereditärer Thrombozytopathie durchgeführt werden. Ziel ist es Parameter zu identifizieren, die bei Patienten mit Thrombozyten-Defekten im Vergleich zu gesunden Probanden verändert sind, um ein verbessertes Verständnis der Blutungsneigung und ihres Schweregrads zu erlangen. Hierzu sollen Thrombozyten von Patienten mit Thrombozytopathien, wie z.B. GT oder SPD untersucht werden. Mit Hilfe der Lichttransmissionsaggregometrie und Durchflusszytometrie soll der Aktivierungsgrad und die Aktivierbarkeit der Thrombozyten bezüglich Aggregation, *in vitro* Aktivierungskapazität von GPIIb-IIIa (CD41/61), Oberflächen-Rezeptoren (CD42b, CD42a, CD36, GPVI) sowie die aktivierungsabhängige Granula-Exozytose (P-Selektin, LAMP-1 und LAMP-3) und Sekretion der Granulainhaltstoffe untersucht werden. Neben funktionellen und Proteinchemischen Methoden soll auch die molekulare Diagnostik ein wichtiger Bestandteil des diagnostischen Prozesses sein, um molekulare und funktionelle Zusammenhänge bei TG und SPD möglichst vollständig aufzuklären. Die Genotypisierung erfolgt durch Next Generation Sequenzierung bzw. Whole Exome Sequencing, wodurch neue pathogene Varianten im Exom bei Patienten mit thrombozytären Defekten identifiziert werden sollen.

## 2 Literaturdiskussion

### 2.1 Physiologie und Pathophysiologie der Hämostase

Die Hämostase wird durch ein empfindlich geregeltes Zusammenspiel aus zellulären und plasmatischen Komponenten gewährleistet. Hierzu gehören:

- Gefäßwand: Endothel, Subendothel; Vasokonstriktion
- Thrombozyten
- Gerinnungssystem: Gerinnungsfaktoren und Inhibitoren
- Fibrinolyse-System: Fibrinolysekomponenten und Inhibitoren

Zum Hämostasesystem gehört aus physiologischer und pathophysiologischer Sicht auch das

- Monozyten-Makrophagen- bzw. retikuloendotheliale System (RES).

Unter physiologischen Bedingungen stehen hämostasefördernde und hämostasehemmende Vorgänge in einer fein austarierten Balance, sodass das Blut im Gefäßsystem zirkuliert, ohne dass es zum Sistieren des Blutflusses oder zum Blutaustritt in das umliegende Gewebe kommt. Erst durch traumatische Einwirkungen auf die Gefäßwand kann es zur Aufhebung der Gefäßwandintegrität kommen und im Folgenden in das umliegende Gewebe einbluten. Physiologisch bildet sich daraufhin lokal ein Thrombus, welcher die Gefäßwandverletzung abdichtet und die Blutstillung bewirkt, ohne dabei jedoch den Blutfluss und damit die Versorgung abhängiger Gewebe zu beeinträchtigen. Defizite, Defekte und genetisch determinierte Varianten plasmatischer und zellulärer Hämostasekomponenten können zur Dysbalance führen und Blutungen oder Thrombosen hervorrufen (2–4).

Als Hämostase bezeichnet man die Summe der physiologischen Prozesse, die den Stillstand einer Blutung durch Bildung eines Gefäßwandthrombus herbeiführen. Je nach ihrem zeitlichen Ablauf wird sie in verschiedene Stadien –primäre Hämostase, sekundäre Hämostase und Fibrinolyse – unterteilt. Während die erste Phase (primäre Hämostase) von thrombozytären Funktionsäußerungen (Adhäsion, Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten) bestimmt wird und zur Bildung eines hämostatischen Pfropfs führt, tritt

nachfolgend eine Aktivierung des Gerinnungssystems auf (Thrombinbildung, Umwandlung von Fibrinogen in Fibrin). Unlösliches Fibrin umspannt den hämostatischen Propf wie ein Maschenwerk, stabilisiert das initial gefäßabdichtende Thrombozytenaggregat und verhindert sein Abreißen durch den Blutstrom. Während der Heilungsphase wird dann ein Teil des Thrombus durch Fibrinolyse wieder abgebaut (2).

Sowohl die primäre wie auch die sekundäre Hämostase sind unerlässlich für eine intakte Blutstillung. Angeborene Defekte können als „humane Knockout“-Modelle dienen. So bedingen hereditäre Thrombozyten-Funktionsstörungen (Thrombozytopathien) mit defekter primärer Hämostase ebenso wie angeborene Mangelzustände bestimmter Gerinnungsfaktoren, etwa des Faktor VIII (FVIII) oder Faktor IX (FIX) bei Hämophilie A oder B, mit defekter sekundärer Hämostase eine hämorrhagische Diathese, obgleich die jeweils andere Komponente des Hämostaseapparats intakt ist.

Für die klinische Diagnostik relevant ist der unterschiedliche hämorrhagische Phänotyp je nach Störung:

- Petechien und mukokutane Blutungen mit unscharf begrenzten Hämatomen bei thrombozytären (oder seltenen vaskulären) Defekten, hingegen
- scharf abgegrenzte Hämatome bei plasmatischen Hämostasestörungen,
- typischerweise Gelenk- und Weichteileinblutungen bei Hämophilie.

Verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten eines prothrombotischen Zustandes, entsteht eine Thromboseneigung (thrombophile Diathese). So führen angeborene oder erworbene Mangelzustände an Antithrombin, Protein C oder Protein S ebenso wie bestimmte Autoantikörper („Lupusantikoagulans“) beim Antiphospholipid-Syndrom zu einer prothrombotischen Verlagerung des hämostatischen Gleichgewichts. Auch genetisch bedingte Punktmutationen bestimmter Gerinnungsfaktoren, z.B. die G20210A-Mutation von Prothrombin und die G1691A-Mutation von Faktor V (FV, „Leiden“) können als *gain-of-function mutations* ein prokoagulatorisches Übergewicht bedingen und Ursache venöser Thromboembolien sein.

## 2.2 Thrombozyten

### 2.2.1 Morphologie der Thrombozyten

Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt, entstehen im Knochenmark aus Megakaryozyten und liegen physiologischerweise im peripheren Blut im Bereich von 150000 bis 300000 pro  $\mu\text{l}$  Blut. Mit einem Durchmesser von 1,5 – 4  $\mu\text{m}$  sind Thrombozyten die kleinsten korpuskulären Bestandteile des Blutes. Da Thrombozyten keinen Zellkern besitzen und nur eingeschränkt zur Neusynthese von Proteinen fähig sind, werden sie im klassischen Sinne nicht als Zellen betrachtet, sondern als „anukleäre Zellen“. Die meisten Thrombozytenspezifischen Proteine, Zellorganellen sowie Membransysteme entstehen bereits während der Reifungsprozesse der Megakaryozyten. Nach einer ca. 8-12 tägigen Lebensdauer im peripheren Blut werden sie im retikulo-endothelialen System der Milz und Leber abgebaut (2).

Ruhende Thrombozyten haben eine typische diskoidale Form (durchschnittliche Oberfläche 8  $\mu\text{m}^2$ ). Dagegen führt eine Aktivierung zur Formveränderung („shape change“) mit Ausbildung von Pseudopodien, die Ausstülpungen der Plasmamembran sind (Echinosphärozyten) (Abbildung 1).

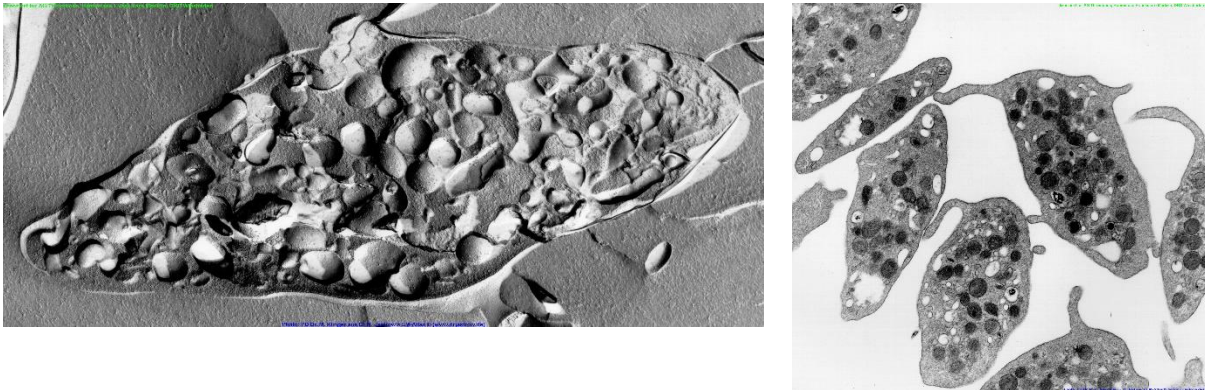


Abbildung 1: Phänotyp von ruhenden und aktivierten humanen Thrombozyten. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen einen ruhenden Thrombozyt mit diskoider Form (links) und aktivierte Thrombozyten mit Ausbildung von Pseudopodien (rechts) (freundlicherweise von PD Dr. H. Jastrow, Facharzt für Anatomie, Kotthausgang 22, Essen, zur Verfügung gestellt).



Ultrastrukturell können Thrombozyten in vier morphologische Bereiche unterteilt werden:

### **1. periphere Zone**

Die periphere Zone besteht aus einer trilaminären Zellmembran. Extrazellulär besteht diese aus einer Glykokalix (Mukopolysaccharide), Glykoproteine, Phospho- und Glykoproteine sowie Cholesterin und verschiedene Enzyme (beispielsweise Adenylatzyklase,  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase, Phospholipase). Die Glykoproteine bilden spezifische Oberflächenrezeptoren.

### **2. strukturelle Zone**

Die strukturelle Zone besteht aus Microtubuli, die submembranös gelegen sind Tubulinfäden darstellen. Umgeben sind sie durch ein Netzwerk von verschiedensten anderen Strukturproteinen. Ihre Aufgabe ist es die diskoide Form des ruhenden Thrombozyten aufrecht zu erhalten und beim aktivierten Thrombozyten sind sie aktiv an Formveränderung beteiligt.

Das Zytoskelett besteht aus Strukturproteinen, hauptsächlich Aktin (ca. 15-20%) und Aktin-Bindungsproteine. Im Zytoplasma ist Aktin mit Myosin assoziiert. Durch Aktivierung kommt es zur Bildung von Filamenten aus Aktin und Myosin, die mit den Zellorganellen verbunden sind und diese während des Aktivierungsvorganges reorganisieren (2).

### **3. Zone der Zellorganellen**

Die Zone der Zellorganellen befindet sich im Zytoplasma. Sie besteht besteht zum größten Teil aus Mitochondrien, Glykogenspeicher und drei Formen der Speichergranula, die spezifisch für die Thrombozyten sind: dichte Granula („dense bodies“,  $\delta$ -Granula),  $\alpha$ -Granula und Lysosomen. Sie enthalten Proteine und andere Substanzen, die für die Thrombozytenfunktion unabdingbar sind. Dichte Granula enthalten niedermolekulare Verbindungen wie ATP, ADP,  $\text{Ca}^{2+}$  und Serotonin, die den Aggregationsvorgang fördern. Zahlenmäßig am häufigsten sind die  $\alpha$ -Granula, die Proteine beinhalten, welche unterschiedliche biologische Funktionen beeinflussen: Adhäsion, Aggregation, Chemotaxis, Proliferation, Inflammation und Koagulation. Lysosomale Speichergranula enthalten hydrolytische Enzyme.

### **4. Membransysteme**

Das Membransystem setzt sich aus dem offenen kanalikulären System („surface connected open canalicular system“) und dem dichten tubulären System („dense tubular system“) zusammen. Das offene kanalikuläre System besteht aus vielen gewundenen Kanälen, die weit ins Innere des Thrombozyten reichen. Sie sind mit der Plasmamembran verbunden und durch Porenöffnungen auch vom Extrazellularraum zugänglich. Das dichte tubuläre System ist einer der Hauptspeicherorte für freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, die für den Metabolismus und die aktivierende Signaltransduktion des Thrombozyten von zentraler Bedeutung sind. Sobald die zytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration eine bestimmte Schwelle überschreitet, kommt es zur Formveränderung mit Ausbildung von Pseudopodien und Degranulation. Hierbei kommt es zur Anreicherung der Mikrotubuli in den Pseudopodien und parallel dazu polymerisiert G-Aktin und bildet F-Aktin-Filamente, welches letztlich zur Stabilisierung der Plasmamembran in den Pseudopodien führt.

### 2.2.2 Thrombozytenfunktion in der primären Hämostase

#### 2.2.2.1 *Thrombozytenadhäsion*

Der erste Schritt der primären Hämostase ist durch die Adhäsion von noch ruhenden Thrombozyten gekennzeichnet (primäre Adhäsion). Durch Verletzung der Gefäßwand kommt es zur Anlagerung von aktivierten Thrombozyten an Strukturen des freigelegten Subendothels (sekundäre Adhäsion).

Im ersten Schritt interagieren Thrombozyten über den thrombozytären Rezeptor GP Ib-V-IX mit kollagenimmobilisierten von Willebrand Faktor (vWF), welches durch eine sehr hohe Affinität charakterisiert ist und besonders im arteriellen Stromgebiet zum Tragen kommt, wo hohe Scherkräfte existieren. Dieser erste Kontakt zwischen Thrombozyten und Gefäßwandläsion wird als Kontaktphase bezeichnet.

Über weitere membranständige Adhäsionsrezeptoren, welche zur Integrinfamilie gehören (Kollagen- ( $\alpha_2\beta_1$ ), Fibronektin- ( $\alpha_5\beta_1$ ) und Lamininrezeptor ( $\alpha_6\beta_1$ )), kommt es zur Stabilisierung der Thrombozytenadhäsion. Als nächstes schließt sich die Phase der Aktivierung an, in der die Bindung zwischen Kollagen und thrombozytären Kollagenrezeptoren (GPVI und  $\alpha_2\beta_1$ ) zur Formveränderung der adhärenen Thrombozyten führt, dem „shape change“. Hierbei kommt es zur Bildung von Pseudopodien, die eine Abdichtung der Leckage bewirken. Adhärenente und aktivierte Thrombozyten bilden aus

Arachidonsäure (AA) Thromboxan A<sub>2</sub>. Dies wird in den Extrazellularraum abgegeben, bindet dann an den spezifischen, thrombozytären Thromboxan - Rezeptor, wodurch der Aktivierungsvorgang verstärkt wird. Außerdem wirkt Thromboxan vasokonstriktorisch und verlangsamt dadurch den Blutstrom, sodass die Thrombusbildung begünstigt wird. Granulainhaltsstoffe wie beispielsweise das Adhäsionsmolekül P-Selektin (5) und der vWF (6) werden freigesetzt (Sekretion) und führen zur autokrinen Aktivierung und zur parakrinen Stimulation noch ruhender Thrombozyten, was letztlich zur Aggregation mit schon adhärennten Thrombozyten führt („Thrombozyten-Rekrutierung“). Diese Interaktion von noch zirkulierenden Thrombozyten mit schon adhärennten Blutplättchen wird durch den aktivierten GPIIb – IIIa – Rezeptor ermöglicht. Die Adhäsion ist beendet, wenn die Thrombozyten vollständig über dem Subendothel ausgebreitet sind, was man auch als Spreading (Spreizung) bezeichnet. Eine Läsion gegenüber dem Blutstrom ist somit nun völlig abgedichtet.

### 2.2.2.2 Sekretion der Thrombozytengranula

Während der Adhäsion beginnen Blutplättchen Granulainhaltsstoffe freizusetzen. Dieser Prozess wird auch Sekretion, Freisetzungsreaktion („Release“) oder Degranulation bezeichnet und erfolgt über 2 Wege: Die Granula können durch Verschmelzung mit dem offenen kanalikulären System ihre Inhaltsstoffe in den extrazellulären Raum abgeben. Außerdem kann durch Verschmelzung der Granulamembran mit der Plasmamembran (Exozytose) direkt die Sekretion nach außen erfolgen. Durch die Sekretion der Granula wird der Aktivierungsprozess verstärkt und die sekundäre irreversible Phase der Aggregation eingeleitet. Dieser Prozess ist von der intrazellulären Ca<sup>2+</sup> Konzentration abhängig, wobei jeder der drei Granula einen charakteristischen Schwellenwert aufweist, ab denen die Granula-Inhaltsstoffe in folgender Reihenfolge freigesetzt werden: dichte Granula, α-Granula und Lysosomen. Durch Sekretion der Granula-Inhaltsstoffe werden weitere zirkulierende Thrombozyten aktiviert und rekrutiert und durch Förderung der Fibrinbildung kommt es schlussendlich zur Konsolidierung der Plättchenthrombi. Eine Übersicht über die in den thrombozytären Speichergranula enthaltenen Inhaltsstoffe zeigt die nachfolgende Tabelle (Tabelle 1).

Tabelle 1: Inhaltsstoffe der thrombozytären Speichergranula (2)

dichte Granula	$\alpha$ -Granula	Lysosom
ATP	<b>Enzyme</b>	$\alpha$ -Arasbinoside
ADP	$\alpha$ -Antitrypsin	$\beta$ -Galactosidase
Ca <sup>2+</sup>	$\alpha$ -Makroglobulin	$\beta$ -Glucuronidase
Serotonin	$\alpha$ -Antiplasmin	N-Acetylglucosamidase
Phosphat	C1-Esterase-Inhibitor	Elastase
Guaninnukleotide	<b>Adhäsive Proteine</b>	Kollagenase
	Fibrinogen	Kathepsin
	Fibronektin	
	von-Willebrand-Faktor	
	Thrombospondin	
	Vitronektin	
	Glykoprotein IIb-IIIa	
	<b>Wachstumsfaktoren</b>	
	PDGF	
	TGF $\beta$	
	VEGF	
	<b>Zytokinähnliche Proteine</b>	
	Plättchenfaktor 4	
	$\beta$ -Thromboglobulin	
	<b>Koagulationsfaktoren</b>	
	HMWK	
	PAI-1	
	Faktor V	
	Faktor VII	
	Faktor XI	
	Faktor XIII	
	Fibrinogen	
	Protein C	

Dichte Granula enthalten vor allem ADP, ATP, Serotonin und Ca<sup>2+</sup>, von denen dem ADP eine zentrale Rolle zukommt. Ca. 50 % des in Thrombozyten vorhandenen ADP ist in den dichten Granula (*storage pool*) gespeichert, wo es nach Aktivierung der Thrombozyten freigesetzt wird und durch Bindung an dem P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor zu einer raschen intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Erhöhung, Formveränderung und reversiblen Thrombozytenaggregation führt (7, 8). Außerdem verstärkt ADP durch Bindung an den P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor die Sekretion und ist darüber hinaus an der Aufrechterhaltung der irreversiblen Thrombozytenaggregation involviert (9).

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT), das durch Vasokonstriktion in der Umgebung eines Plättchenthrombus zu einem reduzierten Blutstrom beiträgt, bindet darüber hinaus an G<sub>q</sub>-Protein-gekoppelte 5HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren und fördert zusammen mit ADP die Thrombozytenreaktivität.

Das dichte tubuläre System ist der Hauptspeicherort für Ca<sup>2+</sup>, welches im Rahmen der Thrombozytenaktivierung freigesetzt wird. Die Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung ist ein zentraler Trigger der Thrombozyten-Aktivierung, Thrombozyten-Rekrutierung und Thrombozytenaggregation (10).

Die α-Granula enthalten große Mengen adhäsiver Proteine, Wachstumsfaktoren, Gerinnungsfaktoren und Proteaseinhibitoren (siehe Tab. 1), welche unmittelbar nach Thrombozytenaktivierung freigesetzt werden. Einige α-Granula Proteine werden in den Megakaryozyten synthetisiert (Thrombospondin-1 (TSP-1), β-Thromboglobulin, Plättchenfaktor 4), andere dagegen werden aus dem Plasma aufgenommen (Immunglobuline, Fibrinogen, Fibronectin). Diverse Proteine wie z.B. P-Selektin (CD62P) sind nur auf der α-Granula Membran von ruhenden Thrombozyten zu finden. Durch die Exozytose kommt es zum Verschmelzen der α-Granula Membran mit der Plasmamembran und CD62P wird auf die Thrombozytenoberfläche exponiert. P-Selektin vermittelt die Bindung der Thrombozyten an Neutrophile und Monozyten (11). Außerdem ist P-Selektin am Rollen der Leukozyten entlang des Endothels beteiligt (12).

### *2.2.2.3 Thrombozytenaggregation*

Die Aggregation folgt der Adhäsion. Aggregation ist definiert als eine Koadhäsion zwischen 2 Thrombozyten. Man unterscheidet 2 Phasen der Aggregation: die primäre und sekundäre Aggregation. Bei der primären Aggregation kommt es zur Bildung so genannter Fibrinogenbrücken, welche die Thrombozyten locker miteinander verbinden; es bilden sich Thrombozytenmikroaggregate. Zentraler Rezeptor hierfür ist GPIIb-IIIa (α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub>-Integrin), der die aktivierten Thrombozyten über Fibrinogenbrücken verbindet. Ein ruhender Thrombozyt besitzt auf seiner Oberfläche ca. 40.000 – 50.000 GPIIb-IIIa Komplexe. Im nicht-aktivierten Zustand kann dieses Integrin keine löslichen Liganden wie z.B. Fibrinogen, vWF, TSP-1, Fibronectin oder Vitronectin binden. Stimulierung des Thrombozyten führt durch Exozytose der α-Granula zur Zunahme der GPIIb-IIIa Moleküle

und zur Aktivierung des Oberflächen-exponierten GPIIb-IIIa, wodurch lösliche Liganden binden können. Auf der anderen Seite fungiert auf stimulierten Thrombozyten immobilisiertes Fibrinogen als Adhäsionsmolekül für ruhende Thrombozyten über den GPIIb-IIIa Rezeptor und verstärkt dadurch die primäre Aggregation (13). Die Interaktion zwischen GPIIb-IIIa und seinen Liganden führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und resultiert in einer festen Bindung. Fibrinogen verbindet diskoide Thrombozyten während des initialen Thrombozyten-Thrombozyten Kontakts. Unter Bedingungen mit hohem Scherstress, z.B. in Arteriolen oder stenosierten Arterien, kann die Thrombozytenaktivierung/-aggregation durch den Scherstress selbst ausgelöst werden. In diesem Fall adhären die Thrombozyten zunächst über die vWF - GPIb/V/IX Interaktion an der Oberfläche, worauf es zur Aktivierung des GPIIb-IIIa Rezeptors (inside-out signaling) und zu stabilen vWF-vermittelten Thrombozytenaggregaten (14).

### 2.2.3 Thrombozytäre Membranglykoproteine

Die thrombozytären Funktionen während der Hämostase setzen ein enges Zusammenspiel zwischen Thrombozyten, Endothel, Strukturen der Gefäßwand (extrazelluläre Matrix) und plasmatischen Gerinnungsfaktoren voraus. Thrombozytäre Membranrezeptoren, auch Adhäsionsrezeptoren genannt, ermöglichen den Kontakt untereinander (z. B. GPIIb-IIIa), mit der subendothelialen Matrix (z. B. vWF-Rezeptor, Kollagenrezeptor), mit plasmatischen Gerinnungsfaktoren (z. B. vWF-Rezeptor), mit Endothelzellen (z. B. GPIIb-IIIa) oder Leukozyten (z. B. P-Selektin). Man unterteilt diese Rezeptoren gemäß ihrer Molekülstruktur in vier Gruppen: Integrine, leuzinreiche Glykoproteine, Selektine und Rezeptoren vom Immunglobulintyp.

#### 2.2.3.1 Glykoprotein (GP) IIb-IIIa (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ )

Das Glykoprotein (GP) IIb-IIIa (Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , CD41/CD61), auch als Fibrinogenrezeptor bezeichnet, ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges Heterodimer, das als integraler Proteinkomplex in der thrombozytären Membran verankert ist (15). GPIIb-IIIa gehört zu den Integrinen, einer Familie von Adhäsions- und Aggregationsrezeptoren und ist einer der wichtigsten Rezeptoren auf den Thrombozyten innerhalb der Hämostase (16). Der GPIIb-IIIa-Komplex teilt seine  $\beta$ -Untereinheit mit dem weit verbreiteten Vitronektin-Rezeptor  $\alpha_v\beta_3$ ,

jedoch ist die  $\beta$ -Untereinheit im Komplex mit GPIIb anders glykosyliert als bei der Koexpression mit der  $\alpha$ -Untereinheit (17, 15). Mit einer Oberflächenbesetzung von etwa 50.000 Rezeptoren pro Thrombozyt ist es zugleich das häufigste thrombozytäre Membranprotein (18–21) und stellt einen 1,5% bis 2% Anteil am thrombozytären Gesamtprotein (22). Nur ca. 70% der Rezeptoren sind auf der Oberfläche bei einem ruhenden Thrombozyten lokalisiert. Die verbleibenden 30% befinden sich im offenen kanalikulären System und der  $\alpha$ -Granula Membran und werden erst nach der Thrombozytenaktivierung zugänglich, bei der diese Membransysteme durch den Formwandel („shape change“) nach außen gekehrt werden, und die Granula mit der Oberflächenmembran verschmelzen (23–25).

Die Aktivierung der Thrombozyten durch verschiedene Agonisten (u. a. Adenosindiphosphat (ADP), Kollagen, Thrombin) führt zu einer Konformationsänderung des GPIIb-III-Komplexes. Dieser kann, in seinem aktivierten Zustand, als Rezeptor für unterschiedliche, lösliche Adhäsionsproteine (Fibrinogen, Fibronectin, von-Willebrand-Faktor (vWF) und Vitronectin) dienen (26). Fibrinogen und vWF enthalten eine RGD-Tripeptidsequenz, welche vom  $\alpha_{IIb}\beta_3$  erkannt wird, und sind somit maßgeblich an der direkten Thrombozytenaggregation beteiligt. Das Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  erkennt spezifisch RGD-Sequenzmotive und bindet an die  $\gamma$ -Dodecapeptidsequenz, die sich an den distalen, C-terminalen  $\gamma$ -Untereinheiten des dimeren Fibrinogens befindet. Die große Distanz zwischen den beiden Bindungsregionen am Fibrinogen, von ca. 440 Å, ermöglicht die Vernetzung von Thrombozyten und resultiert in der Thrombozytenaggregation und schließlich der Thrombusbildung (27). Die Bindung von Fibrinogen führt weiterhin zu einer Konformationsänderung im Rezeptor, welche die Bildung von GPIIb-IIIa-Clustern ermöglicht mit nachfolgender Aktivierung und Kontraktion des Zytoskelötts (*Outside-in-Signaling*) (28).

Die Ligandenbindung des  $\alpha_{IIb}\beta_3$  wird durch die Zusammenlagerung der  $\beta$ A-Domäne der GPIIIa-Untereinheit und der  $\beta$ -Propeller-Region der GPIIb-Untereinheit ermöglicht und ist von divalenten Kationen wie  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  abhängig. Ein konserviertes Motiv, die *Metal Ion Dependent Adhesion Site* (MIDAS), das Kationen bindet, ist in beiden Untereinheiten zu finden.

### 2.2.3.2 Granuläre Membranproteine

#### 2.2.3.2.1 P-Selektin (CD62P)

Eine weitere Familie thrombozytärer Membranrezeptoren bilden die Selektine, deren Molekülstruktur eine extrazelluläre Lektindomäne mit einer benachbarten „Epidermal growth factor-like“-Domäne aufweist (5, 29–35). Selektine sind vaskuläre Adhäsionsrezeptoren die heterotypische Zell-Zell-Interaktionen vermitteln. Thrombozyten besitzen das P-Selektin, welches auch bei Endothelzellen vorkommt. P-Selektin liegt in den thrombozytären  $\alpha$ -Granula und in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen gespeichert vor und wird nur bei Aktivierung an der Oberfläche auf beiden Zelltypen exprimiert. Es spielt eine zentrale Rolle bei der sekundären Hämostase und bei vaskulären Reparaturvorgängen. Es fördert die Anlagerung von Leukozyten an der Endothelläsion und induziert die inflammatorische Rekrutierung der Leukozyten (36). Zudem vermittelt es Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten (36, 37).

#### 2.2.3.2.2 Lysosomale Membranglykoproteine (LAMP-1, LAMP-2 u. LAMP-3)

Lysosomen sind eukaryotische Zellorganellen, deren Hauptfunktion die Degradation von extrazellulärem Material darstellt. Außerdem verdauen sie durch Autophagozytose kleinere Anteile intrazellulären Materials (38). Des Weiteren können Lysosomen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig mit der Plasmamembran verschmelzen und dadurch einen Membranschaden reparieren (39). Charakteristische Merkmale der Lysosomen sind ein saurer pH-Wert (ca. 4.8), der ein optimales Milieu für die lysosomalen Enzyme darstellt, und eine dichte Verteilung an hoch glykosylierten, integralen Membranproteinen, wie z.B. LAMP-1, LAMP-2 und LAMP-3 (40, 41). Die thrombozytären Lysosomen ähneln den lysosomalen Granula in anderen Zellen und sind vorwiegend mit sauren Hydrolasen, Kathepsinen, Elastase und Kollagenase beladen. Die lysosomalen Hauptmembranproteine sind hier ebenfalls LAMP-1, LAMP-2 und LAMP-3.

CD63 (alternative Namen Granulophysin, Lysosomal-associated membrane protein 3, LAMP-3, Tspan-30, LIMP) ist ein aus 238 Aminosäuren bestehendes Oberflächenprotein aus der Gruppe der Transmembran-4-Superfamilie (TM4SF), auch als Tetraspanine bekannt (42). Als Tetraspanin ist CD63 ein Transportprotein mit 4 sich wiederholenden transmembranen Regionen und 3 N-Glykosylierungsstellen. CD63 liegt mit einem



anderen Tetraspanin CD9 und dem GPIIb-IIIa als Komplex auf der Membran aktivierter Thrombozyten vor und wird als Modulator beim Integrin-Signaling diskutiert (43). Zu seinen weiteren Interaktionspartnern gehören Integrine ( $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$ , LFA-1 und  $\beta 2$  (45–47)), andere Tetraspanine (CD81, CD82, CD151) (49–51), Oberflächen-Rezeptoren (MHCII, CD3 (52), Fc $\epsilon$ RI (53), CXCCR4 (54), Kinasen (48), Adaptorproteine (AP-2, AP-3, AP-4 (55) und weitere Proteine, z.B. L6 Antigen (56), Syntenin-1 (57), TIMP-1 (58), H,K-ATPase (59) und MT1-MMP (60).

Ursprünglich wurde es in Lysosomen von nicht aktivierten Thrombozyten und in Melanomzellen entdeckt (44). Auf der Thrombozytenmembran von nicht aktivierten Thrombozyten kann LAMP-3 (CD63) nicht nachgewiesen werden. Es findet sich aber zusammen mit LAMP-2 (CD107b) auch in der dichten Granula (*dense bodies*) von Thrombozyten, wo es durch eine starke Thrombozyten-Aktivierung, z. B. durch Thrombin, auf die Thrombozytenmembran präsentiert wird. Daher stellt CD63, dessen Funktion innerhalb des Thrombozyten noch vollständig unbekannt ist, einen hervorragenden Marker zur Identifizierung von aktivierten Thrombozyten dar.

Dagegen findet sich LAMP-1 innerhalb der Zelle fast ausnahmslos in lysosomalen Membranen (61). Eine aktivierungsabhängige Translokation an die Zelloberfläche wurde zuerst auf Thrombozyten, später auch auf Monozyten, zytotoxischen T-Zellen und FMLP-aktivierten neutrophilen Granulozyten beobachtet (62).

## **2.3 Hereditäre Thrombozytopathien**

### **2.3.1 Glanzmann-Thrombasthenie**

Glanzmann Thrombasthenie (GT) ist ein autosomal-rezessiv vererbtes Blutungssyndrom, welches durch eine funktionelle Störung oder das Fehlen des Fibrinogenrezeptors GPIIb-IIIa (Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) auf der Oberfläche der Thrombozyten ausgelöst wird und dazu führt, dass die Aggregation der Thrombozyten ausbleibt (63).

Betroffene Patienten leiden an einer verstärkten Blutungsneigung, häufig in Form von Schleimhautblutungen, z.B. Epistaxis oder Zahnfleischbluten, sowie verstärkter Hämatom-neigung, Menorrhagien bis hin zu lebensbedrohlichen Blutungen nach Operationen und Geburten. Die Schwere der Blutungsneigung ist variabel und hängt von

der Art des Rezeptordefektes ab. Während einige Betroffene nur unter leichten Blutungen leiden, erleiden andere potentiell letale Hämorrhagien. Das spontane Auftreten von Hämatomen und Gelenkeinblutungen, wie es bei Gerinnungsstörungen (z.B. Hämophilie A und B) häufig der Fall ist, wird in der Regel nicht beobachtet (64).

Auslöser des Defektes sind Mutationen in den codierenden Bereichen des Fibrinogenrezeptors GPIIb-IIIa.

GT-Patienten zeigen verlängerte *in vivo* Blutungszeiten (Normbereich: 5 - 8 Minuten) bei normaler Anzahl, Größe und Form der Thrombozyten. Die ADP- und Kollagen induzierten Aggregationen *in vitro* sind vermindert, bzw. es kommt im Fall der Adenosindiphosphat (ADP)-induzierten Aggregation zu einer Desaggregation. Die Ristocetin-induzierte Agglutination der Thrombozyten durch den vWF ist unauffällig. Die Gerinnungsparameter der plasmatischen Gerinnung sind normal.

GT wird in drei Gruppen, abhängig von der Rezeptorzahl, unterteilt. (Tabelle 2)

Tabelle 2: Glanzmann Thrombasthenie-Typisierung. Modifiziert nach Nurden (2006). (64)

	GPIIb-IIIa-Rezeptorbesatz	Anteil der Patienten
Typ I	< 2%	75%
Typ II	<20%	16%
Typ III (Variante)	>20%	9%

GT gehört mit einer Häufigkeit von 1:100.000 zu den seltenen Erbkrankheiten und tritt bei Männern und Frauen gleich häufig auf. Die Diagnose wird meistens vor dem fünften Lebensjahr gestellt.

Trotz großer Schwankungen betreffend die Schwere und Häufigkeit der auftretenden Blutungen werden diese meist mit Bluttransfusionen oder Thrombozytenkonzentraten behandelt. Die Effektivität dieser Behandlung ist jedoch durch die Antikörperbildung bei 15-30% der Patienten eingeschränkt. Werden Isoantikörper gebildet, sind weitere Transfusionen nutzlos und scheiden als Behandlungsmethode aus.

Seit 2004 wird der rekombinante Faktor VIIa (NovoSeven®) sehr erfolgreich zur Behandlung von Glanzmann Thrombasthenie eingesetzt und repräsentiert somit eine Alternative für das schnelle Stillen von Blutungen. Besonders nützlich erweist sich diese

Methode bei Patienten die bereits Antikörper gebildet haben oder sich im Refraktärzustand befinden.

Lokale Blutungen können in der Regel mit lokalen Maßnahmen behandelt werden, wie z.B. Fibrin-Abdichtungen (engl. *Fibrin sealant*). Epistaxis und Zahnfleischbluten können in den meisten Fällen durch Nasen-Tamponaden oder mit, in Thrombin getränktem, Gel-Schaum gestillt werden. In einzelnen Fällen wurden Knochenmark-Transplantationen durchgeführt, was zum vollständigen Abklingen der Krankheit führte (1).

Die Häufigkeit der Blutsverwandtschaft in betroffenen Familien ist auffällig. Die Inzidenz von GT ist in Kulturen, in denen die Heirat unter nahen Verwandten ein akzeptierter Brauch ist, deutlich erhöht. Daher ist in einigen ethnischen Gruppen, wie z.B. Süd-indischen Hindus, irakischen Juden, französischen Zigeunern und jordanischen Nomaden-Stämmen, GT eine häufig auftretende Erkrankung. Aus diesem Grund kann keine weltweite Prävalenz angegeben werden (64).

### 2.3.2 Storage-Pool-Erkrankungen

Ende der 60er Jahre beschrieben Hardisty u. Hutton sowie Weiss unabhängig voneinander eine Störung in der Sezernierung von Thrombozyteninhaltsstoffen bei Patienten mit einer angeborenen Blutungsneigung (65, 66). Die Patienten zeigten eine gestörte Kollagen-, ADP- und Adrenalin-induzierte Thrombozytenaggregation, wobei man annahm, dass die Störung der Thrombozytenaggregation durch eine defekte Freisetzung von ADP bedingt sei. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass bei Patienten der nicht metabolische ADP-Speicher in den „dense bodies“ vermindert war, was zur ursprünglichen Krankheitsbezeichnung „storage pool disease“ führte. Weitere Untersuchungen zeigten eine große Heterogenität des Defekts sowie ähnliche Befunde bei Patienten mit angeborenen thrombozytären Erkrankungen, wie dem Hermansky-Pudlak-Syndrom und dem Chediak-Higashi-Syndrom, sowie bei erworbenen Thrombozytopathien, die zum Beispiel bei myeloproliferativen Erkrankungen oder bei disseminierter intravasaler Gerinnung auftreten. Einige Patienten zeigten ähnliche Symptomatik auch für andere Speicherorganellen, den  $\alpha$ -Granula, worauf die später geprägte Bezeichnung „storage pool deficiency“ (SPD) auf alle Störungen ausgedehnt wurde, welche durch eine Verringerung der in thrombozytären Speicherorganellen

gespeicherten Substanzen gekennzeichnet sind. Mittlerweile werden 3 Verschiedene Formen des SPD unterschieden. Das  $\alpha$ -SPD bezeichnet eine isolierte Verminderung der  $\alpha$ -Granula und deren Inhaltsstoffe, das  $\delta$ -SPD eine entsprechende Verminderung der dense bodies und ihrer Inhaltsstoffe, und das  $\alpha\delta$ -SPD stellt eine Kombination beider Defekte dar.

### 2.3.2.1 $\alpha$ -Storage-Pool-Defekte

Die  $\alpha$ -Storage-Pool-Erkrankung beruht auf eine Verminderung oder Fehlen der  $\alpha$ -Granula und ihrer Inhaltsstoffe. Da bei Patienten mit einem  $\alpha$ -SPD die Thrombozyten sich im panoptischen Ausstrich wenig anfärben lassen und grau erscheinen, wurde der Begriff „Grey-platelet-Syndrom“ (GPS) für dieses Krankheitsbild geprägt, welches erstmals 1971 von Raccuglia beschrieben wurde (67). Genetisch gesehen basiert diese Erkrankung auf einer Mutation des Neurobeachin-like 2 (NBEAL2)-Gens auf Chromosom 3 (3p21), die autosomal rezessiv vererbt wird (68, 69). Das NBEAL2-Protein ist vermutlich an der Vesikelübertragung in Megakaryozyten beteiligt und entscheidend für die Ausbildung der  $\alpha$ -Granula (70). Neben einer Blutungsneigung ist das GPS häufig mit einer Myelofibrose und Splenomegalie assoziiert. Darüber hinaus gibt es weitere in Mutationen in Genen der Transkriptionsfaktoren *growth-factor-independence-1b* (GFI1B) und GATA1, die einen thrombozytären  $\alpha$ -Granula Mangel verursachen, die jedoch autosomal dominant bzw. x-chromosomal vererbt werden (71).

Der zunehmende Einsatz der Hochdurchsatz-Sequenzierung zur Identifikation neuer Gene, die an der Biogenese der  $\alpha$ -Granula involviert sind, wirft die Frage auf, ob das GPS durch verschiedene Gendefekte der  $\alpha$ -Granula verursacht werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine *gain-of-function* Mutation in der Tyrosinkinase Src nicht zum klassischen GPS führt, aber eine GPS-ähnliche Erkrankung verursacht (72). Es wurde eine Mutation identifiziert, die zu einem Aminosäureaustausch (E527K) in der SRC führt und mit einer gesteigerten SRC Aktivität einhergeht, die eine erhöhte Tyrosin-Phosphorylierung zur Folge hat, insbesondere in den Megakaryozyten und Thrombozyten. Ferner führte die E527K Variante der SRC zu einer defekten Prothrombozyten-Bildung und zu mehr unreifen Megakaryozyten. Zudem präsentierten sich die Megakaryozyten mit einer veränderten Organisation des Aktin-Zytoskeletts,

welches zum  $\alpha$ -Granula Defekt beitragen könnte. Obwohl die Thrombozyten der Patienten mit der E527K Variante einen GPS-ähnlichen Phänotyp ( $\alpha$ -Granula-Mangel, verminderter  $\alpha$ -Granula-Inhalt, Dysfunktion) aufwiesen, so war die Anwesenheit von ungewöhnlich großen und kleinen Thrombozyten ohne Granula jeglichen Typs und keine inneren Membranen nicht typisch für ein klassisches GPS.

Die Blutungszeit ist meist verlängert, die Thrombozytenzahl leicht bis mäßig verringert und die Thrombozyten sind vergrößert (keine Riesenthrombozyten). Das Fehlen der  $\alpha$ -Granula und deren Inhaltsstoffe führt zu einer Störung der Thrombozytenaggregation nach Stimulierung mit ADP, Epinephrin, Thrombin oder Kollagen (73). Elektronenmikroskopisch lässt sich der  $\alpha$ -Granula-Defekt ebenso nachweisen wie die Verminderung der  $\alpha$ -Granula-Proteine durch immunoelektrophoretische Verfahren.

Ein Synthesedefekt der  $\alpha$ -Granulaproteine, welche in den „grey platelets“ nur in geringer Konzentration vorhanden sind, konnte ausgeschlossen werden, da verschiedene typische solcher Proteine im Plasma in normalen Konzentrationen vorhanden sind. Man geht davon aus, dass die endogen synthetisierten sekretorischen Proteine von den Megakaryozyten nicht in die  $\alpha$ -Granula transferiert und dort gespeichert werden können, wodurch sie nicht vor einer vorzeitigen Diffusion aus den Zellen geschützt sind und ihre intrazelluläre Konzentration abnimmt (74). Zu den in den Granula gespeicherten Proteinen gehören auch der von den Megakaryozyten synthetisierte Wachstumsfaktor „megakaryocyte-derived growth factor“ (MK-DGF) bzw. „platelet-derived growth factor“ (PDGF) und der „megakaryocyte factor 4“ (MK-F4) bzw. PF4, welche bei GPS-Patienten nicht in den  $\alpha$ -Granula gespeichert werden, wodurch es zu einer vorzeitigen Freisetzung im Knochenmark mit einer Stimulation der Fibroblasten und einer Hemmung der Kollagenase kommt. Dieser Mechanismus könnte in Analogie zu den myeloproliferativen Erkrankungen oder der Haarzell-Leukämie die Entstehung der beim GPS auftretenden Myelofibrose verursachen (73).

Die milde Form der SPD ist nicht therapiebedürftig. Die Therapien mit Tranexamsäure, Desmopressin (Desamino-1-Cystein-8-D-Argininvasopressin, DDAVP), rekombinantem Faktor FVIIa (rFVIIa) oder Thrombozytentransfusionen sprechen bei Patienten mit SPD

nicht gleich gut an. Stammzell- oder Knochenmarkstransplantationen sind schweren Formen vorbehalten.

### 2.3.2.2 $\delta$ -Storage-Pool-Defekte

Beim isolierten  $\delta$ -SPD liegt, bedingt durch eine Störung der dichten Granula, eine Verminderung der Granula oder der in den dichten Granula gespeicherten intrathrombozytären Inhaltsstoffen vor. Sie gehört zu den häufigsten thrombozytär bedingten hämorrhagischen Diathesen und zeigt eine unterschiedliche klinische Symptomatik, welche von asymptomatischen Formen bis hin zur Entwicklung von lebensbedrohlichen Blutungskomplikationen reicht. Typisch sind eine verstärkte Hämatomneigung, verlängertes Nachbluten nach Bagatellverletzungen, Epistaxis, Menorrhagien, verlängerte postoperative Blutungen sowie das Auftreten einer leichten Thrombozytopenie. Das isoliert auftretende  $\delta$ -SPD folgt einem autosomal-dominanten Erbgang (75). Eine Ausnahme hiervon bildet die als autosomal-rezessiv vererbte seltene Unterform des  $\delta$ -SPD auftretenden „Empty sack-Syndrom“, wo in den Thrombozyten leere Membranen der dense bodies nachweisbar sind (76, 77).

Das Hermansky-Pudlak-Syndrom (HPS) stellt eine autosomal-rezessiv vererbte Stoffwechselerkrankung dar, welche sich durch einen tyrosinasepositiven okulokutanen Albinismus, eine durch  $\delta$ -SPD verursachte hämorrhagische Diathese sowie durch die Akkumulation von zeroidähnlichem Material in verschiedenen Geweben zeigt (78, 79). Im Gegensatz zu den häufiger vorkommenden isolierten  $\delta$ -SPD, handelt es sich beim HPS um eine syndromale Form (80). Verantwortlich für die Entstehung des Syndroms sind Mutationen in sogenannten „*biogenesis of lysosome-related organelles complex*“-Genen (BLOC-Gene). Es gibt mehrere BLOC-Gene, die auf verschiedenen Chromosomen und Genloci liegen. Derzeit sind mindestens 10 genetische HPS Subtypen bekannt (81–84). Die Blutungssymptomatik zeigt eine große Heterogenität, tödlich verlaufende Blutungen kommen jedoch selten vor. Die Thrombozyten-Konzentration liegt im Normbereich, einzusätzliches  $\alpha$ -SPD liegt nicht vor.

Heterozygote Individuen zeigen keine klinische Symptomatik, haben eine normale Pigmentierung und zeigen keine Blutungsneigung. Blutungszeit und intrathrombozytäre

Adenosinnukleotid-Konzentrationen liegen im Normbereich, doch liegt eine statistisch signifikante Erniedrigung des intrathrombozytären Serotoningehaltes vor.

Das Chediak-Higashi-Syndrom (CHS) stellt eine seltene, autosomal-rezessive Krankheit dar, welche sich durch einen partiellen okulokutanen Albinismus, eine erhöhte Anfälligkeit für bakterielle Infektionen, eine Neutropenie sowie einer hämorrhagischen Diathese zeigt und eine hohe Sterberate schon in Kindesalter verursacht. Zugrunde liegen Mutationen im CHS1-Gen, auch als "lysosomal trafficking regulator" (LYST) bekannt. Es liegt auf Chromosom 1 an Genlokus 1q42.1 bis q42.2. Die Mutationen sind verantwortlich für eine fehlerhafte mikrotubuläre und lysosomale Funktion (85). Im späten Krankheitsverlauf, im Zusammenhang mit der Entstehung einer Thrombozytopenie, treten Epistaxis, petechiale Blutung, Ekchymosen und gastrointestinale Blutungen als Symptome aufgrund des vorliegenden  $\delta$ -SPD auf (86). Bei CHS-Patienten ist der Schweregrad des  $\delta$ -SPD recht unterschiedlich, die intrathrombozytäre ADP-Konzentration reicht von fast Normwerten bis hin zur ausgeprägten Erniedrigung (87). Im elektronenmikroskopischen Bild ist eine verminderte Anzahl an dense bodies nachzuweisen, was für eine Bildungsstörung der dense bodies als Ursache des  $\delta$ -SPD spricht und nicht auf einer Störung des intrazellulären Processing der Inhaltsstoffe beruht (88). Während in den betroffenen Zellen hauptsächlich eine Störung der Membranfusion der Lysosomen der CHS-Patienten zu beobachten ist, betrifft interessanterweise in den Thrombozyten die Störung vorwiegend die dense bodies (85, 89).

#### **2.4 *Phenotyping* und *Genotyping* von hereditären Thrombozytopathien**

Angeborene Thrombozytenfunktionsstörungen (IPFDs) machen einen Großteil der kongenitalen Gerinnungsstörungen aus. Sie sind aber bisher nach wie vor noch kaum verstanden und stellen oft eine Herausforderung für die Diagnostik dar, insbesondere bei Patienten mit moderaten Störungen. Umso wichtiger ist ein rationales diagnostisches Vorgehen bei der Diagnose der meisten IPFD, basierend auf einer standardisierten Abfolge von Laboruntersuchungen mit konsekutiven, immer komplexer werdenden Schritten.

#### 2.4.1 *Phenotyping* von Thrombozytopathien

Der erste Verdacht für das Vorliegen einer Thrombozytenfunktionsstörung resultiert aus der klinischen Anamnese, aber zur endgültigen Diagnosestellung bedarf es der labordiagnostischen Untersuchung der Pättchenfunktion (90–92). Historisch betrachtet war die *in vivo* Blutungszeit der am häufigsten verwendete Test, allerdings wird sie aufgrund der schlechten Standardisierbarkeit und großer intra- und interindividueller Schwankungen nicht mehr empfohlen (93, 94). Goldstandard der Thrombozytenfunktionsdiagnostik ist auch nach über 40 Jahren seit der Erstbeschreibung durch Born die Lichttransmissionaggregometrie (LTA) (95). Die eingeschränkte Standardisierbarkeit und eine große Auswahl an Agonisten und deren Konzentrationen haben diese Methode in der Vergangenheit auf die Verwendung in spezialisierten Laboren eingeschränkt (96).

Eine Variation der LTA ist die luminometrische Bestimmung der ATP-Freisetzung. Mit dieser durch Lundin et al. erstmals beschriebenen Methode wird die thrombozytäre ATP-Freisetzung gemessen, wodurch Sekretionsdefekte der  $\delta$ -Granula ( $\delta$ -SPD) identifiziert werden können. Die Diagnose des HSP und anderen  $\delta$ -Granula Sekretionsstörungen ist allein auf Grundlage der Thrombozytenaggregation nicht möglich, da alle für gewöhnlich eingesetzten Thrombozytenagonisten in hohen Konzentrationen zu einer vollen Aggregation führen können, trotz fehlender Sekretion (93, 97). Es sollte auch bedacht werden, dass eine gestörte ATP- Sekretion sowohl durch abnorme Granulabildung als auch defekte Trafficking-Prozesse der Granula bedingt sein können. Daher sind zusätzliche Untersuchungen wie die Elektronenmikroskopie, Serotonin-Aufnahme und die Bestimmung des ATP-Gehalts erforderlich, um zwischen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden.

Eine große Herausforderung bei der Untersuchung von PFDs und Verwendung der Lumiaggregometrie ist die bei gesunden Probanden beobachtete große Variation (98, 99). Daher ist es auch schwierig Werte von Patienten mit denen von tagesgleichen gesunden Probanden zu vergleichen, wenn keine lokal erhobenen Normbereiche existieren (93).

In der GAPP Studie konnte gezeigt werden, dass bestimmte Konzentrationen von Thrombozytenagonisten zur Unterscheidung von PFDs eingesetzt werden können, wie z.B. 10  $\mu$ M ADP, 1 mM Arachidonsäure und 3  $\mu$ g/ml Kollagen, die bei gesunden



Probanden eine volle Aggregation auslösen (100). Andere Faktoren, die das Reaktionsverhalten beeinflussen können, sind z.B. die Thrombozytenzahl, obgleich bei einer Thrombozyten-Konzentration im Bereich von  $1.5 - 6 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  keine signifikanten Unterschiede in PRP beobachtet wurden (98, 101, 102). Dagegen muss bei der ATP-Messung die Thrombozyten-Konzentration eingestellt werden, da der ATP Gehalt abhängig ist von der Thrombozyten-Konzentration (103). Bei einer Thrombozyten-Konzentration von unter  $1.5 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  ist zur Beurteilung der Thrombozytenfunktion die Durchflusszytometrie die Methode der Wahl, um festzustellen, ob neben einer Thrombozytopenie zusätzlich ein qualitativer Defekt vorliegt (104).

Watson et al. untersuchte in einer Studie bei Patienten mit klinischer Blutungsanamnese bei normalen Gerinnungsparametern und Verdacht auf PFD die Thrombozytenfunktion (105). Es wurden Patienten mit normalen Thrombozyten-Konzentrationen eingeschlossen. Patienten mit bekannter PFD wurden ausgeschlossen, wie auch Patienten mit Glanzmann Thrombasthenie, Bernard-Soulier Syndrom, May-Hegglin Anomalie und Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS). Jeder Patient wurde mit Hilfe der Lumi-Aggregometrie (insgesamt 9 Agonisten) untersucht und in einigen Fällen wurden zusätzliche Tests wie die Durchflusszytometrie oder Bestimmung der cAMP-Level angewendet, um weitere Informationen zu gewinnen. Insgesamt wurde bei 58 % der insgesamt 350 untersuchten Patienten eine Störung der Thrombozytenfunktion nachgewiesen. Bei 70 % der Patienten war der Defekt auf eine gestörte Sekretion der  $\delta$ -Granula, dem  $G_i$ -Signalweg oder Arachidonsäuremetabolismus (Cyclooxygenase-Stoffwechsel) zurückzuführen. Außerdem konnte bei einigen Patienten eine Mutation im Gen des  $P2Y_{12}$  ADP Rezeptors und Thromboxan Rezeptor nachgewiesen werden. Eine wichtige Erkenntnis dieser Studie war, dass sich ein Großteil der Patienten mit Störungen bzgl. der Thrombozyten-Aktivierung zugrundeliegenden Stoffwechselwege präsentierten, nämlich der beiden Feedback-Agonisten ADP und Thromboxan-A<sub>2</sub>, und der  $\delta$ -Granula Sekretion.

Dass bei über 40 % der Patienten kein Defekt nachgewiesen wurde, könnte an verschiedenen Faktoren liegen:

- mangelnde Sensitivität in der Lumiaggregometrie

- bei milden Defekten Überschneidung der Antwort mit der von Kontrollen
- der Defekt ist nur in Adhäsionsassays detektierbar, insbesondere unter Flussbedingungen
- Blutung, die durch einen anderen Defekt des hämostatischen Systems verursacht wird

#### 2.4.2 *Genotyping* von Thrombozytopathien

Die wahrscheinlichste Ursache für eine Störung der Thrombozytenfunktion ist eine Mutation in ein oder mehreren Genen (pathogene Gen-Variante(n)), die für die Megakaryozyten-Entwicklung, Thrombozytenbildung oder Thrombozytenfunktion verantwortlich sind. In der Regel ist die Bestimmung der krankheitsverursachenden Mutation schwierig, da es eine ganze Fülle von Kandidatengenen gibt und in den meisten Fällen werden PFDs durch eine Kombination von angeborenen und erworbenen Defekten beeinflusst. Einige Störungen werden erst im Rahmen von operativen Eingriffen oder Entbindungen aufgedeckt und es ist oft unmöglich die Erkrankung einer einzigen ursächlichen Mutation zuzuschreiben. Die unvollständige Penetranz von Blutungen zwischen Familienmitgliedern erschwert die Durchführung von genetischen Studien, auch wenn die genetische Analyse von Familienmitgliedern ohne Blutungsereignisse dabei helfen kann Kandidatengene auszuschließen.

Unter Berücksichtigung dieser Punkte kann das Phenotyping für die Suche von Kandidatenmutationen eingesetzt werden. Dabei wird die Suche nach Mutationen durch verschiedene Faktoren beeinflusst, z.B. Konsanguinität der Eltern, Nachweis autosomal dominanter Erb-Muster und die Erscheinungsform der Thrombozytenfunktion. Derzeit ist es am vielversprechendsten, Mutationen bei Patienten mit eindeutigem Vererbungsmuster, z.B. einer Thrombozytopenie oder bei Umständen, die mit anderen phänotypischen Veränderungen einhergehen, z.B. beim HPS, zu identifizieren.

Die Entwicklung der Next-Generation Sequencing (NGS)-Technologie hat das Sequenzieren großer Mengen genomischer DNA revolutioniert (siehe nächstes Kapitel) (106). Heute ist es bereits möglich, ein komplettes Exom und sogar ein komplettes Genom zu sequenzieren. Jedoch bedeutet solch ein Umfang an genetischer Information auch, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Verarbeitung und Interpretation der

Daten und der Vergleich der DNA der Patienten mit der von entsprechenden Datensätzen ist, um die funktionsbeeinträchtigende Mutation zu identifizieren (107). Mögliche Limitationen umfassen die Referenzdatenbank selbst und die Sequenzierungsmethode (108). Bei Untersuchung der Genotyp-Phänotyp Segregation unterstützt die Sanger-Sequenzierung des Index-Patienten und wenn möglich zusätzlicher Familien-Mitglieder die Assoziation der Mutation mit der Blutungsneigung. In einigen Fällen jedoch können mehrere Kandidaten-Mutationen übrigbleiben oder die DNA von anderen Familienmitgliedern ist nicht verfügbar, sodass weitere Untersuchungen erforderlich sind, um die ursächlichen Gene zu identifizieren. In vielen Fällen bleibt die funktionelle Bedeutung der Mutation ungewiss oder die Rolle des in der Thrombozytenfunktion implizierten Proteins ist unbekannt. Daher kann es erforderlich sein, das Protein in eine geeignete Zelllinie zu exprimieren und dessen Funktion zu analysieren. Dies ist vor allem bei unklaren Konstellationen wichtig, da auch bei gesunden Probanden fast 100 *Loss-of-function* Mutationen in heterozygoter Form bekannt sind, die sich jedoch kaum oder gar nicht phänotypisch auswirken (109). Die Herausforderung liegt daher in der Unterscheidung zwischen Mutationen, die zum Phänotyp der Thrombozyten und zur Blutungsneigung beitragen, und Mutationen, die keinen Effekt auf die Thrombozytenfunktion haben.

### 2.4.2.1 Next Generation Sequencing (NGS)

Unter dem Namen Next Generation Sequencing (NGS) werden einige neuartige genanalytische Verfahren zusammengefasst, die eine sehr große Anzahl von DNA-Molekülen parallel sequenzieren können. Der Einsatz von NGS für diagnostische Zwecke gilt als besonders vielversprechend. Prinzipiell werden beim NGS verschiedene Methoden der so genannten klonalen Amplifikation eingesetzt, um Millionen von DNA-Fragmente gleichzeitig zu vervielfältigen („massively parallel“). Die Stärke des NGS beruht somit auf dem hohen Durchsatz, der imstande ist, 10 Gigabasen oder mehr an Sequenz in einem einzigen Lauf zu erzeugen. Im diagnostischen Kontext kommen derzeit zwei Anwendungsprotokolle in Frage: Beim „target enrichment“ wird bereits die Anreicherung und Vervielfältigung der Patienten-DNA gezielt auf diejenigen Gene beschränkt, die aufgrund der klinischen Symptomatik des Patienten bzw. der Verdachtsdiagnose des Arztes in Frage kommen. Nur diese Gene werden nachfolgend auch analysiert. Beim Whole Exome Sequencing“ (WES) erfolgt eine ungezielte

Anreicherung und Sequenzierung aller kodierenden Bereiche des Genoms (diese werden als Exom zusammengefasst). Beim Whole Genome Sequencing" (WGS) wird das gesamte Genom sequenziert. Nach einer erfolgreichen WES bzw. WGS steht grundsätzlich die Information des gesamten Exoms bzw. Genoms zur Verfügung.

Mit der Verfügbarkeit genomischer Sequenzen sind die Analyse der genetischen Varianz und ihre Einflüsse auf Krankheitsrisiken ein wichtiges Thema in der humangenetischen Forschung. Daher wurden in der Vergangenheit genomweite Assoziationsstudien (GWAS) von SNPs mit häufigen Krankheiten oder komplexen Merkmalen vorgestellt. In einigen Fällen war dieser Ansatz zwar erfolgreich, aber dennoch scheinen die meisten identifizierten SNPs nur einen überraschend kleinen Anteil am genetischen Gesamteffekt abzubilden und ermöglichen kaum das Auffinden der zugrundeliegenden kausalen Variation (110). Ein mögliches Erklärungsmodell könnte additive wie auch interaktive aus einer Vielzahl von häufigen Varianten sein. Jede einzelne Variante würde nur einen sehr kleinen Anteil am Krankheitsrisiko beisteuern, allerdings sind solche Effekte wenig untersucht und wegen ihres extrem hohen Rechenbedarfs nur mit speziellen statistischen Methoden zu ermitteln (111). Eine alternative Erklärung für den begrenzten Erfolg von GWAS könnten seltene und unbekanntere Varianten als Ursache für ein bestimmtes Erkrankungsrisiko sein. Mit den bisher eingesetzten Arraymethoden werden nämlich nur sehr häufig auftretende SNPs mit einer Frequenz des selteneren Allels von über 5% gemessen. Das hatte zum einen praktikable technische Gründe, zum anderen wurde von der Hypothese ausgegangen, dass häufige Krankheiten durch häufige Varianten beeinflusst werden, worüber schon lange kontrovers diskutiert wird (112). Mittels NGS können nun im Prinzip alle individuellen genetischen Varianten im Erbgut erfasst werden. Das schließt sowohl seltene SNPs als auch die bisher wenig analysierten, aber möglicherweise relevanten Strukturvarianten ein.

Da zur Analyse seltener Varianten mit kleiner Effektgröße hohe Fallzahlen erforderlich sind, werden Techniken verwendet, die vorher ausgewählte genomische Regionen wie z.B. Kandidatenregionen aus GWAS anreichern. Daher ist ein Trend, die Gesamtheit der für Proteine codierenden Exonbereiche über Hybridisierungsreaktionen an Sonden und zu sequenzieren (*exome sequencing*).

Es ist hilfreich, die zu untersuchenden Proben nach strikten Kriterien auszuwählen, weil dadurch die Frequenzen der ursächlichen Varianten angereichert werden können. Zwei

## Literaturdiskussion

Strategien scheinen dabei vielversprechend, um krankheitsauslösende Varianten mit der Analyse weniger Genome aufzudecken: zum einen Ko-Segregationsanalysen von Verwandten in Familien mit mehreren betroffenen Individuen und zum anderen die Selektion von Individuen mit extrem hoher Merkmalsausprägung.

### 3 Material und Methoden

Im folgenden Abschnitt werden die in dieser Arbeit verwendeten Geräte und Materialien gelistet. Außerdem wird das Studiendesign sowie die Vorgehensweise beim Patienten und Probandeneinschluss vorgestellt. Des Weiteren werden die für die Generierung der Daten verwendeten Methoden erläutert.

#### 3.1 Geräte

*Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Geräte und Hersteller*

Gerätebezeichnung	Typ	Hersteller
Automatisches Hämatologie-Analysegerät	Sysmex KX-21N	Sysmex Deutschland GmbH (Hamburg)
BD FACS Canto	BD FACS Canto II	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Kolbenhub-Einkanalpipetten	Eppendorf Research Plus®, variabel 0,1-2,5 µl Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH Research Plus®, variabel (Wesseling) 0,5-5 µl Research Plus®, variabel 2-20 µl Research Plus®, variabel 10-100 µl Research Plus®, variabel 20-200 µl Research Plus®, variabel 100-1000 µl	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH (Wesseling)
Magnetrührer	NeoMag D-6010	NeoLab® (Heidelberg)
pH/ORP-Meter	HI 2211	Hanna Instruments GmbH

## Material und Methoden

		(Kehl am Rhein)
Präzisionswaage	CPA 1003P	Sartorius AG (Göttingen)
Tischzentrifuge	Centrifuge 5418R	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH
Vortexer	Lab Dancer S40	VWR International GmbH (Darmstadt)
Wasserbad (mit Einsätzen)	ED-AP (042) (5A max. 60°C)	Julabo GmbH (Seelbach)
Zentrifuge	Allegra X-30R (Rotoren: F2402, SX4400)	Beckmann Coulter GmbH (Krefeld)

### 3.2 Verbrauchsmaterialien

*Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Gebrauchsmaterialien*

Gerätebezeichnung	Typ	Hersteller
1,5 ml-Reaktionsgefäße	Safe Seal Gefäß (1,5 ml)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
50 ml Polypropylen- Röhrchen mit konischem Boden 5 ml Polystyrene- Röhrchen	Cellstar Tubes® 50 ml, PS	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Blutentnahmeröhrchen	Monovette® (10 ml) mit Antikoagulans: 0,106 M Citrat	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Kanüle mit Schlauch zur Blutentnahme	Safety-Multifly®-Set 21G plus Adapter 0,8x19 mm	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Latexhandschuhe	Sempercure® Premium	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG (Neuwied)

## Material und Methoden

Mikrotiterplatten	PS-Microplate, 96-wells, U-förmiger Boden	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Pipettenspitzen	Ep T.I.P.S. 50-100 µl	Fisher Scientific GmbH (Nidderau)
Pipettenspitzen	TipOne 200 µl Yellow Tip	StarLab (Hamburg)
Pipettenspitzen	TipOne 10 µl XL graduated tip	StarLab (Hamburg)
Transferpipetten	Einmal-Pasteurpipetten mit integriertem Saugball 3,5 ml	Sarstedt AG & Co. (Nürmbrecht)
Zytometer-Röhrchen	12x75 mm, Polystyrol (PS)	Ratiolab GmbH (Dreieich)

### 3.3 Reagenzien

*Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Puffer, Reagenzien, deren Stammlösung und Bezugsquelle*

Bezeichnung	(Stamm-)Lösung	Bezugsquelle
α-Thrombin (bovin)	100 U/ml in 0,9 % NaCl	Sigma-Aldrich GmbH
Adenosin 5'-diphosphat- Natriumsalz (ADP)	5 mM ADP in 0,9 % NaCl	Sigma-Aldrich GmbH
Kollagen Typ 1	1mg /ml	Probe & go Labordiagnostica
Convulxin	100 µg/ml in 0,9 % NaCl	Axxora (Lausen)
Formaldehyd	37 %(v/v)	Carl Roth (Arlesheim)
GPRP (H-Gly-Pro-Arg-Pro- NH <sub>2</sub> )	125 mM	Bachem (Bubendorf)
Mepacrine	10 mM Mepacrine in PBS	Sigma-Aldrich GmbH
PBS (phosphate buffered solution, phosphatgepufferte Salzlösung)	10x PBS-Fertigprodukt 1:10 in ddH <sub>2</sub> O; pH 7,4	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Ristocetin	15 mg/ml	Loxo



### 3.4 Antikörper

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Antikörper

Antikörper gegen	Klon	Isotyp	Konjugation	Bezugsquelle
CD62P	AC1.2	IgG1, κ	PE	BD
CD62P	AK-4	IgG1, κ	FITC	BD
PAC1	PAC-1	IgM, κ	FITC	BD
CD63	H5C6	IgG1, κ	FITC	BD
CD63	H5C6	IgG1, κ	PE	BD
CD41/CD61-PE	P2	IgG1	PE	Beckman Coulter
CD36	CB38	IgM, κ	FITC	BD
CD42a	ALMA.16	IgG1, κ	FITC	BD
CD42b	HIP1	IgG1, κ	PE	BD
CD107a LAMP1	H4A3	IgG1, κ	PE	BD
CD107b LAMP2	H4B4	IgG1, κ	FITC	BD
vWF	polyklonal	IgG	FITC	Bio-Rad

### 3.5 Software

Tabelle 7: Verwendete Programme

Software	Hersteller
APACT-L1.21c für Windows	Labor BioMedical Technologies GmbH (Ahrensburg)
BD FACSDIVA Software© Becton, Version 6.1.3	BD Bioscience (USA)
Microsoft Office 2016 für Windows: Word, Excel, PowerPoint	Microsoft Corporation (USA)
SPSS Statistics 22 v 22.0.0.0	IBM (Deutschland)

### **3.6 Studiendesign**

Bei der in dieser Arbeit beschriebenen Studie handelt es sich um eine von der Ethik-Kommission der Landesärztekammer Hessen genehmigte prospektive diagnostische Studie zur Untersuchung von Patienten mit genetisch determinierten Thrombozytopathien mittels funktioneller, zellbiologischer und genetischer Methoden.

### **3.7 Probanden und Patienteneinschluss**

#### **3.7.1 Genehmigung**

Vor Studienbeginn und Einschluss der ersten Probanden/Patienten wurde das Studienprotokoll (Studienleitung: PD Dr. C. Kirchmaier) der Ethik-Kommission bei der Landesärztekammer Hessen vorgelegt und durch dieses am 10.11.2015 genehmigt (Zeichen: FF109/2015).

#### **3.7.2 Patienten-/ Probandenrekrutierung und Ein-/ Ausschlusskriterien**

Die Rekrutierung der Patienten mit hereditären Thrombozytenfunktionsstörungen erfolgte in Kollaboration mit dem Fachbereich Hämostaseologie der DKD HELIOS Klinik Wiesbaden. Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens wurden Patienten mit Blutungsneigung und Verdacht auf eine Thrombozytopathie von Frau Dr. Manuela Krause und PD Dr. Carl M. Kirchmaier rekrutiert und aufgeklärt. Nach Aushändigung der Patienteninformation und Unterzeichnung der Einverständniserklärung durch den Patienten bzw. der Erziehungsberechtigten erfolgte die Blutentnahme.

Für die Teilnahme an dieser Studie und weitere Untersuchung der Blutproben mittels funktioneller, zellbiologischer und molekulargenetischer Methoden wurden folgende Ein- und Ausschlusskriterien definiert:

Einschlusskriterien:

- Patienten  $\geq 2$  Jahre mit hereditärer Thrombozytopathie
- vorliegende schriftliche Einwilligung (bei nicht-volljährigen Patienten Eltern)

Ausschlusskriterien:

## Material und Methoden

- Patienten die jünger als 2 Jahre sind
- Fehlendes Einverständnis
- Patienten mit bekannter Störung der plasmatischen Gerinnung (z.B. bei Erkrankungen der Leber)
- Patienten, die eine Behandlung mit Vitamin K Antagonisten, Heparin, niedermolekularen Heparin oder anderen Antikoagulanzen erhalten, die einen direkten Einfluss auf die plasmatische Gerinnung haben
- Medikation mit Thrombozytenfunktionshemmern
- Patienten mit primären malignen Erkrankungen des blutbildenden Systems (akute oder chronische Myelien)

Um einen Vergleich zu Personen ohne Thrombozytopathien beschreiben zu können, schlossen wir gesunde Kontrollgruppen in unsere Studie ein. Als Kontrollprobanden wurden gesunde Mitarbeiter des Universitätsklinikums Mainz rekrutiert. Das positive Ethikvotum der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz für die Probandenstudie „Physiologie und Biochemie der Wechselwirkung zwischen human Zellen des vaskulären Kompartiments“ lautet 837.302.12(8403-F)/2018-13290\_1-Klinische Forschung.

### 3.7.3 Datenschutz, Dokumentation und Datenspeicherung

Die Teilnahme an dieser Untersuchung war freiwillig die Zustimmung erfolgte nach der Aufklärung durch Unterschrift der Einwilligungserklärung. Patienten/Kontrollprobanden können Ihre Zustimmung jederzeit und ohne Angabe von Gründen rückgängig machen, ohne dass hieraus Nachteile für die weitere medizinische Versorgung entstehen.

Die Patienten haben das Recht Auskunft über die gespeicherten Daten zu verlangen und können auch verlangen, dass die bereits gesammelten Informationen aus der Datenbank gelöscht werden.

Alle Vorschriften über die ärztliche Schweigepflicht und den Datenschutz wurden beachtet. Auf die pseudonymisierten Daten (Kennzeichnung der Patienten im Text hier auch pseudonymisiert) und das Studienmaterial haben nur die Studienleiter und das Fachpersonal Zugriff, bei denen auch die Verantwortlichkeit des Datenschutzes liegt. Bei Widerruf werden die pseudonymisierten Daten umgehend aus der Studienausswertung

gelöscht. Dies hat aber keine Auswirkung auf die Patientenakte. Die Patientenakte wird entsprechend der gesetzlichen Aufbewahrungspflicht (ärztliche Aufzeichnungen und Untersuchungsbefunde mindestens 10 Jahre) aufbewahrt.

Die ebenfalls verschlüsselten Blutproben werden nach Beendigung der Studie oder bei Widerruf der Einwilligung vernichtet.

Mit Einwilligung zur Studienteilnahme stimmten die Patienten bzw. Probanden zu, dass ihre Daten an Dritte einschließlich Publikation in anonymisierter Form weitergegeben werden dürfen.

Eine Kopie der Patienteninformation und Einwilligungserklärung wurde dem Patienten ausgehändigt. Das Original verbleibt in der Studienstelle.

Da die vorliegende Studie vor Einführung der EU-Datenschutzgrundverordnung (DSGVO) am 25.05.2018 der Europäischen Union abgeschlossen war, wurden die neuen Datenschutzbestimmungen hier nicht angewandt.

### 3.7.4 Statistische Datenauswertung

Die in der Studie erhobenen Daten wurden zunächst in Microsoft Excel-Tabellen dokumentiert. Die Analyse und Darstellung der Ergebnisse der Studie erfolgte mit Hilfe des IBM SPSS Programms (SPSS Statistics 22 v 22.0.0.0).

Die einzelnen Parameter-Daten wurden auf Normalverteilung mit Hilfe des Kolmogorov - Smirnov Test geprüft. Dieser ergab, dass die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung keiner Gauß'schen Normalverteilung entsprachen. Aus diesem Grund wurden beim Vergleich von 2 nicht-parametrischen Datengruppen, wie in dieser Arbeit geschehen, der Mann-Whitney-Test auf Signifikanzen geprüft. Unter Berücksichtigung einer zweiseitigen Fragestellung wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit ( $p$ ) mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  angenommen, wobei ein Signifikanzniveau von  $p < 0,01$  als hochsignifikant gewertet wurde.

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) Mainz.

### **3.8 Venöse Blutentnahme**

Die Blutentnahme erfolgt im Rahmen eines routinemäßig durchgeführten Ambulanzbesuches. Es wurden zusätzlich 20 ml Blut abgenommen, die umgehend zur Aufarbeitung und Untersuchung in das hämostaseologische Speziallabor der DKD HELIOS Klinik Wiesbaden oder des Centrums für Thrombose und Hämostase (CTH) in Mainz weitergeleitet wurden.

Dabei wurde in der Regel eine Vene in der Mitte der Ellenbeuge (V. mediana cubiti, V.basilica/ cephalica antebrachii) punktiert und das Blut mithilfe von 10 ml Sarstedt-Monovetten entnommen. Die Monovetten enthielten Citrat zur Antikoagulation (finale 10,6 mM Tri-Natriumcitrat- Konzentration).

Im Anschluss an die Blutentnahme wurde ein kleines Blutbild mit Hilfe des Sysmex-Cellcounters erstellt, um einen Überblick über die wichtigsten zellulären Parameter wie beispielsweise Thrombozyten-, Leukozyten-, Erythrozytenkonzentration oder das mittlere korpuskuläre Volumen (MCV) zu erhalten.

### **3.9 Herstellung von Plättchen-reichem (PRP, „platelet-rich plasma“) und Plättchen-armen Plasma (PPP, „platelet-poor plasma“)**

#### **3.9.1 Herstellung von PRP**

Für die Gewinnung von Plättchen-reichem Plasma (PRP, „platelet-rich plasma“) wurden die mit frischem Blut gefüllten Citrat-Monovetten für 10 Minuten bei 200 x g, geringer Bremse und Raumtemperatur zentrifugiert. Der gewonnene gelblich-weiße trübe Überstand (PRP) wurde anschließend mithilfe einer Transferpipette in ein neues Polystyrene-Röhrchen überführt. Im Anschluss wurde die Thrombozytenkonzentration im PRP im „Sysmex“ gemessen.

#### **3.9.2 Herstellung von PPP**

Zur Gewinnung des Plättchen-armen Plasma (PPP, „platelet-poor plasma“) erfolgte nun eine Zentrifugation der übrig gebliebenen Blutprobe ein weiteres Mal für 10 Minuten bei 2000 x g und Raumtemperatur. Der hierbei entstandene gelblich klare Überstand (PPP) wurde mit einer Transferpipette in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### 3.10 Durchflusszytometrie

#### 3.10.1 Durchflusszytometrische Analyse der Thrombozytenfunktion

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Durch die breite Palette an Fluoreszenzfarbstoffen und monoklonalen Antikörpern ist die Durchflusszytometrie ein einzigartiges Instrument zur eingehenden Zelltypisierung.

Die Kombination der Durchflusszytometrie mit der Immunfluoreszenzmarkierung von antigenen Epitopen mit monoklonalen Antikörpern stellt ein diagnostisches Verfahren hoher Sensitivität und Spezifität für die Differenzierung von Leukozyten dar und kann entsprechend auch bei Thrombozyten angewendet werden (113).

Bei der Durchflusszytometrie werden die Zielzellen hydrodynamisch so fokussiert, dass sie dann seriell, d.h. Zelle für Zelle, einen Laserstrahl mit festgelegter Wellenlänge (meist  $\lambda=488$  nm) passieren. Trifft also ein Laserstrahl auf eine Zelle, so kommt es zur Streuung des Lichtes. Diese Streuung verläuft zum einen abhängig von der Größe der Zelle in Vorwärtsrichtung (FSC) und zum anderen in Abhängigkeit von der Zell-Granularität im rechten Winkel zur Flußrichtung (Seitwärtsstreuung SSC). Aus dem Verhältnis beider Streuungsmöglichkeiten entstehen typische zweidimensionale Kennfelder, die Aussagen über die einzelnen Zellpopulationen der Meßprobe erlauben.

Durch Markierung der Zellen mit Fluorochrom-Farbstoffen kann man durch Laserlicht die Emission von Fluoreszenzlichtimpulsen erreichen. Senden die Fluorochrom-Farbstoffe bei Laserbestrahlung unterschiedliche Emissionsspektren aus, so ist eine weitergehende Charakterisierung der Zellpopulationen möglich. Eine Photomultiplermatrix zeichnet alle optischen Signale, die von jeder einzelnen bestrahlten Zelle ausgehen, auf, wobei sie durch den vorwärtsgerichteten Lichtimpuls der jeweiligen Zelle getriggert ist.

Je nach Konzeption des Durchflusszytometers können bis zu 5 Eigenschaften (2 Lichtstreuungen und 3 Fluoreszenzen) einer einzelnen Zelle gemessen werden. Jeweils zwei Eigenschaften einer Zelle können dann später miteinander in Verbindung gesetzt werden. Durch das sogenannte „GATING“ werden nur solche Zellen zur Darstellung zugelassen, die bestimmte, vorher definierte Eigenschaften aufweisen. So werden in der Zweifarben-Fluoreszenzanalyse (FL1/FL2) nur solche Zellen erfaßt, die bestimmte Streulichteigenschaften (FSC/SSC) aufweisen. Durch entsprechende Auswahl der

Streulichteigenschaften können selektiv nur bestimmte, vorher definierte Zellen erfaßt werden. Alle Parameter der jeweiligen Analyse werden über eine logarithmische Intensitätsskala registriert, und für das quantitative Ergebnis wird dann die durchschnittliche Signalintensität entsprechend der Anzahl der analysierten Ereignisse errechnet. Die Auswertung der Daten erfolgt entweder in Einparameterdarstellung oder in einer korrelierten Zweiparameterdarstellung.

Dabei entspricht die Einparameterdarstellung der Häufigkeitsverteilung bzw. dem Histogramm. Die horizontale Achse steht für den Bereich der Klassen oder Kanäle (1 bis 1024; 1 bis 256), und die vertikale Achse zeigt die Anzahl der Zellen je Kanal. Somit kann nun die Verteilung eines Parameters, der die Zelleigenschaften widerspiegelt, in einer großen Zellpopulation beschrieben werden. Bei der Durchflusszytometrie mit Fluoreszenz-Farbstoffen ist die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen bzw. Antigene. Je mehr Bindungsstellen, desto heller leuchtet demnach die Zelle bei der Bestrahlung. Zur richtigen Klassifikation der Zellen muß dem Durchflusszytometer vor Beginn der Messung die Definition für „positive“ bzw. „leuchtende“ und „negative“ bzw. „nicht-leuchtende“ Zellen eingegeben werden. Außerdem muß das Ausmaß der Autofluoreszenz der einzelnen Zellen durch Zugabe eines Kontrollantikörpers („negative Kontrolle“) bestimmt werden, um dann bei der endgültigen Messung nur solche Zellen als „positiv“ einordnen zu können, deren Fluoreszenz über dem Wert der vorher bestimmten Autofluoreszenz liegt.

Zu guter Letzt erhält man das prozentuale Verhältnis „positiver“ und „negativer“ Zellen, welches dann unter Umständen Aussagen über bestimmte Zellpopulationen zuläßt. Unter korrelierter Zweiparameterdarstellung (Punktplo, DOT-PLOT) versteht man die Verbindung zweier Parameter, wobei die Intensitätsachsen der beiden Parameter so in eine Matrix eingetragen werden, daß sich die Intensitätswerte in einem Punkt schneiden. Dieser Punkt steht damit für eine bestimmte Zelle und zeigt z.B. deren Größe und Fluoreszenz an. So können beispielsweise durch die korrelierte Darstellung von FSC (Größe) und SSC (Granularität) bestimmte Subpopulationen einer Zellpopulation identifiziert und dadurch eine Aussage über die Zusammensetzung einer Zellpopulation unter bestimmten Bedingungen gemacht werden. Durch Verwendung der sogenannten Kontourlinien-Darstellung können Heterogenität und relative Größe der Zelle der jeweiligen Population gleich den „Höhenlinien“ einer topographischen Landkarte leichter

interpretiert werden. Entsprechend der Histogrammauswertung bei der Einparameterdarstellung werden auch bei der korrelierten Zweiparameterdarstellung mittels einer Kontrollmessung die Bereiche der „positiven“ und „negativen“ Zellen definiert. Bei der Thrombozytenfluoreszenzfärbung kommen monoklonale Antikörper zum Einsatz, die gegen definierte Epitope der Oberflächenmembran der Thrombozyten gerichtet sind. Diese monoklonalen Antikörper sind entweder direkt oder indirekt, d.h. über einen zweiten gegen den eigentlichen monoklonalen Antikörper gerichteten Antikörper, an den Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Zur Kontrolle des Anteils des unspezifisch gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes muß jede Probe zusätzlich mit einem unspezifischen, dem Isotyp des jeweiligen Antikörpers entsprechenden Antikörper (z.B. Mouse-IgG) gefärbt werden (→ Autofluoreszenz). Das Ergebnis wird dann vom spezifischen Fluoreszenzhistogramm mit Hilfe entsprechender Softwareprogramme (CellQuest) elektronisch subtrahiert (114). Durch den Einsatz von Standardpartikeln, die mit einer definierten Anzahl von FITC-Molekülen (Fluorescein-isothiocyanat) beladen sind, kann eine Kalibrationskurve mit einer Interassay-Varianz von weniger als 1 bis 3 % ermittelt werden. Nach entsprechender Korrektur mit Berücksichtigung des Fluorescein/Proteinverhältnisses des markierten F(ab)<sub>2</sub>-FITC-Fragments kann man die Fluoreszenzintensität quantitativ in die Anzahl der Bindungsstellen umrechnen (115).

### 3.10.2 Probenvorbereitung und Durchführung

Die Vorbereitung der Proben erfolgte entweder nach dem „Mainzer CTH Protokoll“ (Methode I), das im Folgenden beschrieben ist oder nach dem „Wiesbadener Protokoll“ (Methode II; siehe 3.10.3).

Die venöse Blutentnahme wurde für beide Methoden wie in 3.8 beschrieben durchgeführt und anschließend PRP wie in 3.9 beschrieben gewonnen. Nach Bestimmung der Thrombozytenkonzentration im „Sysmex“, wurde das PRP im Verhältnis 1:7 mit PBS verdünnt und wie im folgenden Pipettierschema dargestellt für die Versuche mit dem Durchflusszytometer eingesetzt.



## Material und Methoden

Tabelle 8: Pipettierschema für die Versuche mit dem Durchflusszytometer (Methode I)

Antikörper/ Fluoreszenz- farbstoff	Agonisten	Verdünntes PRP [ $\mu$ l]	PRP [ $\mu$ l]	PBS pH 7.4 [ $\mu$ l]	GPRP (125 mM)	Zusätzlich
<b>CD63, Lamp1, Lamp2</b>	Convulxin	1500	214	1286	-	-
	Thrombin	1200	171	1029	1:100	-
<b>Mepacrine</b>	Convulxin	600	86	484	-	30 $\mu$ l Mep
	Thrombin	600	86	484	1:100	30 $\mu$ l Mep

Zur Bestimmung der Degranulierung der  $\delta$ -Granula wurde Mepacrin (100  $\mu$ M) im Verhältnis 1:20 mit verdünntem PRP in Dunkelheit für 10 min inkubiert (Finale Mep.-Konz.: 5  $\mu$ M).

Im Anschluss wurden für die Thrombozytenaktivierung die Agonisten (Thrombin und Convulxin) wie nachfolgend gezeigt hergestellt und in Polystyrene-Röhrchen vorgelegt.

### Convulxin (Stammlsg.: 100 $\mu$ g/ml)

Convulxin (100  $\mu$ g/ml) 1:400 mit 0,9 % NaCl verdünnen (finale Convulxin Konz. 0,25  $\mu$ g/ml) und 0,25  $\mu$ g/ml Convulxin wie nachfolgend dargestellt in Polystyrene-Röhrchen pipettieren:

Konzentration [ng/ml]	Menge Convulxin 0.25 $\mu$ g/ml [ $\mu$ l]
0	0
1,25	0,5
2,5	1,0
5	2,0
20	8,0

### Thrombin (Stammlsg.: 100 U/ml)

Herstellen der Thrombin Vorverdünnungen (VV) nach folgendem Schema:

Konzentration [ $\mu$ M]	Menge 100 U/ml Thrombin für VV in 1 ml PBS (pH 7.4) [ $\mu$ l]
0	0
0,025	2,5
0,05	5
0,1	10
0,2	20

Je 10 µl dieser Vorverdünnungen in Polystyrene-Röhrchen pipettieren.

Im Anschluss wurden 100 µl verdünntes PRP zu den vorgelegten Agonisten pipettiert und für 6 min bei Raumtemperatur inkubiert. Ansätze, die mit Thrombin aktiviert wurden, wurden vorher mit GPRP (Finale Konz.: 1,25 mM), einem Inhibitor der Fibrinpolymerisation versetzt, um die Gerinnelbildung zu vermeiden.

Nach Aktivierung wurden die Proben durch Zugabe von 100 µl 1% Formaldehyd-PBS-Lösung in alle Röhrchen für 30 min bei Raumtemperatur und ohne Schütteln fixiert. Durch Zugabe eines Milliliters PBS wurde die Fixierung beendet und die Zellen bei 800 x g, maximaler Bremse und Raumtemperatur für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet wurde durch langsames Vortexen resuspendiert. Nun erfolgte die Färbung der Zellen mit Antikörpern. Hierbei wurden in die Polystyrene-Röhrchen je nach Ansatz folgende Antikörper in sättigender Konzentration (5 µl AK zu 100 µl Probe) hinzugegeben:

- CD107a (LAMP-1)
- CD63 (LAMP-3)

Die Färbung dauerte 45 Minuten und erfolgte bei Raumtemperatur, ohne Lichteinfluss und bei leichtem Schütteln.

Nach der Antikörper-Inkubation wurde ein Milliliter PBS zu jeder Probe hinzugegeben und die Proben vor Messung im Durchflusszytometer auf dem Vortex-Gerät gemischt.

### 3.10.3 Durchflusszytometrische Bestimmung der *in vitro* Aktivierungskapazität von GPIIb-IIIa und der Oberflächen-Rezeptoren

Der PAC1 Antikörper erkennt Epitope des aktivierten Fibrinogen-Rezeptors GPIIb-IIIa auf stimulierten Thrombozyten-Oberflächen und stellt somit einen funktionellen Test der Fibrinogen-Bindungskapazität von aktivierten Thrombozyten dar.

Er bindet ausschließlich an aktivierte Thrombozyten und ist spezifisch für die Erkennung des aktivierten GPIIb-IIIa-Komplex.

Die Thrombozyten-Aktivierung führt zu einer Sekretion der Granula-Inhaltsstoffe. Dabei erscheinen bestimmte Proteine, wie das CD62P, auf der Zelloberfläche und können als Aktivierungsmarker mittels eines anti-CD62P-Antikörpers gemessen werden.

## Material und Methoden

Verminderte Werte innerhalb dieser Messsysteme weisen auf eine Glanzmann Thrombasthenie oder eine gestörte Thrombozyten-Aktivierung hin.

Tabelle 9: Benötigte Laborgeräte und Reagenzien für die PAC1- und P-Selektin-Messung.

<b>Lösung</b>		<b>Hersteller</b>
HEPES-Puffer		
PRP		
Fluoreszenzmarkierte Antikörper	PAC 1-FITC	BD Bioscience
	CD62P-PE	
ADP (10 µM)		Sigma
TRAP (10 µM)		BACHEM
Formaldehyd, 2%-ig (v/v)		Anhang
Cellwash		BD Bioscience
<b>Laborgerät</b>		<b>Hersteller</b>
Reagiergefäße EASY CAP= Eppis (1,5 mL)		Sarstedt
Eppendorfpipetten, verschiedene		Eppendorf
Pipettenspitzen, verschiedene		Sarstedt
Zentrifuge 5415 R		Eppendorf
Vortexer REAX 2000		Heidolph

Für die Kontrolle und pro Patient werden jeweils drei Reagiergefäße EASY CAP (1,5 mL) (=Eppis) nebeneinander in einem Ständer aufgestellt.

Die Beschriftung der Eppis und die Probenvorbereitung kann folgendem Schema entnommen werden:

Tabelle 10: Durchführung der PAC1- und P-Selektin-Messung.

<b><u>Eppi-Beschriftung</u></b>		
<b>Ø</b>	<b>ADP</b>	<b>TRAP</b>
<b><u>Pipettierschema</u></b>		
150 µL PLT-Puffer	150 µL PLT-Puffer	150 µL PLT-Puffer
20 µL PAC-1	20 µL PAC-1	20 µL PAC-1
10 µL CD62P	10 µL CD62P	10 µL CD62P
/	20 µL ADP (End-Konz.: 10µM)	20 µL TRAP (End-Konz.: 10µM)
<i>vortexen</i>		
10 µL PRP	10 µL PRP	10 µL PRP
<i>vortexen</i>		
<i>dunkel / Raumtemperatur / 10 Minuten</i>		
1 Vol. 2%-Formaldehyd (200µL)	1 Vol. 2%-Formaldehyd (200µL)	1 Vol. 2%-Formaldehyd (200µL)
<i>15 Minuten fixieren / Raumtemperatur / dunkel</i>		
<i>waschen mit 500 µL CellWash</i>		
<i>zentrifugieren mit 2400 U/min für 3 Minuten</i>		
<i>Abziehen bis auf kleinen Rest</i>		
<i>Auffüllen mit 400 µL CellWash</i>		
<i>vortexen bei 5,5</i>		
<i>messen</i>		

Die Rezeptorzahlenanalyse ermöglicht die auf der Thrombozytenoberfläche befindlichen Rezeptoren hinsichtlich ihres Vorhandenseins bzw. ihrer Funktionstüchtigkeit, zu überprüfen.

Die folgende Tabelle zeigt die zur Analyse verwendeten Antikörper und deren Funktion. Für die Analyse im Hinblick auf GT ist besonders der Antikörper Anti-CD 41 (Klon P2) interessant, da er an die Untereinheit GPIIb bindet, aber nur im intakten Komplex mit GPIIIa. Dieser gibt jedoch keine Auskunft über den Ort (GP IIb oder GP IIIa) der Mutation.

Material und Methoden

Tabelle 11: Funktionen der verwendeten Antikörper

<u>Bezeichnung des Antikörpers</u>	<u>Funktion</u>
PAC-1	Durch Bindung an den aktivierten GPIIb-IIIa Komplex gibt er Auskunft über die Fibrinogen-Bindungsfähigkeit des Rezeptors.
Anti-CD36	Bindet an GPIIb = Rezeptor für TSP-1
Anti-CD41 (Klon P2)	Bindet an die Untereinheit GP IIb im intakten Komplex mit GPIIIa
Anti-CD42a	Bindet an GPIX des GPIb/V/IX-Komplexes = von-Willebrand-Faktor- und Thrombin Rezeptor.
Anti-CD42b	Bindet an GPIIalpha des GPIb/V/IX-Komplexes = Rezeptor für von-Willebrand-Faktor und Thrombin. CD 42a ist nicht-kovalent mit CD42b verbunden.
Anti-CD62P	Gibt Auskunft über die Aktivierung ( $\alpha$ -Granula Exozytose) des Thrombozyten (=Aktivierungsmarker)

Tabelle 12: Funktionen der verwendeten Antikörper

<u>Lösung</u>	<u>Hersteller</u>	
PLT-Puffer		
PRP		
Formaldehyd, 2%-ig (v/v)		
Fluoreszenzmarkierte Antikörper	CD 42a-FITC	BD Bioscience
	CD 42b-PE	BD Bioscience
	CD 36-FITC	BD Bioscience
	CD 41-PE (Klon P2)	BD Bioscience
	CD 62-FITC	BD Bioscience
	IgG1 Maus-PE Isotyp Kontr.	BD Bioscience
	IgG1 Maus-FITC Isotyp Kontr.	BD Bioscience
CellWash	BD Bioscience	
<u>Laborgerät</u>	<u>Hersteller</u>	
Reagiergefäße EASY CAP = Eppis (1,5 mL)	Sarstedt	
Eppendorfpipetten, verschiedene	Eppendorf	
Pipettenspitzen, verschiedene	Sarstedt	
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf	
Vortexer REAX 2000	Heidolph	

Für die Kontrolle und pro Patient werden je vier Eppis nebeneinander aufgestellt. Die Beschriftung der Eppis und die Probenvorbereitung kann folgendem Schema entnommen werden:

Tabelle 13: Durchführung der Rezeptorzahlanalyse

<b><u>Eppi-Beschriftung</u></b>			
<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>Fix</b>
<b><u>Pipettierschema</u></b>			
150 µL PLT-Puffer	150 µL PLT-Puffer	150 µL PLT-Puffer	200 µL PRP
20 µL CD42aFITC	20 µL CD41PE	20 µL CD62FITC	200 µL 2% Formaldehyd
20 µL CD42bPE	20 µL CD36FITC		Mindestens 15 Minuten stehen lassen. Bei Bedarf auch über Nacht, in diesem Fall entfällt jedoch das Zentrifugieren.
10 µL PRP Fix/gewaschen	10 µL PRP Fix/gewaschen	10 µL PRP Fix/gewaschen	
<i>vortexen</i>			Thrombozyten abzentrifugieren und Überstand absaugen 2400 rpm / 3 Min.
<i>30 Min. / Raumtemperatur / dunkel</i>			
<i>500 µL CellWash</i>			
<i>zentrifugieren bei 2300 rpm / 3 Min.</i>			200 µL PLT-Puffer
<i>Überstand abziehen</i>			
<i>400 µL CellWash</i>			Auf- und abpipettieren, um mit Puffer zu spülen
<i>vortexen</i>			
<i>Messung am FACS-Gerät</i>			

### 3.10.4 Darstellung der Messung

In der durchflusszytometrischen Untersuchung ist das Ausmaß der Vorwärtsstreuung (FSC) proportional zur Zellgröße; die Seitwärtsstreuung (SSC) bestimmt die Zellgranularität. Aufgrund der Bestimmung dieser Eigenschaften ist eine Identifikation von Thrombozyten einer Vollblutprobe möglich. In der Zweiparameter-Darstellung (Dot-Plot) kann dies dargestellt werden.

In dieser Studie sollen ausschließlich Aussagen über Eigenschaften von Thrombozyten gemacht werden. Aus diesem Grund muss die Thrombozytenpopulation vor der eigentlichen durchflusszytometrischen Messung ausgewählt werden. Dazu wird die Thrombozyten-Population mit einem Rahmen umgrenzt, was dann als Gating bezeichnet wird.

Nachfolgend wurde dann zur eigentlichen Thrombozyten-Analyse 5000 gefärbte Thrombozyten herangezogen und zwar exakt aus dem oben beschriebenen, umrahmten Bereich. So konnten von diesen hiernach die Eigenschaften bezüglich anderer Fluoreszenzen bestimmt werden. Nach diesem Muster wurden dann die verschiedenen Ansätze mit den jeweiligen verwendeten Antikörper (isotypische Negativkontrolle mit Maus – IgG - Antikörper, CD41, CD61, PAC1, CD62P, CD63) nacheinander analysiert.

### **3.11 Detektion von Thrombozytenproteinen mittels SDS-PAGE und Western Blot Analyse**

#### 3.11.1 Isolierung der Thrombozyten durch Gelfiltration

Die Gelfiltration bietet im Vergleich zum „Waschen“ der Thrombozyten eine schnellere Trennung der Thrombozyten von Plasmaproteinen. Eine Entfernung von Thrombozyten-anhaftendem vWF ist hierbei nicht möglich, bedingt durch die Thrombozytenscherung am Säulenmaterial und die Größe der vWF Multimere.

Sepharose 2B wurde mit 154 mM NaCl gewaschen und in eine silikonisierte Glassäule luftblasenfrei gefüllt. Als Äquilibrierungs- und Elutionspuffer wurde Hepes/Tyrode-Puffer benutzt. Aus Vollblut gewonnenes PRP wurde auf die äquilibrierte Säule aufgetragen und eluiert. Aufgrund der Größe konnten die Thrombozyten als getrübbtes Zelleluat vor den Plasmaproteinen fraktioniert aufgefangen werden.

Im nächsten Schritt werden die gelfiltrierte Thrombozyten mit dem gleichen Volumen CGS-Puffer versetzt, für 10 Min bei 400 x g zentrifugiert und die pelletierten Thrombozyten in einem geringen Volumen PBS resuspendiert und bei -80°C gelagert.

Die Reinigung des Säulenmaterials erfolgte mit 154 mM NaCl (0,02 % (w/v) Natriumazid). Zur vollständigen Regeneration wurde das Säulenmaterial dann mit 0,1 M NaOH und anschließend mit Wasserstoffperoxid (0,35%) behandelt. Äquilibriert wurde mit 154 mM NaCl.

Lösungen:

*CGS-buffer, pH 6.5*

	Conc. [mM]
NaCl	120
Citrate	12,9
Glucose	30

*Tyrodes-buffer pH 7.4*

	Concentration [mM]
NaCl	140
KCl	2,7
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,42
NaHCO <sub>3</sub>	12
Glukose	5,5
HEPES	5
ddH <sub>2</sub> O	

3.11.2 Probenvorbereitung

Für die Probenvorbereitung werden die zu untersuchenden Proteine durch einen SDS-haltigen Probenpuffer und Hitze (10 Minuten, 99°C) denaturiert. Bei einigen Proteinen wurden zusätzlich die reduzierende Thiolverbindung Dithiothreitol (DTT) zugesetzt.

- Reduzierte Proben

100 µl Probe (100 µg Protein mit PBS auf 100 µl auffüllen)  
 + 5 µl DTE-Lösung (0,2 M) 10 min 95°C kochen  
 + 5 µl DTE-Lösung (0,2vM) 10 min RT schwenken  
 + 10 µl IAA-Lösung (778 mM) 15 min RT schwenken  
 je 24 µl aufs Gel auftragen

- Nicht-Reduzierte Proben

100 µl Probe (100 µg Protein mit PBS auf 100 µl auffüllen)  
 + 10 µl NEM-Lösung (40 mM) 10 min 95°C kochen  
 + 5 µl BPB-Lösung (0,014 M)  
 je 23 µl aufs Gel auftragen



Die fertigen Proben können direkt auf das Gel aufgetragen oder bei -20°C gelagert werden

### 3.11.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird hauptsächlich zur Elektrophorese von Proteinen eingesetzt. Das Polymer Polyacrylamid stellt eine Art Molekularsieb in einem elektrischen Feld dar, in dem sich die Proteine proportional zu ihrer molekularen Masse auftrennen. Große Moleküle wandern langsamer als Kleine. Je nach Größe der zu detektierenden Proteine, können Gele mit unterschiedlichen Dichten hergestellt werden. Das Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet die meisten Proteine ungefähr proportional zu ihrer molekularen Masse und verursacht somit eine hohe negative Nettoladung, unabhängig von der Eigenladung des Proteins. Die native Konformation des Proteins wird durch SDS so verändert, dass alle Proteine im Gel eine ungefähr gleiche Konformation aufweisen. Demnach werden bei der SDS-PAGE die Proteine nur nach ihrer molekularen Masse, und nicht nach ihrer Eigenladung, aufgetrennt (116).

Es wurden Trenngele mit einem Acrylamid/Bisacrylamid-Gehalt von 8% gegossen (Zusammensetzung: Siehe Tabelle 14 )und mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche des Gels zu erhalten. Sobald das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol durch Abgießen entfernt und das Sammelgel (Zusammensetzung: Siehe Tabelle 14) darüber gegossen. Hier wurde ein Kamm mit 12 Zinken eingesetzt, wodurch sich 12 Taschen im Gel bildeten.

*Tabelle 14: Pipettierschema für vier SDS-Gele mit 8% Acrylamid*

	<b>Trenngel</b>	<b>Sammelgel</b>
Acrylamid:Bisacrylamid (30%w/v:0,8%w/v)	10ml	3,3ml
1,0M Tris pH 8,8	15ml	-

## Material und Methoden

1,0M Tris pH 6,8	-	3,15ml
20% SDS	190µl	125µl
ddH <sub>2</sub> O	12,15ml	18ml
10% APS	180µl	125µl
TEMED	25µl	25µl

### 3.11.4 Western Blotting

Der Western Blot ist ein immunologisches Verfahren zum Nachweis eines bestimmten Proteins nach der Auftrennung aus einem Proteingemisch mittels SDS-PAGE (siehe 3.11.3). Über einen Transfer auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran können die Proteinbanden im Anschluss mittels spezifischer Antikörper identifiziert und quantifiziert werden (117).

Nach Beendigung der Gel-Elektrophorese wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen und das Sammelgel vom Trenngel entfernt. Daraufhin wurden zwei Blotting-Filterpapiere und die PVDF-Membran auf die gewünschte Größe zugeschnitten. Die PVDF-Membran wurde unmittelbar vor ihrer Verwendung durch ein kurzes Durchziehen in Methanol aktiviert.

Der Zusammenbau der Blotting-Kassette erfolgte in einer Wanne mit Blotting-Puffer, um eine kontinuierliche Befeuchtung der Komponenten sicher zu stellen und eine Bildung von Luftblasen zwischen Gel und Membran zu vermeiden.

Auf dem Schwamm auf der Seite der Anode wurde zunächst ein Blotting-Filterpapier platziert. Darauf wurde die aktivierte PVDF-Membran gelegt. Im Anschluss wurde das Gel vorsichtig auf die Membran aufgebracht und mit einem weiteren Blotting-Filterpapier bedeckt. Zum Schluss wurden eventuell vorhandene Luftblasen zu allen Seiten mit einem 50ml Falcon ausgestrichen. Danach wurde die zusammengesetzte Kassette in die Blotting-Vorrichtung eingesetzt und diese mit Blotting-Puffer aufgefüllt. Der

Proteintransfer auf die PVDF-Membran erfolgte für 100 min bei 70 V im Kühlraum bei 4°C mittels Nasstankverfahrens.

Nach dem Blotting wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation in 5% BSA in BSA/PBST für 45 min bei RT blockiert. Im Anschluss erfolgt die Inkubation mit den primären Antikörpern in der fünfprozentigen BSA/PBS-Lösung über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden nicht gebundene Antikörper-Reste durch 4 x 15min Waschen mit PBST bei RT entfernt und für zwei Stunden bei RT mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt, welche in Verbindung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die oxidative Umsetzung von Luminol zu 3-Aminophthalat katalysiert (siehe Abbildung 2). Bei dieser Reaktion wird proportional zur Menge der gebundenen sekundären Antikörper und damit proportional zur Menge des Proteins in der Membran Licht freigesetzt. Dieses Licht („Chemilumineszenz“) kann mit einem geeigneten Detektionsgerät gemessen und die entstehenden Banden angezeigt werden.

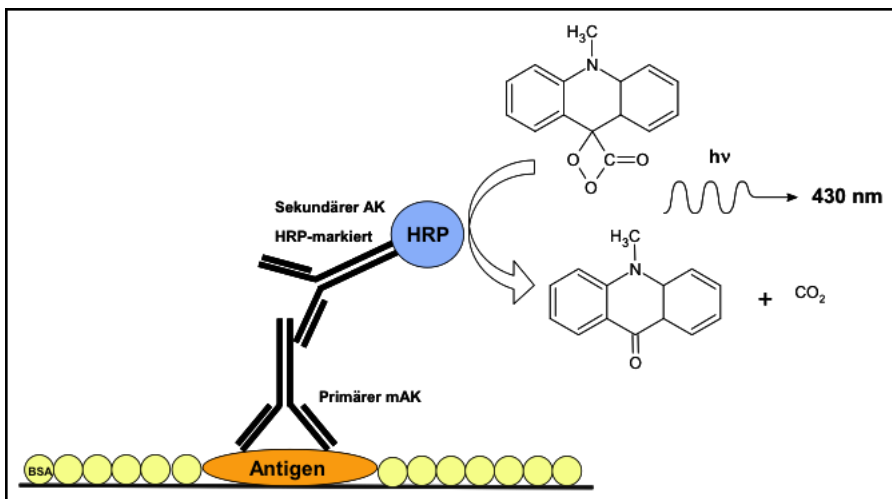


Abbildung 2: Reaktionsschema der Entwicklung der PVDF-Membran

Tabelle 15: Verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Reduziert	Spezies	Erwartetes Molekulargewicht im Gel
Anti-CD62P	1:40	nein	Maus	140 kDa
Anti-CD63	1:40	nein	Mouse	145, 42, 25 kDa
Anti-CD42b Klon SZ2	1:200	ja	Mouse	145 kDa
Anti-CD107a (Lamp1)	1:40	nein	Mouse	11s0 kDa
Anti-TSP1	1:100	ja	Mouse	170-180 kDa
Anti-vWF HRP	1:500	ja	Kaninchen	250 kDa
Goat@Rabbit HRP	1:5000		Ziege	
Goat@Mouse HRP	1:5000		Ziege	
$\alpha$ -Actinin	1:2000		Kaninchen	100-110 kDa

### 3.12 Molekulargenetische Untersuchungen

Da längst noch nicht alle Gene bekannt sind, die eine Thrombozytopathie verursachen, sollen in dieser Arbeit die zugrundeliegenden molekularen Pathomechanismen charakterisiert werden.

Ein Teil der molekularen Diagnostik wird von Frau PD Dr. H. Rossmann, Leiterin des Bereiches Molekulare Diagnostik des Instituts für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (Zentrallabor, Institutsleiter: Prof. Dr. K.J. Lackner) im Rahmen der CTH-Plattform „Advanced Diagnostics“ durchgeführt. Die Genotypisierung erfolgt durch Whole Exome Sequencing“ (WES), wodurch die der Erkrankung zugrundeliegenden Mutationen detektiert oder Kandidaten-Varianten definiert werden. Hierbei wird nach mechanischem Scheren und barcodieren der genomischen DNA der Patienten die Zielsequenzen mithilfe einer Sondenhybridisierung (Exome Panel v.1.0, Firma IDT) angereichert. Die Sequenzierung erfolgt auf dem NextSeq 500 Gerät der Firma Illumina unter Verwendung einer High Output Kartusche. Die Auswertung erfolgt mithilfe der NextGENe Software der Firma SoftGenetics, sowie mithilfe einer selbst geschriebenen, bioinformatischen Pipeline, die durch einen Bioinformatiker der Fragestellung angepasst werden kann.

Die Bestätigung der Ergebnisse aus dem Exome Sequencing findet bezüglich der Sequenzanalyse mittels Sanger Sequencing (auf dem CEQ 8000 System, Firma SCIEX). Die Bestätigung großer Deletionen und Insertionen, sowie Rearrangements wird mithilfe eines MLPA (Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification; selbst entwickelt oder

## Material und Methoden

MLPA Kits der Firma MRC Holland) oder der ddPCR (QX200 Droplet Digital PCR System, Firma BioRad) durchgeführt.

Die Klassifizierung der identifizierten Sequenzvariante erfolgt anhand der Empfehlungen des „American College for Medical Genetics and Genomics“ (118). Außerdem werden web-basierte Computerprogrammen (SIFT, PROVEAN, PolyPhen2, MutationTaster) zur in-silico Vorhersage des Krankheitspotentials von DNA-Sequenzvarianten.

Ein weiterer Teil der molekulargenetischen Diagnostik wird im Labor der DKD HELIOS Klinik Wiesbaden unter der Leitung von Herrn PD Dr. C. Kirchmaier durchgeführt. Der Vorgang begann mit der DNS-Isolierung des Patienten aus Leukozyten. Anschließend werden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction= PCR) die Exons des GP IIb-IIIa samt ihrer Grenzen zu den Intron-Bereichen amplifiziert. Dieser Vervielfältigung des genetischen Materials folgt eine modifizierte Sequenzierung nach Sanger („Cycle Sequencing“) mittels des ABI Prism 310 Sequenzers, die Erstellung eines Chromatogramms einer automatischen Sequenzierung durch Kapillarelektrophorese und der abschließende Abgleich der erhaltenen Sequenz mit der Wildtyp-Sequenz.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Patienten mit Glanzmann Thrombasthenie

Im Rahmen dieser Studie wurden insgesamt 9 Patienten mit Glanzmann Thrombasthenie hinsichtlich klinischer Blutungskomplikationen, Thrombozytenfunktion und Thrombozytenmembran-Proteine untersucht. Die Blutungsschwere wurde durch den ISTH-BAT ( Bleeding Assessment Tool) Score definiert (119).

Bei 5 in dieser Studie rekrutierten Patienten war ein GPIIb-IIIa-Rezeptorbesatz von <5% auf der Thrombozytenoberfläche vom GT Typ 1 in Kombination mit einer gestörten oder fehlenden Fibrinogen-Bindungs-fähigkeit nachweisbar (Tabelle 16).

Bei 4 untersuchten Patienten fand sich eine Ausprägung des Defekts mit mindestens bzw. mehr als 50% funktionstüchtigem GPIIb-IIIa auf der Thrombozytenoberfläche (GT Typ 2). Bei diesen 4 Patienten handelte es sich um die Eltern (GT-1-Mutter und GT-1-Vater) und beide Schwestern (GT-1-Schwester-A und GT-1-Schwester-B) der Index-Patientin GT-1-Index (siehe Tabelle 16).

*Tabelle 16: Charakteristika der untersuchten Patienten mit Glanzmann Thrombasthenie*

Patient (Geschlecht)	ISTH-BAT- Score	Alter (Jahre)	GPIIb-IIIa (%)	Blutungszeit
GT-1-Index (W)	6	8	< 1	33 min
GT-1-Mutter	0	28	78	n.b.
GT-1-Vater	0	34	68	n.b.
GT-1-Schwester-A	0	10	63	n.b.
GT-1-Schwester-B	0	5	62	n.b.
GT-2-Index (W)	15	58	< 1	21 min
GT-3-Index (W)	15	71	4	> 30 min
GT-4-Index (W)	7	27	< 1	n.b.
GT-5-Index (W)	12	70	4	n.b.

## Ergebnisse

*Tabelle 17: Nachgewiesene Mutationen bei den untersuchten Typ I GT-Patienten*

Patient	Genotyp	Gen	Mutation 1		Mutation 2	
			Ort	Effekt	Ort	Effekt
<b>GT-1-Index (W)</b>	<b>Homozygot</b>	<b>αIIb</b>	<b>Exon 1</b>	<b>175delG</b>	----	-----
<b>GT-2-Index (W)</b>	<b>(Compound) Heterozygot</b>	<b>αIIb</b>	<b>Exon 2</b>	<b>P71R</b>	<b>Exon 20</b>	<b>L684R</b>
<b>GT-3-Index (W)</b>	<b>Homozygot</b>	<b>αIIb</b>	<b>Exon 5</b>	<b>T207I</b>	----	-----
<b>GT-4-Index (W)</b>	<b>Homozygot</b>	<b>αIIb</b>	<b>Exon 28</b>	<b>G2943A</b>	----	-----
<b>GT-5-Index (W)</b>	<b>n.b.</b>					

### 4.1.1 Anamnese der Index-Patientin GT-1-Index

Die Patientin GT-1-Index weist ein deutlich erhöhtes Blutungsrisiko auf mit einer ausgeprägten klinischen Symptomatik. Es bestehen ubiquitär am gesamten Körper und der Extremitäten einschließlich Kopf Hämatome und Zahnfleischbluten beim Zähneputzen. Beim Zahnwechsel kam es zu Blutungen. Des Weiteren kommt es im Rahmen von Verletzungen zu länger bestehenden Blutungen. Eine Substitution mit dem Gerinnungspräparat NovoSeven®, zugelassen für Patienten mit Glanzmann Thrombasthenie, erfolgt im Bedarfsfall, d. h. bei Blutungen und stark ausgeprägten Hämatomen.

## Ergebnisse



Abbildung 3: Index-Patientin GT-1-Index mit multiplen Hämatomen an den Extremitäten. (freundlicherweise von Frau Dr. M. Krause, DKD HELIOS Klinik Wiesbaden zur Verfügung gestellt).

Im Auftrag von Frau Dr. M. Krause (Leitung Fachbereich Hämostaseologie an der DKD HELIOS Klinik Wiesbaden) wurde bei der Patientin GT-1-Index die molekulargenetische Diagnostik auf Glanzmann Thrombasthenie am Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum Bonn (Institutsleiter: Prof. Dr. J. Oldenburg) veranlasst,

Die molekulargenetische Analyse der mit Glanzmann Thrombasthenie assoziierten Gene mittels Sequenzierung der kodierenden Bereiche einschließlich der Intron-/Exonübergänge aus genomischer DNA zeigte, dass die Patientin GT-1-Index einen Defekt des *ITGA2B*-Gens aufweist. Es handelt sich dabei um eine homozygote kleine Deletion in Exon 1: *ITGA2B*: c.[175delG];[175delG] p.(Asp59ThrfsTer52).

Diese Variante ist im internationalen *ITGA2B*-Mutationsregister HGMD<sup>®</sup> (*Human Gene Mutation Database*) vorbeschrieben (<http://www.hgmd.org>). Die Klassifizierung der identifizierten Sequenzvariante erfolgt anhand den Empfehlungen des „American College for Medical Genetics and Genomics“ (118) und kann als „pathogene Variante“ eingestuft werden.

Zusammenfassend kann die gefundene homozygote kleine Mutation zu einer Störung der Thrombozyten-Funktionalität führen.



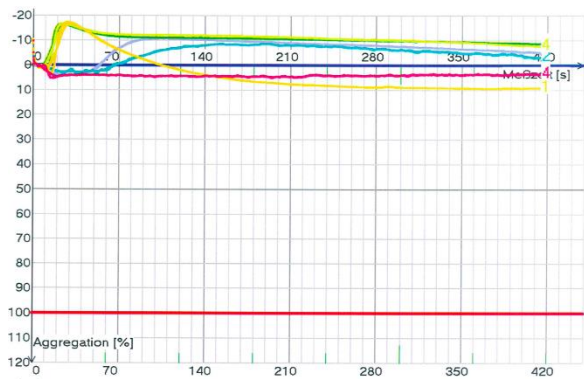
## Ergebnisse

### 4.1.1.1 Thrombozytenaggregation bei der Index-Patientin GT-1-Index und ihren Familienangehörigen

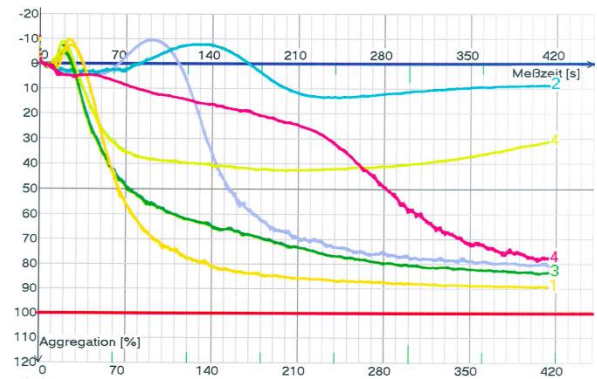
Die Thrombozytenaggregation mit ADP, Kollagen, Epinephrin und Arachidonsäure im PRP war mit den Standardkonzentrationen (ADP: 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M; Kollagen; 1  $\mu$ g/ml, 2  $\mu$ g/ml, Arachidonsäure: 0,75 mM, Epinephrin: 10  $\mu$ M) bei der Patientin GT-1-Index nicht auslösbar. Die Ristocetin-induzierte Agglutination, die allein durch den VWF vermittelt wird, war normal.

Bei den Familienmitgliedern mit heterozygoter Ausprägung (Rezeptorbesatz mind. 50%) war Aggregation nach Stimulierung mit 0,5  $\mu$ g/ml Kollagen nicht auslösbar und mit 2,5  $\mu$ M ADP zwar auslösbar, aber mit anschließender Desaggregation (Epinephrin war ebenfalls pathologisch). Alle anderen getesteten Agonisten (1  $\mu$ g/ml Kollagen, 5  $\mu$ M ADP, 0,75 mM Arachidonsäure) und die Ristocetin-induzierte Agglutination waren normal.

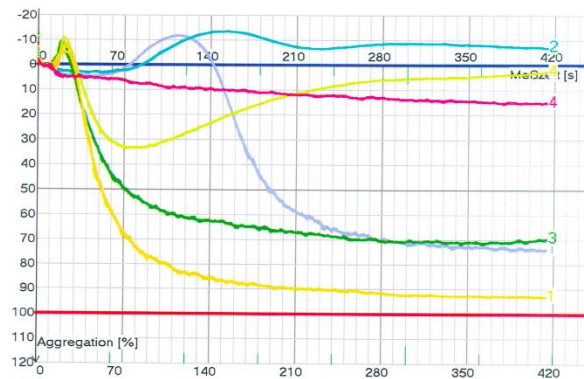
A.



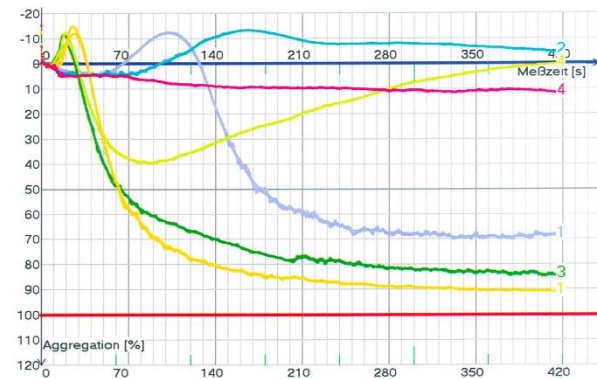
B.



C.



D.



E.

## Ergebnisse

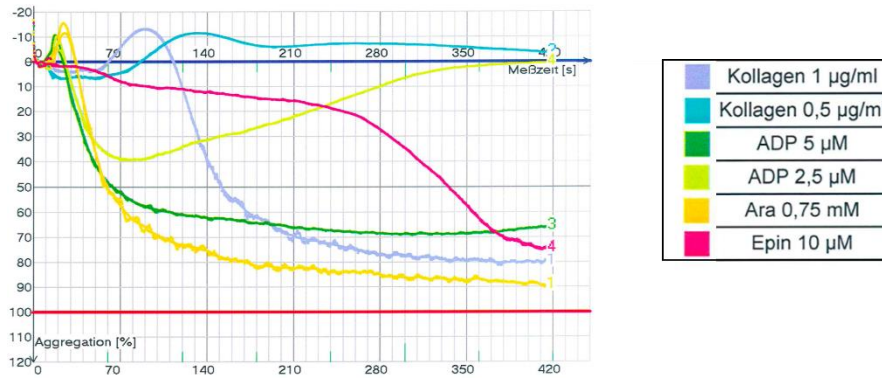


Abbildung 4: Agonisten-induzierte Thrombozytenaggregation bei der Index-Patientin GT-1-Index und Familienangehörigen. A.) Index-Patientin GT-1-Index; B. GT-1-Mutter; C.) GT-1-Vater; D.) GT-1-Schwester-A; E.) GT-1-Schwester-B

### 4.1.1.2 Durchflusszytometrische Analyse von Thrombozyten-Rezeptoren bei der Index-Patientin GT-1-Index und ihren Familienangehörigen

Die durchflusszytometrische Analyse des Rezeptorbesatzes auf der Thrombozytenoberfläche mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern zeigte bei der Index-Patientin einen GPIIb-IIIa-Gehalt <2% im Vergleich zu gesunden Probanden. Alle anderen untersuchten Membranrezeptoren (GPIb $\alpha$  (CD42b), GPIX (CD42a), GPIV (CD36)) waren in normaler Anzahl vertreten (Abbildung 5). Die Eltern der Index-Patientin und die beiden Geschwister zeigten eine leicht verminderte Rezeptordichte des GPIIb-IIIa-Rezeptors auf der Thrombozytenoberfläche, während die restlichen Membranrezeptoren (GPIb, GPIX, GPIV) normwertig waren.

## Ergebnisse

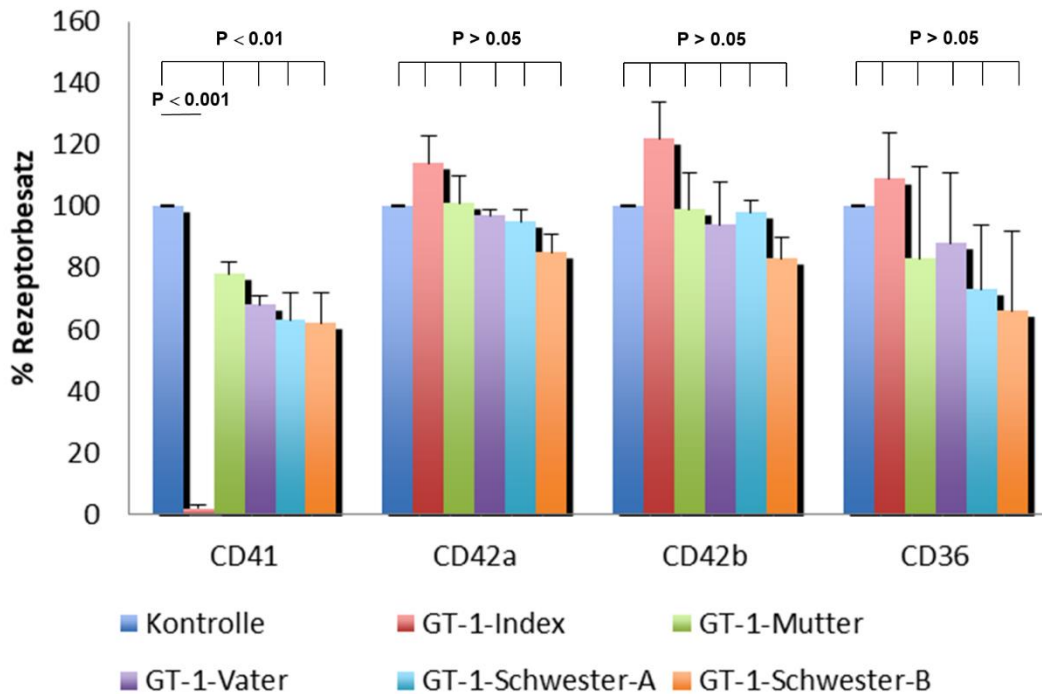


Abbildung 5: Besatz der Membranrezeptoren CD41, CD42a, CD42b und CD36 auf der Thrombozytenoberfläche bei der Index-Patientin GT-1-Index und ihrer Familienangehörigen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus 4 unabhängigen Versuchen.

### 4.1.1.3 Oberflächen-Expression aktivierter GPIIb-IIIa Komplexe (PAC-1-Antikörper) bei Thrombozyten der Index-Patientin GT-1-Index und ihren Familienangehörigen

Durch Bindung des PAC-1-Antikörpers an den aktivierten GPIIb-IIIa Komplex gibt er Auskunft über die Fibrinogen-Bindungsfähigkeit des Rezeptors. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Bestimmung der PAC-1-Bindung sind in Abbildung 6 dargestellt.

Nach Stimulierung der Thrombozyten mit 10  $\mu$ M ADP und 10  $\mu$ M TRAP lag die Fibrinogen-Bindungskapazität bei der Index-Patientin bei < 5 %. Bei ihren Familienangehörigen war die PAC-1-Bindung mit Werten von 52 – 71 % nach Stimulierung mit ADP leicht vermindert. Deutlicher ausgeprägt war die Reduktion der PAC-1-Bindung nach TRAP-Stimulierung (27 – 38 %).

## Ergebnisse

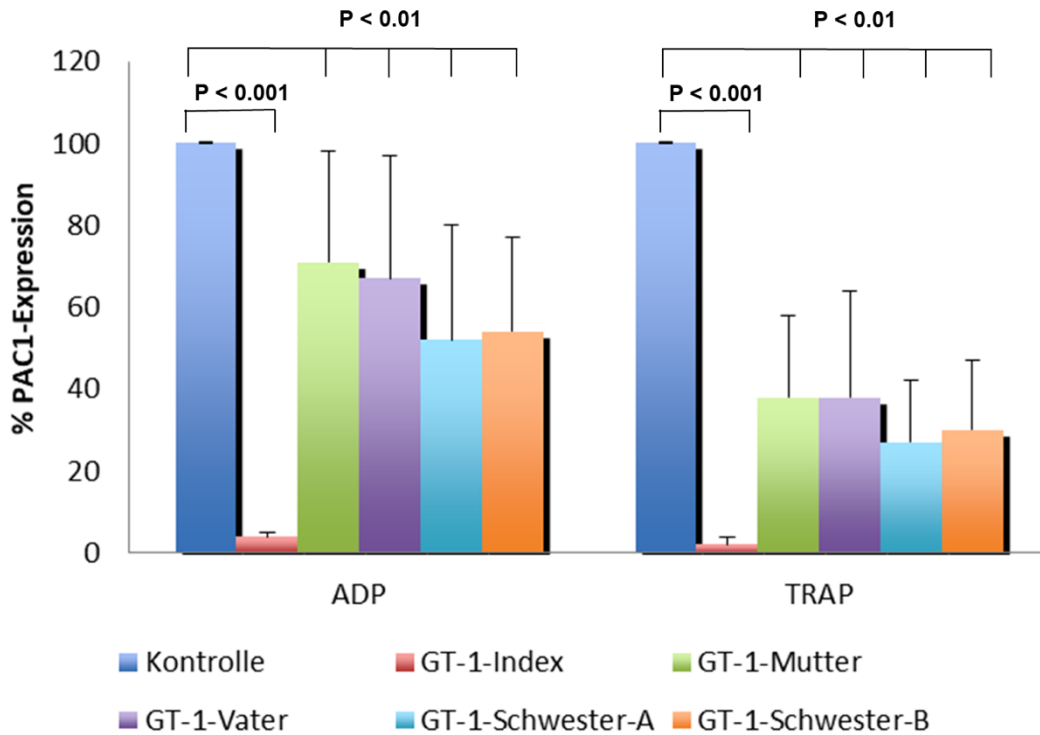


Abbildung 6: *in vitro* Aktivierungskapazität von GPIIb-IIIa auf der Thrombozytenoberfläche nach Stimulierung mit 10  $\mu$ M ADP oder 10  $\mu$ M TRAP bei der Index-Patientin GT-1-Index und ihrer Familienangehörigen.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus 4 unabhängigen Versuchen.

Zur Darstellung der Ergebnisse wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Kontrolle auf 100% gesetzt und als Referenz für die Patientenwerte herangezogen.

### 4.1.1.4 Durchflusszytometrische Analyse der thrombozytären CD62P- und CD63-Oberflächen-Expression bei der Index-Patientin GT-1-Index und ihren Familienangehörigen

Die prozentuale Expression von P-Selektin (CD62P) nach Stimulierung mit 0.25 U/ml Thrombin war auf den Thrombozyten der Index-Patientin GT-1-Index und ihren Angehörigen im Vergleich zur Kontrolle nicht erhöht. Im Gegensatz dazu war die CD63-Expression bei der Index-Patientin nach Stimulierung mit 0.25 U/ml Thrombin um mehr als das Doppelte auf 208 % erhöht. Bei der heterozygoten Mutter (GT-1-Mutter) war die CD63-Expression mit 186% ebenfalls deutlich erhöht, wie auch bei einer der Schwester (GT-1-Schwester-B) (146 %). Eine leichte Erhöhung der CD63-Expression wurde beim Vater (GT-1-Vater) und anderen Schwester (GT-1-Schwester-B) verzeichnet.

## Ergebnisse

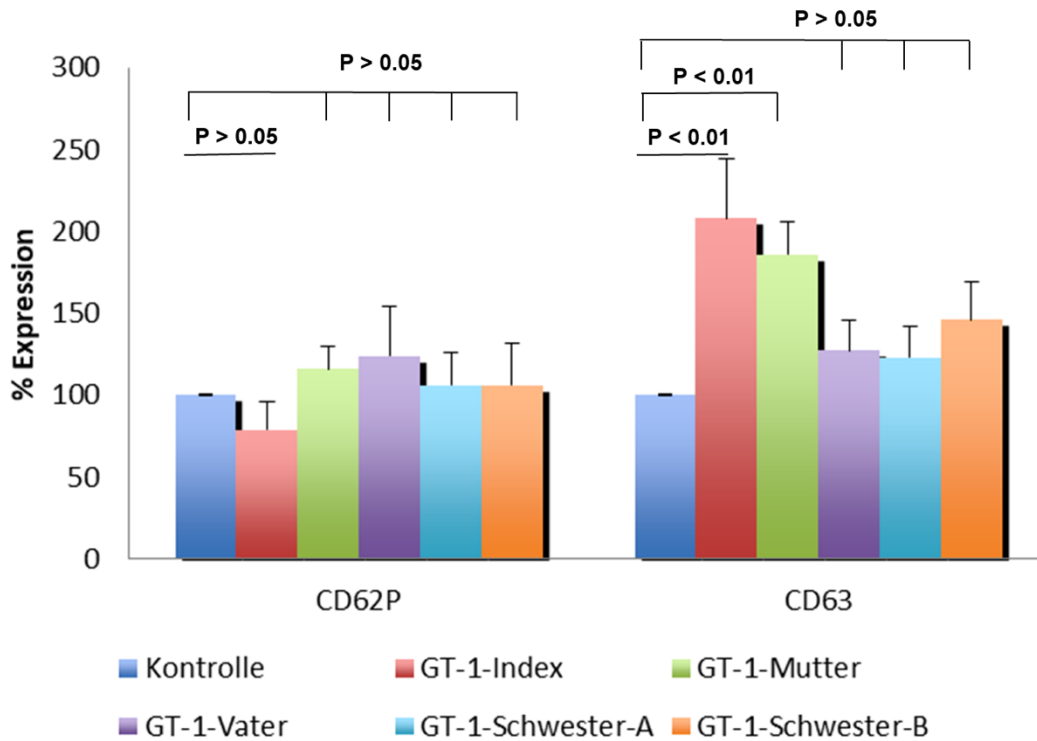


Abbildung 7: CD62P- und CD63-Expression bei der Index-Patientin GT-1-Index und ihren Familienangehörigen nach Stimulierung mit 0,25 U/ml Thrombin.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus 4 unabhängigen Versuchen.

### 4.1.1.5 Aufnahme und Freisetzung von Mepacrine bei Thrombozyten der Index-Patientin GT-1-Index und ihren Familienangehörigen

Sowohl die Aufnahme als auch die Agonisten-induzierte Freisetzung von Mepacrine unterschied sich nach Stimulierung mit Thrombin (Abbildung 8) und Convulxin (Abbildung 9) bei der Index-Patientin GT-1-Index im Vergleich zur Kontrolle nicht wesentlich. Bei den Angehörigen GT-1-Schwester-B und GT-1-Vater war die Aufnahme von Mepacrine vermindert, aber nach maximaler Stimulierung mit 0,2 U/ml Thrombin auf demselben Niveau wie bei den anderen untersuchten Personen und der Kontrolle.

## Ergebnisse

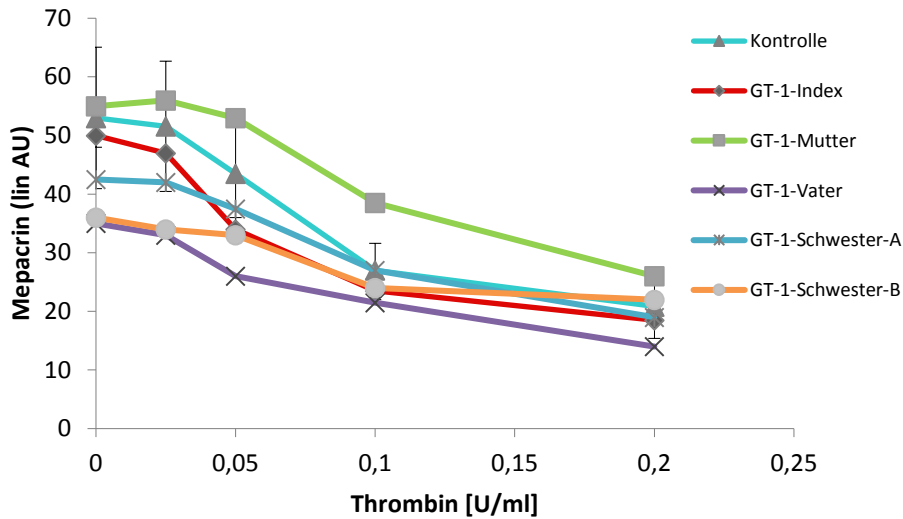


Abbildung 8: Thrombozytäre Mepacrine-Aufnahme und Thrombin-induzierte Freisetzung von Mepacrine bei der Index-Patientin GT-1-Index und ihren Familienangehörigen.

Dargestellt sind für die Patienten die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Versuchen.

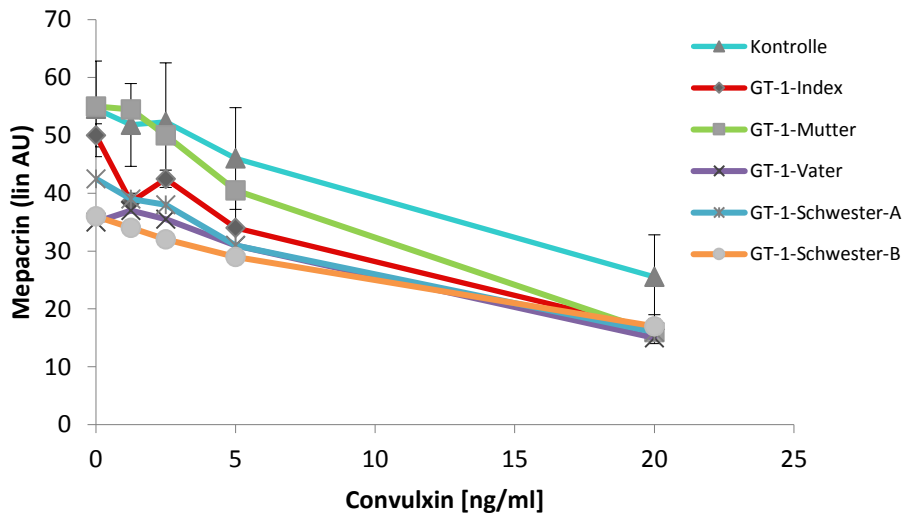


Abbildung 9: Convulxin-induzierte Freisetzung von Mepacrine bei der Index-Patientin GT-1-Index und ihren Familienangehörigen.

Dargestellt sind für die Patienten die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Versuchen.

### 4.1.1.6 Durchflusszytometrische Analyse der LAMP-1-Oberflächen-Expression bei Thrombozyten der Index-Patientin GT-1-Index und ihren Familienangehörigen

Abbildung 10 zeigt die LAMP-1-Expression nach Stimulierung mit steigenden Thrombin-Konzentrationen (0,025; 0,05; 0,1 und 0,2 U/ml). Nach Stimulierung mit 0,1 U/ml Thrombin

## Ergebnisse

war die LAMP-1-Expression bei der Index-Patientin GT-1-Index im Vergleich zu ihren Familienangehörigen erhöht, nach Stimulierung mit 0,05 U/ml Thrombin zusätzlich im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Zu beachten ist jedoch, dass es sich bei den in Abbildung 10 dargestellten Kontrollwerten nicht um tagesgleiche Kontrollen handelt, sondern um Werte, die zu einem früheren Zeitpunkt gemessen wurden (Mittelwert aus n=13) und daher nur unter Vorbehalt mit den aktuellen Patientenwerten vergleichbar sind. Nach Stimulierung mit Convulxin war für die LAMP-1-Expression kein Unterschied zwischen den Patienten und der Kontrolle zu erkennen (Abbildung 11).

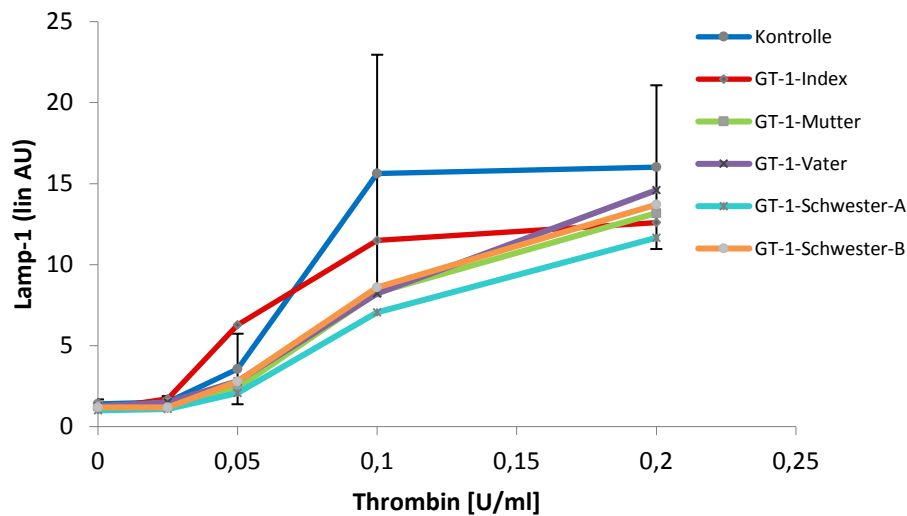


Abbildung 10: LAMP-1-Oberflächen-Expression der Thrombozyten bei der Index-Patientin GT-1-Index und ihren Familienangehörigen nach Stimulierung mit Thrombin.

Dargestellt sind für die Patienten die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Versuchen.

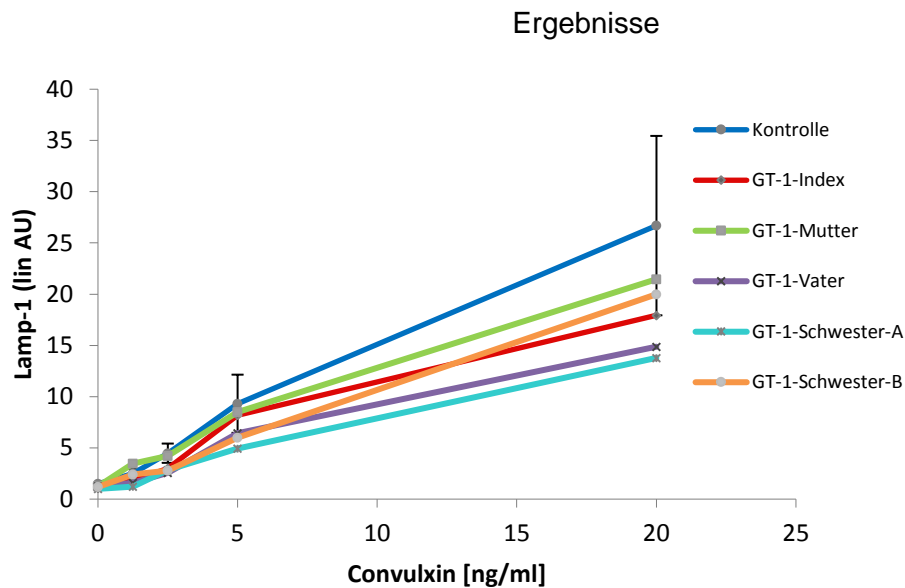


Abbildung 11: LAMP-1-Expression der Thrombozyten bei der Index-Patientin GT-1-Index und ihren Familienangehörigen nach Stimulierung mit Convulxin.

Dargestellt sind für die Patienten die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Versuchen.

#### 4.1.1.7 Western Blot Analyse der Proteinexpression von LAMP-1 und LAMP-3

Der Western Blot wurde wie im Abschnitt 3.11 beschrieben durchgeführt. Die Thrombozyten der Index-Patientin GT-1-Index und ihres Vaters (GT-1-Vater) wurden lysiert und eine Proteinbestimmung durchgeführt. Es wurden 20 µg Protein je Probe in der SDS-PAGE PAGE (8%iges Trenngel) eingesetzt, die Proteine mittels Western Blotting auf eine PVDF-Membran transferiert und einzelne Streifen mit unterschiedlichen monoklonalen Antikörpern (anti-CD63 (LAMP-3); anti-CD107a (LAMP-1); anti-GPIIb: SZ2; anti-vWF) inkubiert. Die Membran-Streifen wurden mit einem HRP-markierten sekundären Antikörper inkubiert und über eine Chemolumineszenz-Reaktion entwickelt. Der Immunoblot wurde je nach Protein unter reduzierenden oder nicht-reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Als Kontrolle wurde mit einem Antikörper gegen  $\alpha$ -Actinin inkubiert.

In Abbildung 12 ist die entwickelte Membran zu sehen. Es ist zu erkennen, dass LAMP-1 und LAMP-3 in allen 3 Fällen (Index-Pat. GT-1-Index, GT-1-Vater und Kontrolle) in den Thrombozyten nachweisbar ist. Im Vergleich zur Kontrolle ist kein wesentlicher quantitativer Unterschied feststellbar. Die mitgeführte Kontrolle ( $\alpha$ -Actinin) zeigt auch keinen Unterschied. Weiterhin ist für die mituntersuchten Proteine GPIIb $\alpha$  und vWF



## Ergebnisse

ebenfalls kein Unterschied zwischen den Patienten und im Vergleich zur Kontrolle feststellbar.

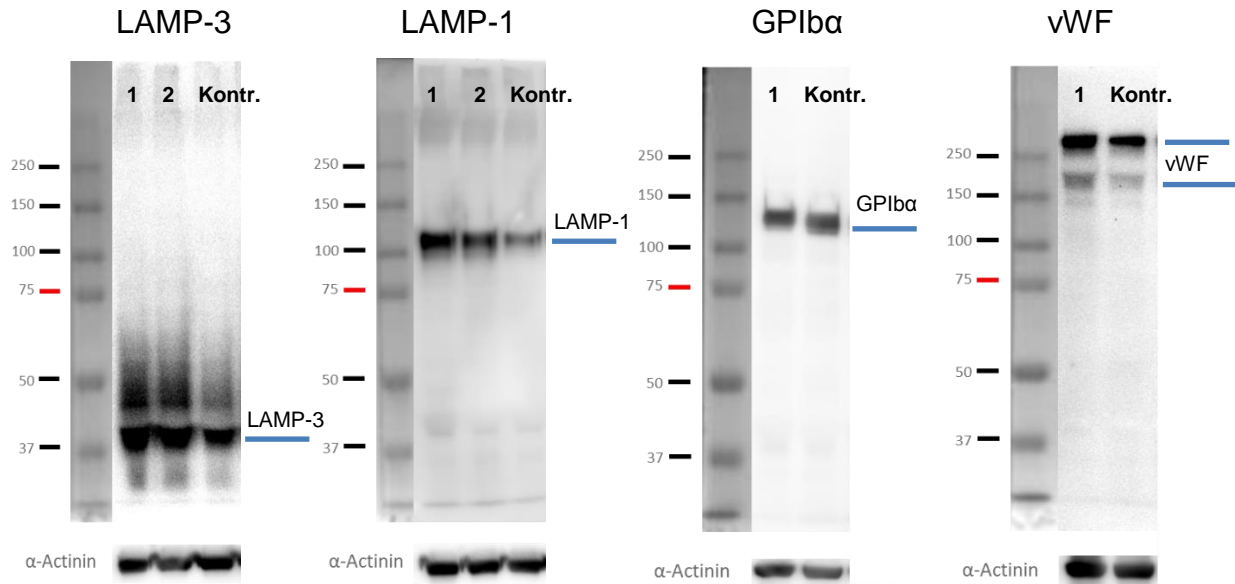


Abbildung 12: Western Blot Analyse der Proteinexpression von LAMP-1, LAMP-3, GPIIb und vWF  
Links ist der Nachweis von LAMP-3 (CD63) zu sehen. Die Banden befinden sich auf gleicher Höhe und es ist kein Unterschied in der Quantität festzustellen. Von links nach rechts folgen außerdem die Immunoblots der Proteine LAMP-1, GPIIb und vWF. Alle 3 Proteine werden ebenfalls in ähnlich hohen Mengen gebildet. Weiterhin ist ganz unten in der Abbildung zusätzlich jeweils eine Bande für die Kontrolle  $\alpha$ -Actinin zu erkennen. 1 = Index-Pat. GT-1-Index; 2 = GT-1-Vater

### 4.1.2 Patienten mit Glanzmann Thrombasthenie

Neben den in Abschnitt 4.1.1 untersuchten Patienten wurden in der vorliegenden Arbeit 4 weitere Patienten mit Glanzmann Thrombasthenie Typ I (GT-2-Index, GT-3-Index, GT-4-Index, GT-5-Index) untersucht, deren Ergebnisse in den folgenden Diagrammen zusammengefasst sind. Zusätzlich ist in den Diagrammen der Mittelwert von 4 heterozygoten GT-Patienten dargestellt. Hierbei handelt es sich um die Eltern und beiden Schwestern der Patientin GT-1-Index.

## Ergebnisse

### 4.1.2.1 Durchflusszytometrische Analyse der thrombozytären Oberflächen-Rezeptoren bei Patienten mit Glanzmann Thrombasthenie

Die Analyse des GPIIb-IIIa-Rezeptorbesatzes mittels Durchflusszytometrie zeigt wie erwartet, dass Typ I GT-Patienten nahezu keinen Fibrinogen-Rezeptor exprimieren. Die heterozygoten Merkmalsträger weisen dagegen einen diskret verminderten GPIIb-IIIa-Besatz auf (Abbildung 13). Für die anderen untersuchten Membranrezeptoren (GPIIb (CD42b), GPIX (CD42a) und GPIV (CD36); Daten für GPIV nicht gezeigt) sind keine signifikanten Unterschiede vorhanden.

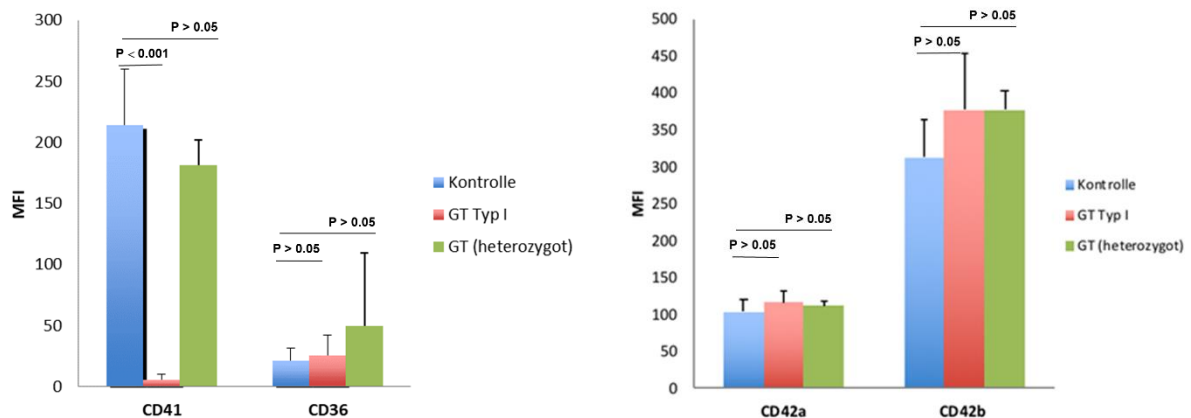


Abbildung 13: Besatz der Membranrezeptoren CD41 (GPIIb), CD42a und CD42b auf der Thrombozytenoberfläche bei Patienten mit GT Typ I und Patienten mit heterozygoter GPIIb-IIIa-Variante. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung ( $n = 4$ ).

### 4.1.2.2 Oberflächen-Expression aktivierter GPIIb-IIIa Komplexe (PAC-1-Antikörper) bei Thrombozyten von Patienten mit Glanzmann Thrombasthenie

Neben der quantitativen Untersuchung des Fibrinogen-Rezeptors (GPIIb-IIIa) wurde auch die funktionelle Untersuchung des Rezeptors durchgeführt. Hierzu wurde indirekt die Fibrinogenbindungskapazität bzw. die Aktivierbarkeit von GPIIb-IIIa mittels PAC-1-Antikörper-Bindung nach Stimulierung mit 10  $\mu$ M ADP oder 10  $\mu$ M TRAP gemessen. Hierbei zeigte sich wie schon zuvor bei der Patientin GT-1-Index gesehen (4.1.1.3), dass Thrombozyten von Patienten mit GT Typ I nahezu kein PAC-1 binden (Abbildung 14). Bei den heterozygoten Merkmalsträgern zeigt sich nach ADP-Stimulierung eine um ca. 50% herabgesetzte *in vitro* Aktivierungskapazität von GPIIb-IIIa, die nach Stimulierung mit TRAP sogar noch deutlicher reduziert war.

## Ergebnisse

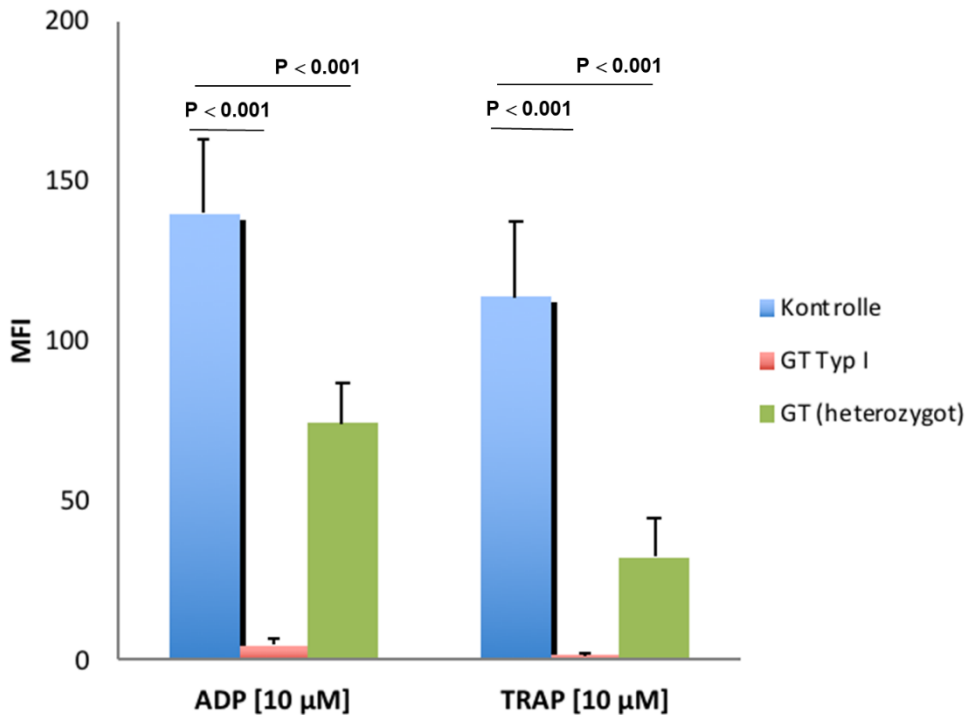


Abbildung 14: *in vitro* Aktivierungskapazität von GPIIb-IIIa auf der Thrombozytenoberfläche nach Stimulierung mit 10 µM ADP oder 10 µM TRAP bei Patienten mit GT.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung (n = 4).

### 4.1.2.3 Thrombin-induzierte Exozytose der $\alpha$ -, $\delta$ -Granula und Lysosomen bei Patienten mit Glanzmann Thrombasthenie

Abbildung 15 zeigt das Ergebnis der Thrombin-induzierten P-Selektin- (CD62P) und CD63-Expression (LAMP-3) in Thrombozyten von Patienten mit Glanzmann Thrombasthenie. Bei Typ I GT-Patienten zeigt sich nach Thrombin-Stimulierung eine im Vergleich zur Kontrollgruppe leicht verminderte CD62P-Expression als Ausdruck der  $\alpha$ -Granula-Freisetzung, die statistisch nicht signifikant ist. Bei Patienten mit heterozygoter Mutation im GPIIb-IIIa-Gen unterscheidet sich die CD62P-Expression nicht von der bei Kontrollen. Bezüglich des  $\delta$ -Granula- und Lysosomen-Markers CD63 imponiert bei Typ I-GT Thrombozyten eine stark erhöhte CD63-Expression, die ca. um das 1,5-2-fache erhöht ist. Bei heterozygoten GT-Patienten ist die CD63-Expression im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls erhöht, wenn auch nicht so stark wie bei GT Typ I Patienten.

## Ergebnisse

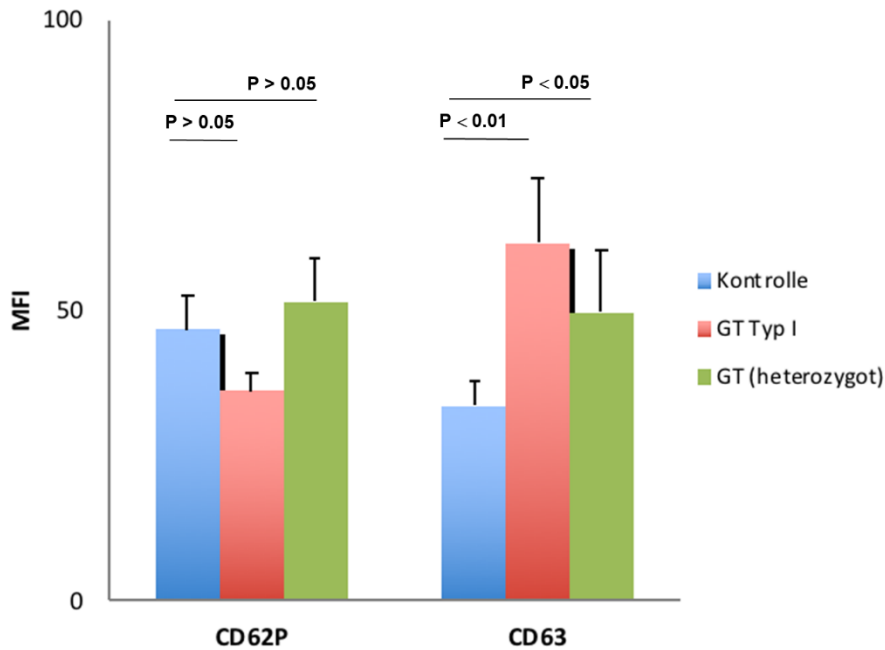


Abbildung 15: CD62P- und CD63-Expression in Thrombozyten von Patienten mit GT nach Stimulierung mit 0,25 U/ml Thrombin.

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung ( $n = 4$ ).

### 4.2 Patienten mit thrombozytären Kombinationsdefekten

Neben Patienten mit Glanzmann Thrombasthenie-Diagnose wurden in dieser Arbeit 2 weitere Patienten mit Thrombozytopathien untersucht. Hierbei handelte es sich zum einen um einen 4-jährigen Jungen (SPD-1-Index) mit verstärkter Blutungsneigung und seine Eltern. Außerdem wurde ein 8-jähriges Mädchen (SPD-2-Index) mit ebenfalls ausgeprägter Blutungsanamnese untersucht inkl. der Eltern und der Zwillingsschwester.

#### 4.2.1 Anamnese des Index-Patienten SPD-1-Index

Bei dem 4-jährigen Patienten SPD-1-Index (ISTH-BAT Blutungsscore: 6) bestehen Petechien sowie eine ausgeprägte Hämatomneigung ubiquitär am gesamten Körper, einschließlich des Kopfes und der Extremitäten. Nasenbluten und Zahnfleischbluten treten selten auf, ebenso kam es beim Zahndurchbruch zu keiner Blutung. Seit dem 10. Lebensmonat ist eine Thrombozytopenie unklarer Genese bekannt. Aufgrund einer Kopfplatzwunde 8/2017 war eine operative Intervention erforderlich.

## Ergebnisse

Aufgrund des Schweregrades der Blutungsneigung hatte der Patient bereits eine umfangreiche diagnostische Abklärung in diversen Gerinnungsambulanzen erhalten, ohne das jedoch der zugrundeliegende Defekt auffindig gemacht werden konnte. Allerdings wurden bereits folgende Hämostase-Störungen ausgeschlossen:

- Bernard-Soulier-Syndrom (BSS)
- Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS)
- von-Willebrand-Syndrom
- Pseudo-von-Willebrand-Syndrom
- MYH9-assoziierte Erkrankungen
- Autoimmunthrombozytopenie

Die Eltern des Index-Patienten sind nicht blutsverwandt, haben keine Blutungssymptome und haben normwertige Thrombozytenzahlen.



Abbildung 16: Index-Patient SPD-1-Index mit multiplen Hämatomen. (freundlicherweise von Frau Dr. M. Krause, DKD HELIOIS Klinik Wiesbaden zur Verfügung gestellt).

### 4.2.1.1 Thrombozytenaggregation beim Index-Patienten SPD-1-Index

Aufgrund der ausgeprägten Thrombozytopenie (22/nl) war die Durchführung einer Thrombozyten-Aggregation nach Born nicht durchführbar.

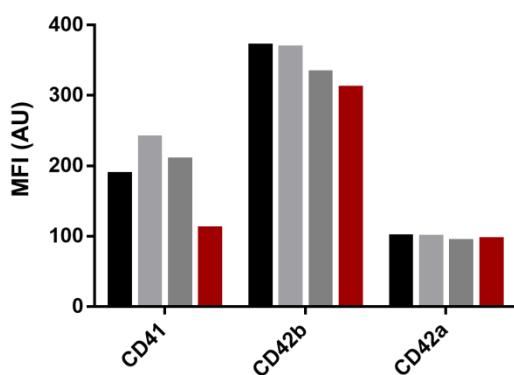
## Ergebnisse

### 4.2.1.2 Durchflusszytometrische Analyse von Thrombozyten-Rezeptoren und Oberflächen-Expression aktivierter GPIIb-IIIa Komplexe (PAC-1-Antikörper) bei Thrombozyten des Index-Patienten SPD-1-Index und seinen Eltern

Die durchflusszytometrischen Analysen der Oberflächenrezeptoren wurden zum einen im Labor der DKD HELIOS Klinik Wiesbaden, zum anderen im Labor des CTH (AG PD Dr. K. Jurk) in Mainz durchgeführt.

In der Durchflusszytometrie zeigte sich für den Index-Patienten in beiden Laboren eine deutliche Verminderung des Fibrinogen-Rezeptors GPIIb-IIIa auf ca. 50% im Vergleich zur Tageskontrolle. Alle weiteren untersuchten Oberflächenrezeptoren (CD42b, CD42a, GPVI und CD29) waren dagegen normwertig. Bei den Eltern wurde ein normaler Besatz des Fibrinogen-Rezeptors gemessen, gleiches gilt auch für die restlichen Membranrezeptoren (Abbildung 17).

A.



B.

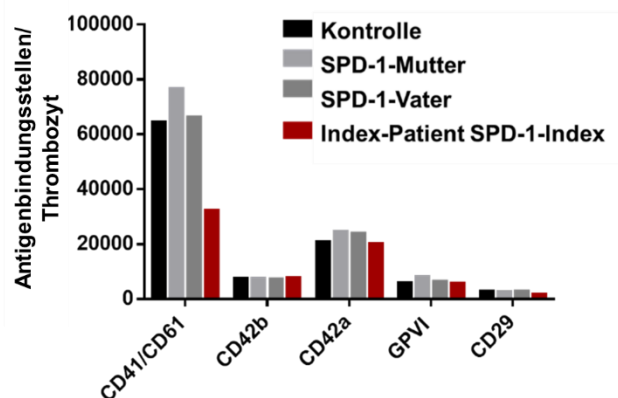


Abbildung 17: Durchflusszytometrische Quantifizierung der thrombozytären Oberflächen-Rezeptoren, gemessen im Labor A). DKD Wiesbaden und B). CTH Mainz

Des Weiteren war auch die PAC-1-Bindung, d.h. die Expression des aktivierten GPIIb-IIIa nach Stimulierung mit 10  $\mu$ M ADP oder 10  $\mu$ M TRAP im Vergleich zur Tageskontrolle stark vermindert (19% bzw.  $\leq$ 5%). Bei den Eltern lag eine normale Aktivierbarkeit von GPIIb-IIIa *in vitro* vor.

## Ergebnisse

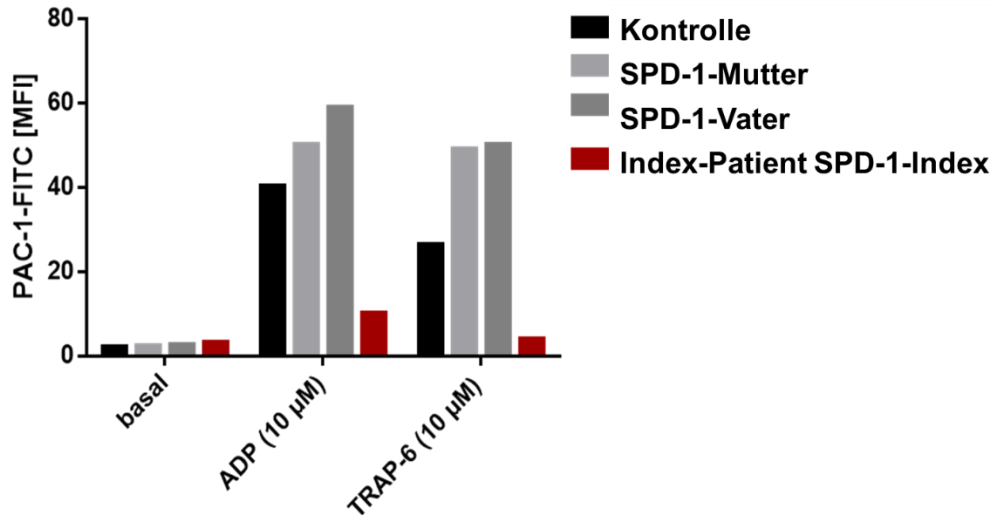


Abbildung 18: *in vitro* Aktivierungskapazität von GPIIb-IIIa auf der Thrombozytenoberfläche nach Stimulierung mit 10 µM ADP oder 10 µM TRAP beim Index-Patienten SPD-1-Index und seinen Eltern

Sowohl die Bestimmung des Fibrinogen-Rezeptorbesatzes als auch die PAC-1-Expression deuten darauf hin, dass beim Index-Patienten SPD-1-Index eine heterozygote Mutation im GPIIb-IIIa-Gen vorliegt.

### 4.2.1.3 Thrombin-induzierte Exozytose der $\alpha$ -, $\delta$ -Granula and Lysosomen beim Index-Patienten SPD-1-Index und seinen Eltern

Im Folgenden sind zunächst die Experimente dargestellt, die im Labor der DKD HELIOS Klinik Wiesbaden durchgeführt wurden (Abbildung 19). Die Analyse der P-Selektin-Expression (CD62P) als Marker der  $\alpha$ -Granula-Sekretion ergab für den Index-Patienten eine stark verminderte Freisetzung im Vergleich zur Tageskontrolle nach Stimulierung mit 0.25 U/ml Thrombin (Abbildung 19 A). Im basalen *ex vivo* Zustand war kein Unterschied feststellbar. Des Weiteren zeigte sich eine stark verminderte Expression des  $\delta$ -Granula- und Lysosomen-Markers Granulophysin (CD63) (Abbildung 19 B). Bei den Eltern des Index-Patienten war die  $\alpha$ - und  $\delta$ -Granula-Sekretion nicht relevant verändert.

## Ergebnisse

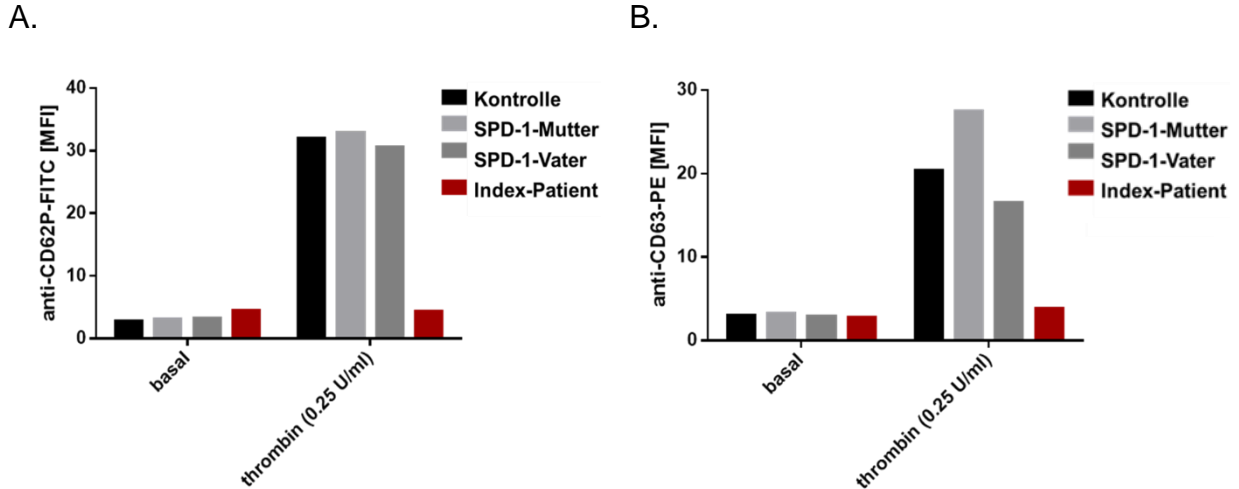


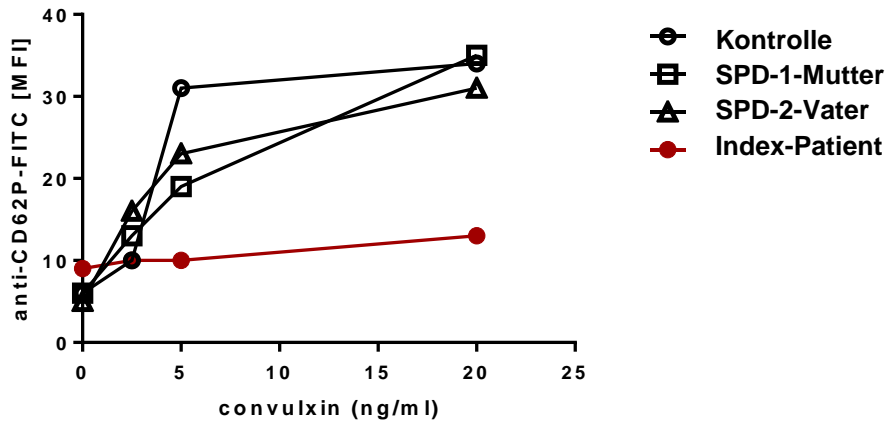
Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse der P-Selektin- und CD63-Expression nach Stimulierung mit Thrombin A). P-Selektin-Expression ( $\alpha$ -Granula) B). CD63-Expression ( $\delta$ -Granula, Lysosomen)

Neben den in Abbildung 19 gezeigten Endpunktmessungen, die mit einer hohen Thrombin-Konzentration (0,25 U/ml) durchgeführt wurden, um die Granula maximal zu aktivieren und dadurch zur Freisetzung zu bringen, wurden außerdem noch Konzentrationsreihen mit Convulxin gemessen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 20 dargestellt. Auch hier wurde beim Index-Patienten im Vergleich zur Tageskontrolle eine stark erniedrigte CD62P- und CD63-Expression gemessen, insbesondere nach Stimulierung mit der hohen Convulxin-Konzentration von 20 ng/ml war der Unterschied sehr groß. Für die Eltern war mit dieser hohen Convulxin-Konzentration (20 ng/ml) kein Unterschied im Vergleich zur Kontrolle feststellbar. Lediglich bei einer Convulxin-Konzentration von 5 ng/ml war sowohl die CD62P- als auch die CD63-Expression reduziert, was darauf hindeutet, dass sich  $\alpha$ - und  $\delta$ -Granula schlechter aktivieren lassen.



## Ergebnisse

A.



B

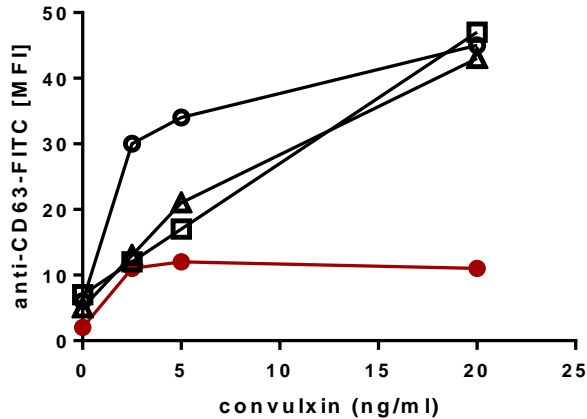


Abbildung 20: Convulxin-induzierte Exozytose der  $\alpha$ - und  $\delta$ -Granula. A). P-Selektin-Expression ( $\alpha$ -Granula) B). CD63-Expression ( $\delta$ -Granula, Lysosomen)

Ferner wurde zur Untersuchung der  $\delta$ -Granula der „Mepacrine-Assay“ durchgeführt. Mepacrine ist ein auto-fluoreszentes Antibiotikum, das spezifisch in den  $\delta$ -Granula der Thrombozyten durch Bindung an ADP und ATP eingelagert wird. Nach Stimulierung der Thrombozyten durch Bindung an ADP und ATP eingelagert wird. Nach Stimulierung der Thrombozyten mit diversen Agonisten und der Freisetzung aus den  $\delta$ -Granula nimmt auch die intrazelluläre Konzentration von Mepacrine wieder ab. Diese Abnahme kann durchflusszytometrisch gemessen werden und ist somit ein Surrogat-Marker für die  $\delta$ -Granula.

In Abbildung 21A ist zu sehen, dass beim Index-Patienten im nicht-aktivierten Zustand die thrombozytäre Mepacrine-Aufnahme im Vergleich zur Kontrolle reduziert war und es nach

## Ergebnisse

Stimulierung mit Convulxin kaum noch zur Abnahme des Mepacrine-Signals kam, was darauf schließen lässt, dass entweder die Anzahl der  $\delta$ -Granula vermindert ist oder die  $\delta$ -Granula weniger Mepacrine aufnehmen können, da die Inhaltsstoffe ADP und ATP in geringerer Quantität vorhanden sind.

Weiterhin wurde die Oberflächen-Expression der Lysosomen untersucht. Hierzu wurde das lysosomale Hauptmembranprotein LAMP-1 (CD107a) durchflusszytometrisch gemessen. Hierbei zeigte sich (siehe Abbildung 21B), dass beim Index-Patienten auch nach Stimulation mit höheren Convulxin-Konzentrationen (20 ng/ml) keine weitere Expression möglich ist, im Gegensatz zur Kontrolle und den Eltern, bei denen eine Dosis-Wirkungs-Beziehung erkennbar war.

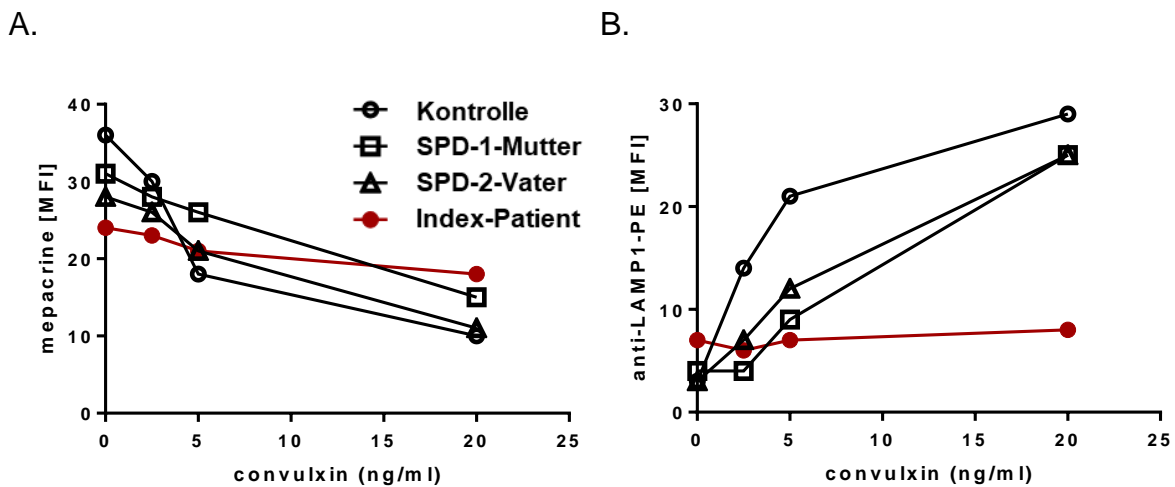


Abbildung 21: Durchflusszytometrische Analyse der  $\delta$ -Granula und Lysosomen-Expression . A). Aufnahme und Freisetzung von Mepacrine aus den  $\delta$ -Granula. B). LAMP-1 Oberflächen-Expression der Lysosomen

### 4.2.1.4 Molekulargenetische Analyse beim Index-Patienten SPD-1-Index und seinen Eltern

Zur Identifizierung krankheitsauslösender Mutationen, die ursächlich für die Blutungsneigung beim Index-Patienten sein könnten, wurde nach Aufklärung und Einverständnigabgabe der Eltern EDTA-Blut des Index-Patienten und das seiner Eltern in das CTH Plattformlabor „Advanced Diagnostics“ (Leitung Frau PD Dr. H. Rossmann) im Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz überführt und mittels Next-Generation Sequencing (NGS) bzw. Whole Exome Sequencing“ (WES) untersucht.

## Ergebnisse

Im Rahmen dieser Analyse wurden beim Index-Patienten und dessen Eltern folgende Mutationen identifiziert:

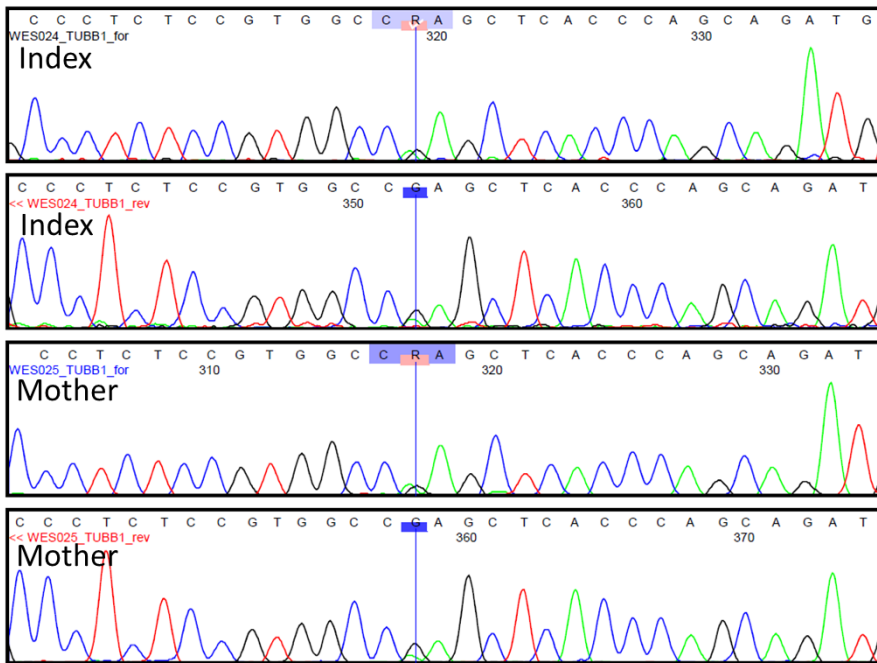


Abbildung 22: Darstellung der Mutation im TUBB1-Gen beim Index-Patienten und Mutter im Elektropherogramm

## Ergebnisse

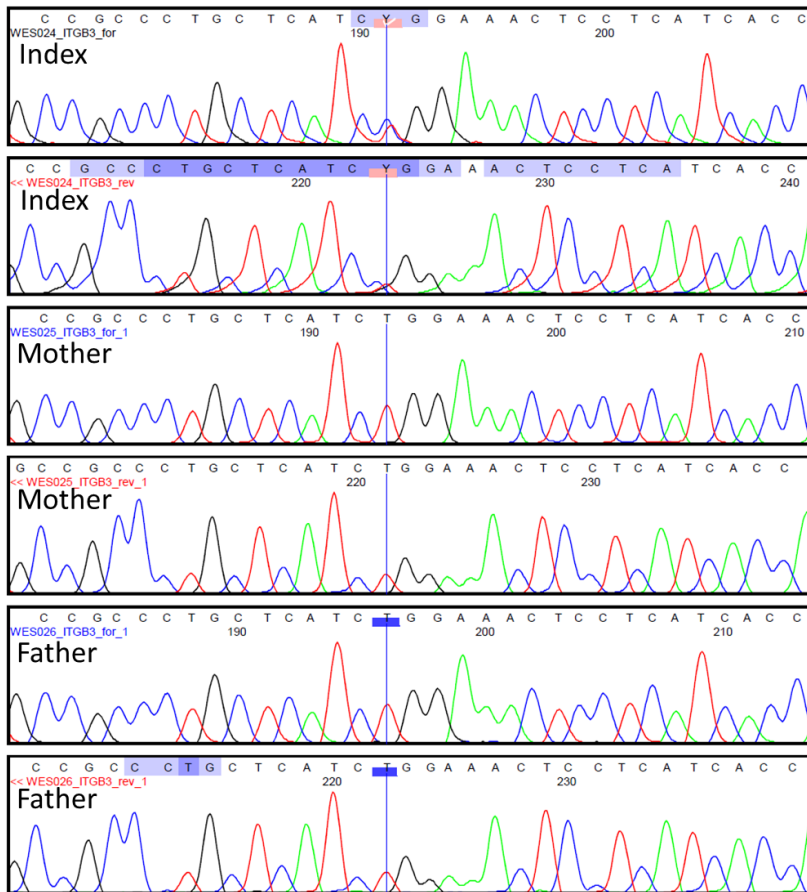


Abbildung 23: Darstellung der Mutation im *ITGB3*-Gen beim Index-Patienten und Eltern im Elektropherogramm

Bei dem Index-Patienten wurde eine heterozygote Mutation im Exon 4 des Tubulin *TUBB1*-Gens an der Stelle Glu288Lys (*TUBB1*, Exon 4, c.862G>A; p.Glu288Lys; Austausch von Glutaminsäure gegen Lysin) nachgewiesen. Die Variante ist bereits in der Datenbank vorbeschrieben (The Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP)) und führt zu einer Tubulin-Variante, die gemäß den Richtlinien des ACMG als pathogen mit unklarer Signifikanz eingestuft werden kann. Bei der Mutter ist diese Mutation ebenfalls nachweisbar und wurde somit an den Sohn weitervererbt, allerdings ist sie bei der Mutter asymptomatisch.

Zudem wurde eine bisher in keiner Datenbank aufgeführte heterozygote Mutation im Exon 14 des *ITGB3*-Gens nachgewiesen (*ITGB3*, Exon 14, c.2221T>C; p.Trp741Arg), welche für die beta 3-Untereinheit des Integrins (Glykoprotein IIIa) kodiert und zum Austausch eines bei Wirbeltieren hochkonservierten Tryptophans gegen ein basisches Arginin führt.

## Ergebnisse

Diese als vermutlich pathogen einzustufende Variante ist auch phänotypisch in der ca. 50% Expression des GPIIb-IIIa Rezeptors durchflusszytometrisch messbar. Weder Mutter noch Vater sind Träger dieser ITGB3-Variante.

Außerdem wurde eine *ADAMTS13*-Variante nachgewiesen (c.1976G>A; p.R659KR), die zuvor bei keinem anderen Patienten nachgewiesen wurde. Sie wurde von dem Vater weitervererbt. Für die Variante unklarer Signifikanz kann eine mögliche Pathogenität weder mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen noch ausgeschlossen werden.

*Tabelle 18: Nachgewiesene Mutationen bei dem Index-Patienten und den Eltern*

Patient	Genotyp	Gen	Exon	Mutation	Effekt
<b>SPD-1-Index</b>	<b>Heterozygot</b>	<b>ITGB3</b>	<b>14</b>	<b>c.2221T&gt;C</b>	<b>p.Trp741Arg</b>
<b>SPD-1-Index</b>	<b>Heterozygot</b>	<b>TUBB1</b>	<b>4</b>	<b>c.862G&gt;A</b>	<b>p.Glu288Lys</b>
<b>SPD-1-Index</b>	<b>Heterozygot</b>	<b>ADAMTS13</b>		<b>c.1976G&gt;A</b>	<b>p.R659KR</b>
<b>SPD-1-Mutter</b>	<b>Heterozygot</b>	<b>TUBB1</b>	<b>4</b>	<b>c.862G&gt;A</b>	<b>p.Glu288Lys</b>
<b>SPD-1-Vater</b>	<b>Heterozygot</b>	<b>ADAMTS13</b>		<b>c.1976G&gt;A</b>	<b>p.R659KR</b>

### 4.2.1.5 Immunofluoreszenzmikroskopie

Um zu überprüfen, ob die in Abschnitt 4.2.1.4 nachgewiesene Tubulin-Mutation sich auch phänotypisch auswirkt, wurden Blutausstriche angefertigt und ins Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin nach Tübingen geschickt (Dr. K. Althaus) und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert (Abbildung 24).

## Ergebnisse

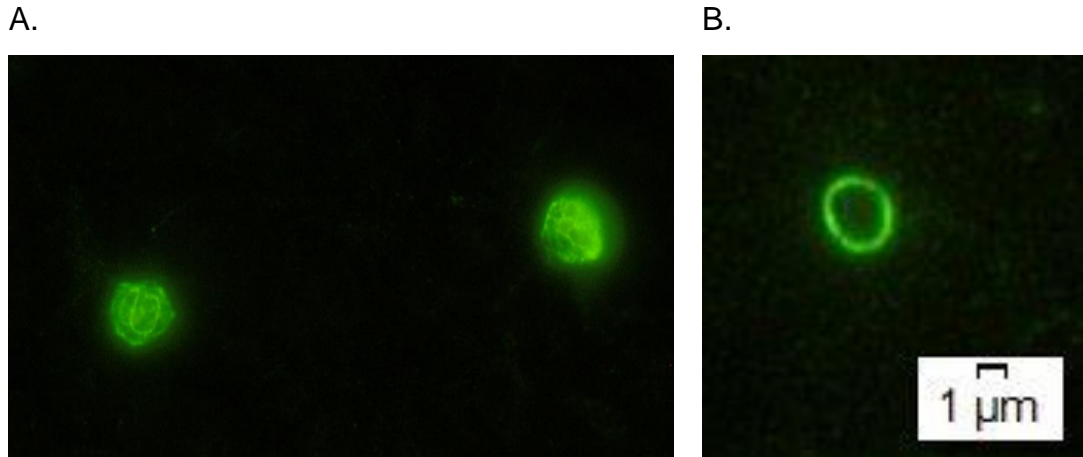
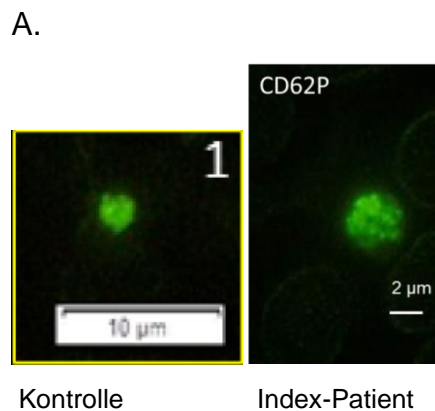


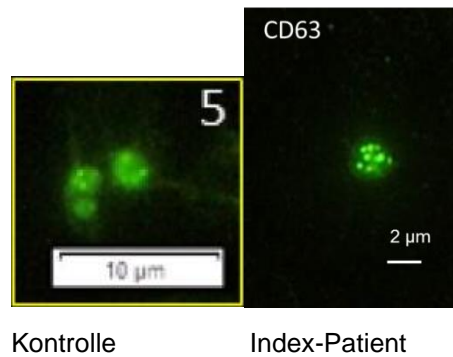
Abbildung 24: Immunhistochemischer Nachweis von  $\beta$ -Tubulin in den Thrombozyten des Index-Patienten (A) und bei einem gesunden Probanden (B)

In Abbildung 24 B ist zu sehen, dass sich bei den Thrombozyten der gesunden Kontroll-Person immunreaktives Tubulin in einem ringförmigen Bereich unterhalb der Zellmembran nachweisen lässt. Im Gegensatz dazu scheint die Zytoarchitektur der Thrombozyten des Index-Patienten gestört zu sein. Insgesamt scheint dort die Anzahl der Windungen erhöht zu sein und die Mikrotubuli sind wie Wollknäule angeordnet. Außerdem sieht es so aus als sei hier der fluoreszierende Ring an einigen Stellen unterbrochen. Die Granula-Proteine CD62P, CD63 (LAMP-3) und LAMP-1 (CD107a) präsentierten sich hingegen unauffällig wie in der folgenden Abbildung 25 zu sehen ist.



B

## Ergebnisse



C.

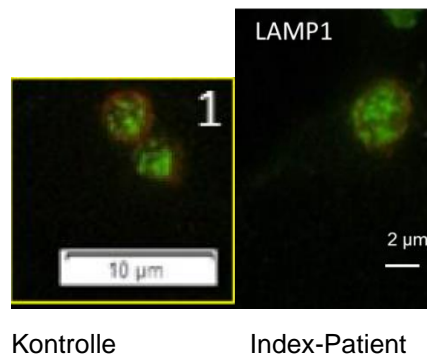


Abbildung 25: Immunhistochemischer Nachweis von thrombozytärem CD62P (A), CD63 (B) und LAMP-1 (C) beim Index-Patienten (rechts) und bei einem gesunden Probanden (links)

### 4.2.2 Anamnese der Index-Patientin SPD-2-Index

Nach Angaben der Erziehungsberechtigten bestanden bei der 8-jährigen Patientin ausgeprägte Hämatome im Bereich des Stammes und der Extremitäten. 2 – 3 x pro Tag sei über eine Woche lang ein Nasenbluten aufgetreten, außerdem trat Zahnfleischbluten beim Zähneputzen (ISTH-BAT Blutungsscore: 6). Die Patientin hat eine zweieiige Zwillingschwester, bei der keine erhöhte Hämatomneigung bekannt ist. Die Eltern der Index-Patientin sind ebenfalls klinisch unauffällig und nicht blutsverwandt.

#### 4.2.2.1 Thrombozytenaggregation bei der Index-Patientin SPD-2-Index

Bei der Index-Patientin SPD-2-Index zeigt sich eine insgesamt pathologisch veränderte Thrombozytenaggregation (Abbildung 26). Nach Stimulierung mit ADP (2,5 und 5 µM) war die Thrombozytenaggregation leicht vermindert und nach Stimulierung mit Kollagen (1 µg/ml) deutlich vermindert. Die Aggregation mit TRAP (5 µM) und dem PAR-4 Agonisten

## Ergebnisse

(125  $\mu\text{M}$ , lila Aggregationskurve) war reversibel auslösbar mit anschließender Desaggregation der Thrombozyten. Die Arachidonsäure-induzierte Aggregation war hingegen normal auslösbar.

Das Antibiotikum Ristocetin löst über das GPIIb und den vWF eine Agglutination der Thrombozyten aus. Diese war nach Zusatz von 0,9  $\mu\text{g/ml}$  Ristocetin leicht vermindert (Abbildung 26), bei 2 weiteren unabhängigen Versuchen (an unterschiedlichen Untersuchungstagen) jedoch normal.

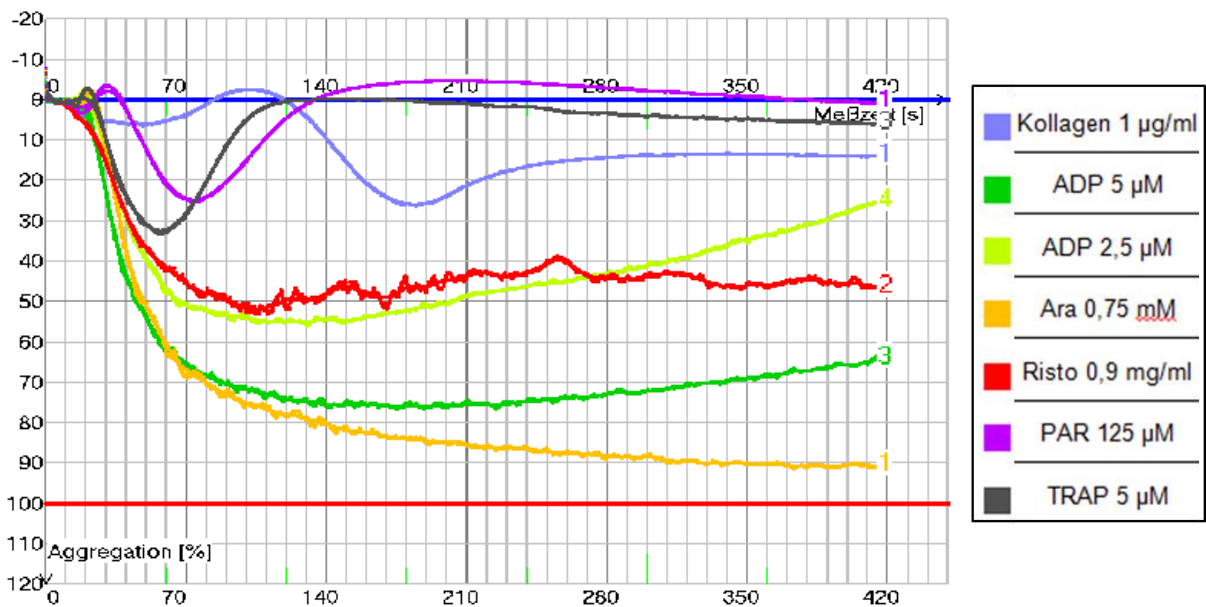


Abbildung 26: Agonisten-induzierte Thrombozytenaggregation bei der Index-Patientin SPD-2-Index

### 4.2.2.2 Durchflusszytometrische Analyse von Thrombozyten-Rezeptoren und Oberflächen-Expression aktivierter GPIIb-IIIa Komplexe (PAC-1-Antikörper) bei Thrombozyten der Index-Patientin SPD-2-Index und ihren Familienangehörigen

Durchflusszytometrisch zeigte sich bei der Index-Patientin eine Verminderung des GPIIb-IIIa-Rezeptorbesatzes auf 69% (GeoMean CD41: 132) verglichen mit der gesunden Tageskontrolle (GeoMean CD41: 190). Bei der Mutter der Index-Patientin wurde ein ähnlich niedriger GPIIb-IIIa-Rezeptorbesatz gemessen (GeoMean CD41: 130). Bei der Zwillingsschwester war der Fibrinogenrezeptor ebenfalls vermindert, allerdings nicht ganz so stark wie bei der Index-Patientin (GeoMean CD41: 149). Der Vater war diesbezüglich unauffällig (GeoMean CD41: 195).



## Ergebnisse

Alle weiteren untersuchten Oberflächenrezeptoren (GPIb $\alpha$  (CD42b), GPIX (CD42a) und GPIV(CD36)) unterschieden sich nicht wesentlich im Vergleich zur Tageskontrolle. Um den verminderten GPIIb-IIIa-Besatz labordiagnostisch zu bestätigen, wurde die Index-Patientin ein weiteres Mal einbestellt und mit 51% GPIIb-IIIa-Rezeptorbesatz wurde der zuvor gemessen Wert bestätigt.

Tabelle 19: Rezeptor-Besatz bei der Index-Patientin SPD-2-Index und Familienangehörigen.

Dargestellt sind die GeoMean-Werte (MFI=Mittlere Fluoreszenzintensität)

	Index-Pat.	Mutter	Vater	Schwester	Kontrolle
<b>CD42a</b>	85	82	77	79	90
<b>CD42b</b>	252	262	224	233	240
<b>CD41</b>	132	130	195	149	190
<b>CD36</b>	20	33	22	32	15

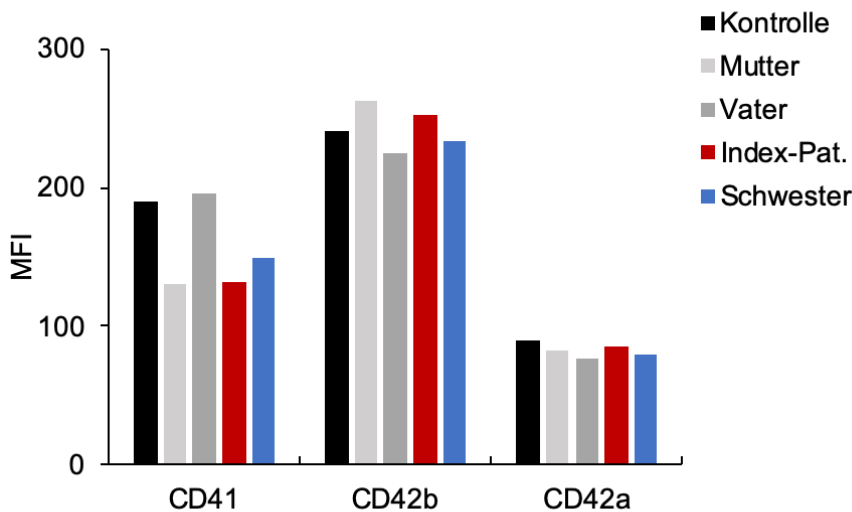


Abbildung 27: Durchflusszytometrische Quantifizierung der thrombozytären Membran-Rezeptoren CD41, CD42b und CD42a bei der Index-Patientin sowie ihren Eltern und Zwillingsschwester

Neben der quantitativen Untersuchung des Fibrinogen-Rezeptors (GPIIb-IIIa) wurde auch die funktionelle Untersuchung des Rezeptors durchgeführt. Die hierfür angewandte *in vitro* Aktivierungskapazität von GPIIb-IIIa (PAC-1-Messung) war bei der Index-Patientin im Vergleich zur Tageskontrolle nach Stimulierung mit 10  $\mu$ M TRAP, aber auch nach

## Ergebnisse

Aktivierung mit 10  $\mu\text{M}$  ADP deutlich herabgesetzt (Abbildung 28). Bei der Mutter der Index-Patientin war die *in vitro* Aktivierungskapazität von GPIIb-IIIa ebenfalls reduziert, jedoch nicht ganz so stark wie bei der Index-Patientin selbst. Nicht wesentlich verändert war dagegen die *in vitro* Aktivierungskapazität von GPIIb-IIIa bei Vater und Schwester der Index-Patientin. Im basalen *ex vivo* Zustand war kein Unterschied feststellbar, sodass eine Voraktivierung von GPIIb-IIIa *in vivo* ausgeschlossen werden kann.

Tabelle 20: *in vitro* Aktivierungskapazität von GPIIb-IIIa bei der Index-Patientin SPD-2-Index und Familienangehörigen.

Dargestellt sind die GeoMean-Werte sowie die relativen Werte in %

	SPD-2-Index	Mutter	Vater	Schwester	Kontrolle
<b>Nicht aktiviert</b>	2,19 (95%)	2,3 (100%)	2,8 (121%)	2,6 (113%)	2,3
<b>ADP</b>	34,5 (48%)	37,0 (52%)	58,7 (82%)	56,5 (79%)	71,35
<b>TRAP</b>	5,9 (10%)	22,1 (37%)	57,4 (95%)	43,7 (72%)	60,3

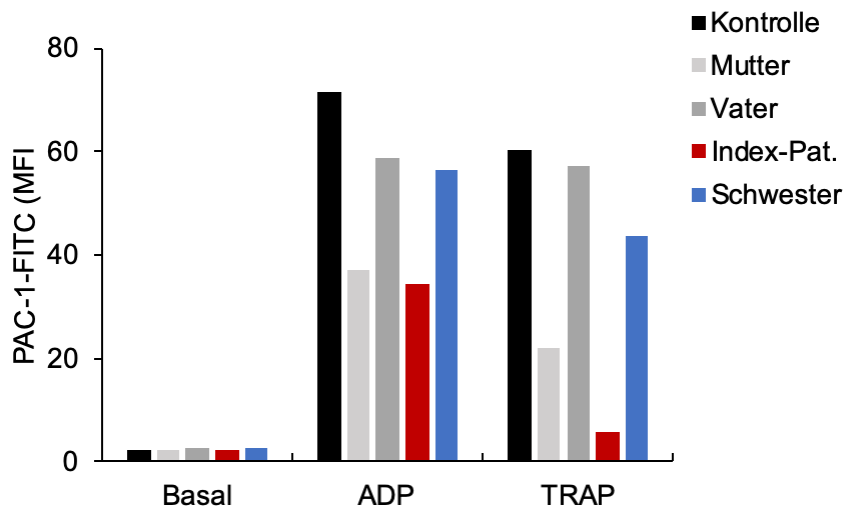


Abbildung 28: *in vitro* Aktivierungskapazität von GPIIb-IIIa auf der Thrombozytenoberfläche nach Stimulierung mit 10  $\mu\text{M}$  ADP oder 10  $\mu\text{M}$  TRAP bei der Index-Patientin SPD-2-Index und Familienangehörigen.

## Ergebnisse

### 4.2.2.3 Thrombin-induzierte Exozytose der $\alpha$ - und $\delta$ -Granula bei der Index-Patientin SPD-2-Index und ihren Familienangehörigen

Abbildung 29 zeigt das Ergebnis der Thrombin-induzierten P-Selektin- (CD62P) und CD63-Oberflächen-Expression (LAMP-3) in Thrombozyten der Index-Patientin sowie Eltern, Zwillingschwester und Tageskontrolle. Für die P-Selektin-Expression wurde im Basalzustand und nach Aktivierung mit Thrombin (0,25 U/ml) kein wesentlicher Unterschied innerhalb des untersuchten Kollektiv gemessen (Abbildung 29A). Was die Messung des  $\delta$ -Granula- und Lysosomen-Markers Granulophysin (CD63) angeht, so zeigten die Thrombozyten der Index-Patientin eine stark reduzierte Expression nach Thrombin-Stimulierung (Abbildung 29B), sodass hier von einer pathologischen Thrombin-induzierten Exozytose der dense-Granula ausgegangen werden kann. Bei den Thrombozyten der Eltern und Zwillingschwester war die  $\delta$ -Granula-Sekretion nicht vermindert.

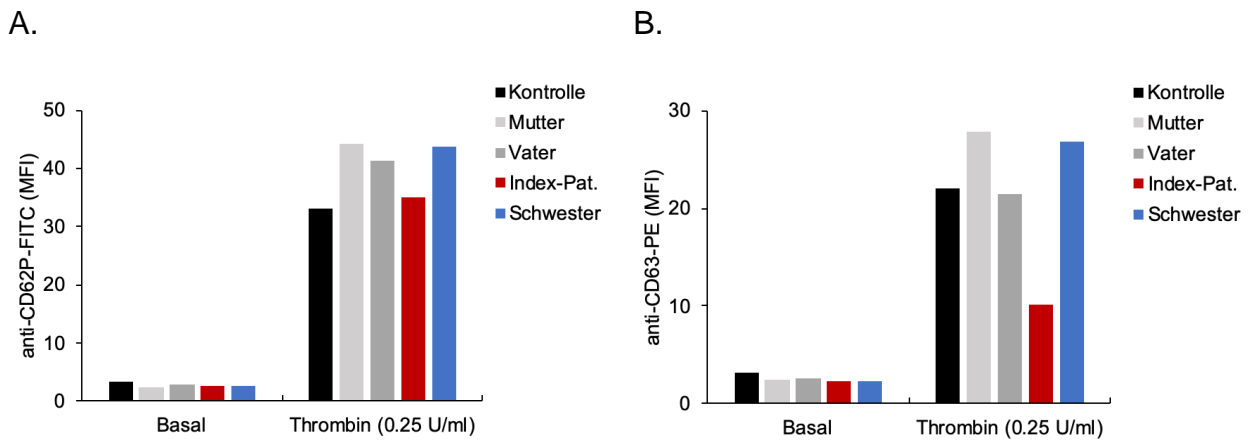


Abbildung 29: Durchflusszytometrische Analyse der thrombozytären P-Selektin- und CD63-Expression nach Stimulierung mit Thrombin A). P-Selektin-Expression ( $\alpha$ -Granula) B). CD63-Expression ( $\delta$ -Granula, Lysosomen)

### 4.2.2.4 Molekulargenetische Analyse bei der Index-Patientin SPD-2-Index und ihren Familienangehörigen

In Tabelle 1 sind die bei der Index-Patientin SPD-2-Index und ihren Familienangehörigen mittels Whole Exome Sequencing identifizierten DNA-Sequenzvarianten dargestellt, die

## Ergebnisse

alle innerhalb der Experimentellen Plattform „Advanced Diagnostics“ unter der Leitung von Frau PD Dr. H. Rossmann im Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz nachgewiesen wurden. Es wurde eine Reihe von Kandidatengenomen (NGS Multi-Gen-Panel) analysiert, bei dem ein Zusammenhang zwischen pathogener Variante und entsprechendem Phänotyp vermutet wird. Im Rahmen der molekulargenetischen Analyse wurden bei der Index-Patientin, ihrer Zwillingschwester und den Eltern folgende Varianten identifiziert:

*Tabelle 21: Sequenzierungsergebnisse der Index-Pat. SPD-2-Index, ihrer Zwillingschwester und den Eltern*

Gen	Geno- -typ	Variante	Variante bekannt?	<i>in silico</i> Vorhersage	Index -Pat.	Schwester	Mutter	Vater
<i>LTBP1</i>	GT	c.3063G>GT p.Q1021HQ	Nein	unklare Signifikanz	het	GG (wt)	GG (wt)	het
<i>LTBP1</i>	CT	c.3797C>CT p.S1266SF	Nein	unklare Signifikanz	het	het	het	CC (wt)
<i>RAB38</i>	CT	c.124T>CT p.I42VI	Nein	unklare Signifikanz	het	het	AA (wt)	het
<i>RAB27A</i>	CT	c.17T>CT p.Y6CY	Nein	unklare Signifikanz	het	het	GG(m u)	AA (wt)
<i>ARHGAP 17</i>	AG	c.1574G>AG p.P525LP	Nein	unklare Signifikanz	het	het	het	CC (wt)
<i>ARHGAP 17</i>	CT	c.1529C>CT p.R510RQ	Nein	unklare Signifikanz	het	het	GG (wt)	het
<i>ITGA2B</i>	AG	c.1787A>AG p.I596IT	Ja	pathogen	het	het	het	TT (wt)
<i>F2RL3</i>	AG	c.691G>AG p.A231TA	Nein	unklare Signifikanz	het	GG (wt)	GG (wt)	het
<i>TGFB1</i>	AG	c.788G>AG p.T263IT	Nein	unklare Signifikanz	het	CC (wt)	CC (wt)	het

Bei der Index-Patientin wurde eine Sequenzvariante in Exon 18 der GPIIb-Untereinheit (*ITGA2B*: c.1787A>AG, p.I596IT) heterozygot nachgewiesen. Die Variante ist bereits in der Datenbank vorbeschrieben und kann gemäß den Richtlinien des ACMG als pathogen eingestuft werden. Diese Mutation findet sich auch bei der Zwillingschwester und der Mutter, nicht jedoch beim Vater und wurde somit von der Mutter an die beiden Töchter weitervererbt.

## Ergebnisse

Des Weiteren fanden sich bei der Index-Patientin die heterozygoten Varianten *F2RL3* (kodiert für den Protease-aktivierte Rezeptor 4 (PAR-4)), *LTBP1* (*Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1*), *TGFB1* (*Transforming growth factor beta 1*), *RAB38* (*Ras-related protein Rab-38*), *RAB27A* (*Ras-related protein Rab-27A*) und *ARHGAP17* (*Rho GTPase Activating Protein 17*), die alle vom Vater stammen. Da die asymptotische Zwillingschwester alle Varianten heterozygot besitzt bis auf *F2RL3*, *LTBP1* und *TGFB1*, tragen wahrscheinlich diese gefundenen Varianten (primär die heterozygote *F2RL3*-Variante) zusammen mit der heterozygoten *ITGA2B*-Mutation zur Blutungsneigung bei der Index-Patientin bei.

## 5 Diskussion

### 5.1 Thrombozyten-Funktionsuntersuchungen und molekulargenetische Analyse bei Patienten mit Glanzmann Thrombasthenie

Glanzmann Thrombasthenie ist eine autosomal-rezessiv vererbte Thrombozytenfunktionsstörung, die sich durch qualitative und/oder quantitative Defekte des Fibrinogenrezeptors Glykoprotein (GP) IIb-IIIa (Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ; CD41/CD61) kennzeichnet. Das GPIIb-IIIa wird von zwei unterschiedlichen Genen kodiert (*ITGA2B*: GPIIb; *ITGB3*: GPIIIa) und ist einer der wichtigsten Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche. Nach vaskulären Verletzungen vermittelt es die Thrombozytenaggregation und ist an der Thrombozytenadhäsion an subendotheliale Strukturen beteiligt. Betroffene leiden an milden bis schweren Blutungen, bei denen es sich meist um Schleimhautblutungen handelt (120). Diese Erkrankung zählt mit einer Prävalenz von 1:1.000.000 zu den seltenen Erbkrankheiten und tritt häufig auf Grund des intermediären Erbgangs in Kulturen in Erscheinung, in denen Ehen unter Familienangehörigen geschlossen werden. Die klinisch auffälligen Patienten sind in der Regel homozygot oder „compound“ heterozygot. Bei den heterozygoten Personen, bei denen der Rezeptorbesatz aufgrund des autosomal rezessiven Erbgangs zu 50–70% intakt ist, fällt eine gestörte Thrombozytenaggregation nur bei niedrigen Grenzkonzentrationen der verwendeten Aktivatoren auf. In der Regel sind diese Patienten klinisch unauffällig und fallen erst durch Familienuntersuchungen auf. Das Ausmaß der Blutungsneigung hängt von der Menge an intakten GPIIb-IIIa-Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche ab. Bei einem Gehalt von unter 30% intaktem GPIIb-IIIa ist mit schweren Blutungen zu rechnen.

Das genetische Bild der Glanzmann Thrombasthenie ist sehr heterogen. Molekulargenetische Untersuchungen haben eine Vielzahl von Mutationen innerhalb der zwei Gene der GPIIb- und der GPIIIa-Untereinheit identifiziert. Einen Überblick über bereits detektierte Mutationen gibt die Glanzmann Thrombasthenie Datenbank der Medical College of Wisconsin (121).

Die meisten genetischen Veränderungen sind als sogenannte „private“ Mutationen familienspezifisch, und selten wird in zwei nicht verwandten Individuen die gleiche

## Diskussion

Mutation ausfindig gemacht. Während unter Trägern der selben Mutation einige Betroffene nur unter leichten oder gar keinen Blutungen leiden, erleiden andere schwerwiegende Hämorrhagien, was darauf schließen lässt, dass neben der primär krankheitsauslösenden Mutation andere Faktoren, z.B. eine Kombination von genetischen Varianten, den Schweregrad der Blutungsneigung beeinflussen.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden insgesamt 11 Patienten mit Glanzmann Thrombasthenie hinsichtlich klinischer Blutungskomplikationen, Thrombozytenfunktion und Thrombozytenmembran-Proteine untersucht. Bei 5 dieser Patienten war ein GPIIb-IIIa-Rezeptorbesatz von <5% auf der Thrombozytenoberfläche in Kombination mit einer gestörten oder fehlenden Fibrinogen-Bindungsfähigkeit nachweisbar. Bei 6 Patienten fand sich eine Ausprägung des Defekts mit mindestens bzw. mehr als 50% funktionstüchtigem GPIIb-IIIa auf der Thrombozytenoberfläche. In dem untersuchten Patientenkollektiv detektierten wir 6 verschiedene Mutationen im GPIIb-Gen (*ITGA2B*) und eine Mutation im GPIIIa-Gen (*ITGB3*). Hierunter befanden sich 5 Missense-Mutationen, eine Deletion eines einzelnen Nukleotids und eine Insertion eines einzelnen Nukleotids. Insgesamt waren 3 Patienten homozygot für eine Mutation im *ITGA2B*-Gen, eine Person war „compound“ heterozygot mit beiden Mutationen innerhalb des *ITGA2B*-Gens und bei zwei Patienten konnte eine heterozygote Mutation nachgewiesen werden, von denen sich eine im *ITGB3* und eine im *ITGA2B*-Gen befand. Bei einem weiteren Patienten, der auf Grund der unterschiedlichen Expressionsraten dem Krankheitsbild der GT zugeordnet wurde, konnte kein Gendefekt nachgewiesen werden. Um auszuschließen, dass es sich bei den von uns identifizierten Mutationen um gewöhnliche Polymorphismen handelt, wurden zufällig ausgewählte gesunde Probanden unterschiedlicher ethnischer oder geographischer Herkunft auf alle Mutationen hin analysiert. Keiner dieser Probanden war Träger einer dieser Mutationen. Die 5 ausgemachten Punktmutationen führen alle zu nicht-konservativen Substitutionen in hoch-konservierten Regionen beider Gene.

Eine dieser Punktmutationen, nämlich die der Patientin GT-3-Index (Thr 207Ile) ist in der FG-GAP Domäne des  $\beta$ -Propeller im *ITGA2B*-Gen lokalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die FG-GAP Domäne wichtig für die Ligandenbindung ist (122). Außerdem weiß man, dass ein Aminosäureaustausch in einer benachbarten Region (Leu214Pro) die

## Diskussion

strukturelle Konformation zerstört und damit die Ligandenbindungseigenschaften des Heterodimer-Komplexes. Des Weiteren scheint eine Mutation in dieser Region die Empfindlichkeit des Rezeptors gegenüber Proteolyse zu erhöhen (123). Auch die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass die Mutation Thr 207Ile die Fibrinogen-Bindung beeinträchtigt und die Expression von GPIIb-IIIa auf der Thrombozyten-Oberfläche herabsetzt. Somit ist der bei der Patientin GT-3-Index gefundene Phänotyp mit der identifizierten Missense-Mutation (Thr 207Ile) assoziiert.

Des Weiteren fand sich eine Patientin (GT-2-Index) mit 2 heterozygoten Mutationen innerhalb des *ITGA2B*-Gens, eine Punktmutation an Position 684, die zum Austausch von Leucin nach Arginin und eine an Position 71, die zum Austausch von Prolin nach Arginin führt. Die Mutation an Position 684 ist in der Calf-1 Domäne lokalisiert. Die Calf-1 bildet Kontaktstellen mit den EGF 3, EGF 4 und  $\beta$ TD Domänen der GPIIIa-Untereinheit aus. Dieser Kontakt ist für Komplexbildung, die richtige Prozessierung und den Transport des Komplexes auf die Zellmembran entscheidend (124). Daher können Konformationsänderungen aufgrund dieses Aminosäureaustausch dazu führen, dass der Kontakt zwischen GPIIb und GPIIIa gestört ist und es nicht zur Komplexbildung kommt. Wenn die Untereinheiten keinen Komplex bilden können, sind sie auch nicht vor intrazellulärem proteolytischem Abbau geschützt und können somit auch nicht in der Zellmembran verankert werden. Des Weiteren fand sich bei der Patientin GT-2-Index eine 2. heterozygote Punktmutation in Exon 2 (P71R), die in einer Region lokalisiert ist, die für einen Teil des Proteins kodiert, der für die Wechselwirkung mit der GPIIIa-Untereinheit verantwortlich ist. Es ist bekannt, dass die Dimerisierung der beiden Untereinheiten essentiell für die Funktion des GPIIb-IIIa-Rezeptors ist. Daher könnte diese Mutation die Faltung des Proteins dahingehend beeinflussen, dass keine Wechselwirkung mehr möglich ist zwischen beiden Untereinheiten.

GPIIb-Mutationen, die zum Krankheitsbild der Glanzmann Thrombasthenie führen, neigen dazu sich entweder um die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen (125) oder rund um das dritte  $\beta$ -Propellerblatt zu gruppieren. Die amino-terminalen 450 Aminosäuren des GPIIb-Proteins enthalten 7 homologe Wiederholungen mit 4 Kationenbindungsstellen. Diese Wiederholungen setzen sich aus  $\beta$ -Faltblättern zusammen, die sich wiederum in eine  $\beta$ -Propellerform falten. Missense-Mutationen in der Region, die für den extrazellulären  $\beta$ -Propeller von GPIIb kodiert, haben gezeigt, dass die extrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen



## Diskussion

essentiell für die Biogenese des GPIIb-IIIa-Rezeptors sind (126). Zielgerichtete Mutation und die Expression von rekombinanten Glykoproteinen in heterologen Zelllinien haben gezeigt, dass Mutationen rund um die Kalziumbindungsstellen kodierenden Bereiche weder die Synthese der Untereinheiten, noch die Ausbildung des GPIIb-IIIa-Rezeptors hemmen. Der Transport der GPIIb-IIIa-Komplexe vom ER zum Golgi-Apparat und/oder ihr Transport zur Zelloberfläche wird jedoch inhibiert (125).

Bei der Patientin GT-1-Index wurde in Exon 1 von *ITGA2B* eine homozygote Mutation (c.175delG) als Ursache für Glanzmann Thrombasthenie Typ I identifiziert. Die Deletion liegt im frühen N-terminalen Bereich in der ersten Wiederholung des  $\beta$ -Propellers (Aminosäure 46 - 102, Acc.NR.NP\_000410) der extrazellulären schweren Kette und führt zur Leserasterverschiebung (beginnend bei Aminosäure 58 von GPIIb) und infolgedessen zu einem verkürzten GPIIb-Protein (vorzeitige Terminierung 51 Aminosäuren nach der Deletion). Durchflusszytometrie und Western-Analysen der Thrombozyten der Patientin ergaben keinen Nachweis des GPIIb-IIIa-Proteins. Die hier beschriebene Mutation wurde in der Literatur schon beschrieben (127). Es konnte durch zielgerichtete Mutation des GPIIb-Gens und Kotransfektion mit dem Wildtyp GPIIIa-Gen in CHO-Zellen gezeigt werden, dass diese Mutation zu einer deutlich reduzierten Oberflächenexpression von GPIIIa und einer fehlenden Oberflächenexpression von GPIIb führt. In CHO-Zellen, die zur Kontrolle mit den Wildtyp GPIIb- und GPIIIa-Genen kotransfiziert wurden, zeigte sich eine normale Oberflächenexpression des GPIIb-IIIa-Rezeptors. Folglich ist der bei der Patientin GT-1-Index gefundene Phänotyp mit der identifizierten Deletion G175 assoziiert.

Bei der Patientin SPD-2-Index wurde eine heterozygote Mutation in Exon 18 der GPIIb-Untereinheit (*ITGA2B*: c.1787A>AG, p.I596IT) nachgewiesen, die zur Isoleucin<sup>596</sup> zu Threonin Substitution in der extrazellulären Domäne des GPIIb führt. Die Mutation wurde auch bei der Zwillingsschwester sowie Mutter nachgewiesen und ist in der Literatur bereits vorbeschrieben. Sie ist innerhalb des zentralen Torus des  $\beta$ -Propellers lokalisiert und es ist davon auszugehen, dass sie in der Ausprägung des Phänotyps der GT involviert ist (128). Durchflusszytometrisch zeigt sich die heterozygote Variante in der Verminderung des Fibrinogen-Rezeptorbesatzes (69%).

Bei der Patientin GT-4-Index wurde eine homozygote Variation im *ITGA2B*-Gen erstmals nachgewiesen, die das letzte Nukleotid in Exon 28 betrifft (G2943A) und vermutlich das

## Diskussion

korrekte „splicing“ von Exon 28 verhindert und somit als Spleißstellen-Mutation anzusehen ist. Diese genetische Variation ist im internationalen *ITGA2B*-Mutationsregister nicht vorbeschrieben, kann jedoch aufgrund ihres Types als kausal für eine Glanzmann Thrombasthenie angesehen werden.

Bei dem Patienten SPD-1-Index wurde eine heterozygote Variante im Exon 14 des *ITGB3*-Gens nachgewiesen (*ITGB3*, Exon 14, c.2221T>C; p.Trp741Arg). Sie führt zum Austausch eines bei Wirbeltieren hochkonservierten unpolaren Tryptophans gegen ein basisches Arginin in direkter Nachbarschaft der cytoplasmatischen Integrin-beta Domäne. Diese Variante wird bisher noch in keiner Datenbank zur Allelfrequenz geführt und wird von diversen Vorhersageprogrammen als wahrscheinlich pathogen eingestuft. Aufgrund der unbekanntenen Allelfrequenz und Konservierung ist es möglich, dass es sich um eine pathogene Variante handelt, die ursächlich für den Phänotyp des Patienten sein könnte. Um die Pathogenität der Variante im *ITGB3*-Gen bzw. den zugrundeliegenden Erbgang differenzierter beurteilen zu können, wurden auch die Eltern des Patienten untersucht, allerdings waren weder Mutter noch Vater Träger dieser *ITGB3*-Variante. Somit ist es wahrscheinlich, dass es sich bei dieser Variante um eine Spontanmutation handelt.

Inwieweit die in dieser Arbeit identifizierten Mutationen tatsächlich Auswirkung auf die Funktionalität des GPIIb-IIIa-Rezeptors haben und zum Phänotyp Glanzmann Thrombasthenie führen, kann mittels der in dieser Studie angewandten Methoden nicht abschließend geklärt werden. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigen jedoch eine verminderte GPIIb-IIIa-Expression und auch die funktionellen Untersuchungen wie z.B. die Messung der PAC1-Bindung lassen darauf schließen, dass die in dieser Arbeit ausgemachten Mutationen mit hoher Wahrscheinlichkeit die Phänotyp-verändernden Mutationen sind. Der eindeutige Nachweis gelänge mit Hilfe rekombinanter Technologien, bei denen die gefundene Mutation über ortsgerichtete Mutagenese in Wildtyp-Plasmide eingeführt werden müsste, um anschließend Zellen mit dieser Mutation zu kotransfizieren und Expressionsversuche, sowie funktionelle Untersuchungen zur Fibrinogenbindung durchzuführen. Mittels dieser Versuche könnte gezeigt werden, dass beispielsweise ein Aminosäureaustausch für den GT-Phänotyp verantwortlich ist.

### 5.1.1 Expression lysosomaler Membranglykoproteine auf Thrombozyten bei Patienten mit Glanzmann Thrombasthenie

In der vorliegenden Studie wurde die Expression lysosomaler Membranglykoproteine auf der Oberflächenmembran aktivierter Thrombozyten untersucht. Hierzu wurden die Proteine LAMP-1, LAMP-2 und LAMP-3 durchflusszytometrisch nach Stimulierung der Thrombozyten mit Thrombin und Convulxin gemessen. Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Expression des  $\delta$ -Granula- und Lysosomen-Markers LAMP-3 (CD63) in Thrombozyten von Patienten mit Glanzmann Thrombasthenie nach Stimulierung signifikant höher ist als in gesunden Kontroll-Thrombozyten. Die gesteigerte CD63-Expression war bei Patienten mit heterozygoter GPIIb-IIIa-Mutation und bei GT-Patienten mit Typ I nachweisbar, wobei sie bei letzterer Patienten-Gruppe deutlich stärker ausgeprägt war.

Für weitere untersuchte lysosomale Membranproteine wie LAMP-1 und LAMP-2 (Daten für LAMP-2 nicht gezeigt) wurde nach Thrombin-induzierter Exozytose der Lysosomen und Granula kein Unterschied hinsichtlich der Oberflächenexpression auf Thrombozyten nachgewiesen. Ebenso konnte für Mepacrine, das spezifisch in den dense-Granula der Thrombozyten eingelagert wird und selektiv Adenosinmono- und -triphosphat (AMP bzw. ATP) sowie an DNA bindet, kein signifikanter Unterschied nach Stimulierung mit Thrombin und Convulxin gezeigt werden. Als weiterer Marker der dense-Granula-Sekretion wurde der Neurotransmitter Serotonin im CTH (AG Jurk) gemessen und auch hier war zwischen Thrombozyten von GT-Patienten und gesunden Probanden kein Unterschied nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse bezüglich der vermehrten CD63-Expression konnten kürzlich mittels einer neuen Technologie, der sog. Massenzytometrie, welche die Durchflusszytometrie und Massenspektrometrie vereinigt, von Blair et al. bestätigt werden (129). Wie bei der konventionellen Durchflusszytometrie werden bei der Massenzytometrie (CyTOF - cytometry by Time-of-Flight) Zellen innerhalb einer heterogenen Probenflüssigkeit auf Einzelzell-Ebene für eine Vielzahl von Parametern analysiert. Anstatt Antigene über Fluorochrom-markierte Antikörper zu binden und somit auf die Anzahl an spektral auflösbaren Fluorochromen beschränkt zu sein, verwendet die Massenzytometrie Metallisotope-markierte Antikörper, die mittels ihrer Flugzeit (time-of-flight, TOF) analysiert werden. Dies ermöglicht die Analyse von derzeit mehr als 40 Parametern pro

## Diskussion

Zelle und eine tiefgehende Charakterisierung von Phänotyp und Funktion. Das Team von Blair untersuchte insgesamt 14 verschiedene Oberflächenantigene (CD9, CD29, CD31, CD36, CD41, CD42a, CD42b, CD61, CD62P, CD63, CD107a, CD154, GPVI und  $\alpha$ IIb $\beta$ 3) auf Thrombozyten von GT-Patienten und konnte zeigen, dass die CD63 Expression nach TRAP-Stimulierung in GT-Thrombozyten signifikant höher war als in Kontroll-Thrombozyten. Des Weiteren wurde in Thrombozyten von GT-Patienten eine signifikant höhere CD9-Expression nach Stimulierung (0.5  $\mu$ M ADP und 20  $\mu$ M TRAP) gemessen als bei gesunden Kontroll-Thrombozyten.

In Thrombozyten ist CD9 mit GPIIb-IIIa in den  $\alpha$ -Granula und spezifischen Mikrodomänen auf der Plasmamembran kolokalisiert (130, 131). Eine mögliche Erklärung für die erhöhte CD9-Expression bei GT-Thrombozyten könnte daher darin bestehen, dass aufgrund des fehlenden GPIIb-IIIa CD9 einfacher in die nicht-besetzten Bereiche der Plasmamembran inseriert werden kann und CD9-Antikörper infolge der geringeren sterischen Hinderung besseren Zugang zu CD9 haben.

Da CD63 in den dense-Granula und lysosomalen Membranen von nicht-aktivierten Thrombozyten enthalten ist und nach Aktivierung auf die Plasmamembran exprimiert wird, wo es dann mit dem GPIIb-IIIa-CD9-Komplex assoziiert (43), ist es ähnlich wie bei CD9 denkbar, dass auch CD63 aufgrund des geringeren *crowding*-Effekts bei fehlendem oder erniedrigtem GPIIb-IIIa vermehrt in die Plasmamembran eingebaut wird. Das nicht die Gesamtmenge an CD63 bei den von uns untersuchten GT-Patienten erhöht ist, geht aus den Ergebnissen der Western Blot-Analyse hervor (4.1.1.7), in dem vergleichbare Mengen CD63 in Thrombozyten von GT-Patienten und gesunden Probanden detektiert wurden. Somit scheint die CD63-Expression nach Agonisten-induzierter Exozytose der  $\delta$ -Granula bei GT-Patienten bei ähnlich hohen Ausgangs-Niveaus kompensatorisch erhöht zu sein.

Interessanterweise gibt es Studien, die zeigen konnten, dass bei einigen GT-Patienten die Oberflächenexpression von CD63, aber nicht von CD107a (LAMP-1) oder CD62P, nach Fc $\gamma$ RIIA-crosslinking erhöht ist (132).

## 5.2 Patienten mit thrombozytären GPIIb-IIIa Kombinationsdefekten

### 5.2.1 Patient SPD-1-Index: Schwere Thrombozytopenie und Granula-Dysfunktion assoziiert mit zwei kombinierten heterozygoten Varianten im *TUBB1*- und *ITGB3*-Gen

In dieser Arbeit wurde ein 4-jähriger Patient mit ausgeprägter Blutungsneigung (ISTH-BAT Blutungsscore: 6) untersucht. Bei dem Patienten SPD-1-Index wurde eine schwere Thrombozytopenie diagnostiziert (22.000/nl). Der überwiegende Anteil der Thrombozyten war normal groß (MPV 8.3 fl) und es waren nur wenige große Thrombozyten im Blutaussstrich zu sehen. Die Gerinnungsparameter der plasmatischen Gerinnung waren normal.

Die Thrombozyten exprimierten nur ca. 50% des GPIIb-IIIa-Rezeptors auf ihrer Oberfläche und sowohl ADP- als auch TRAP-induzierte PAC-1-Bindung (Fibrinogen-Bindung) waren stark vermindert, während andere Oberflächenrezeptoren (CD42a, CD42b, GPVI und CD29) der Thrombozyten im Normbereich waren.

Mit Hilfe der Immunofluoreszenzmikroskopie wurde im Blutaussstrich eine normale Anzahl und Verteilung der lysosomalen Membranglykoproteine (CD63 (LAMP-3), LAMP-1 (CD107a) und CD62P (P-Selektin)) nachgewiesen. Allerdings war die durchflusszytometrisch gemessene Oberflächen-Expression von P-Selektin, LAMP-3 und LAMP-1 nach Stimulierung mit Thrombin- und Convulxin stark vermindert, sodass eine gestörte Exozytose der  $\alpha$ -Granula,  $\delta$ -Granula und Lysosomen vorlag.

Interessanterweise wurde mittels Immunofluoreszenzfärbung ein pathologisch verändertes  $\beta$ 1-Tubulin nachgewiesen. Während sich immunreaktives Tubulin in Thrombozyten von gesunden Personen in einem ringförmigen Bereich unterhalb der Zellmembran nachweisen lässt, war beim Index-Patienten die Zytoarchitektur des Tubulins gestört und es zeigte sich ein gestörtes Marginalband der Mikrotubuli (keine Ringform in den Thrombozyten).

Zur Diagnosesicherung des Tubulin-Defekts wurde die molekulargenetische Analyse der für Tubulin kodierenden Bereiche mittels Whole Exome Sequencing durchgeführt. Hierbei wurde eine heterozygote Variante im *TUBB1*-Gen (c.862G>A; p.E288K Substitutin) gefunden, die in der Literatur bereits vorbeschrieben ist. Unter Berücksichtigung der aktuellen Empfehlungen des American College of Medical Genetics and Genomics

(ACMG) und der europäischen Leitlinie für diagnostische Hochdurchsatzsequenzierungen (133) kann die nachgewiesene Mutation als „pathogene Variante“ eingestuft werden.

Das *TUBB1*-Gen kodiert für die  $\beta$ 1-Tubulin Kette, welche die vorherrschende  $\beta$ -Tubulin Isoform ist, die von Megakaryozyten und Thrombozyten gebildet wird. Die  $\beta$ 1-Tubulin Kette ist am Aufbau der Mikrotubuli involviert, und an der Prothrombozyten-Bildung und Thrombozyten-Freisetzung beteiligt (134–135). Die charakteristische kortikale Mikrotubulianordnung in den Thrombozyten kommt durch in der Peripherie aufgewickelte Mikrotubulinfilamente - sog. Marginalbänder - zustande, die dadurch eine Spirale bilden (136). Dies wird auch zur Aufrechterhaltung der diskoiden Thrombozyten-Form benötigt (137, 138). Dieses spezielle Umschlagen der Mikrotubulinfilamente kommt nur an den äußersten sowie an hantelförmigen Ausläufern dieser Vorstufen vor, was eine Thrombozytengenerierung nur an diesen Stellen zulässt. Eine häufige Verzweigung der Proplatelets liefert die benötigten alleinstehenden Enden (139).

Autosomal dominante Mutationen in diesem Gen führen zu einer verminderten Expression des Proteins und können zu einer milden bis moderaten Thrombozytopenie führen (134, 140). Es konnte gezeigt werden, dass die durch die *TUBB1* Missense-Mutation p.R318W verursachte Unterexpression von  $\beta$ 1-Tubulin mit einer herabgesetzten Mikrotubuli-Herstellung assoziiert ist (141). Außerdem führte eine weitere Missense-Mutation des *TUBB1*-Gens (p.F260S) zu einer Beeinträchtigung der Prothrombozyten-Bildung und Granula-Freisetzungsreaktion, was wiederum zu einer herabgesetzten Thrombus-Stabilität und zu einer Makrothrombozytopenie führen kann (142). Auch wenn in Tierversuchen gezeigt wurde, dass  $\beta$ 1-Tubulin-defiziente Mäuse eine verlängerte Blutungszeit haben (138), gibt es keine Belege dafür, dass Patienten mit defektem oder fehlendem  $\beta$ 1-Tubulin eine erhöhte Blutungstendenz aufweisen. Diese Beobachtung wird durch unsere Ergebnisse gestützt, da bei der Mutter des Index-Patienten das alleinige Vorliegen einer heterozygoten Variante im *TUBB1*-Gen mit keiner erhöhten Blutungsneigung assoziiert war.

$\beta$ 1-Tubulin lässt sich nicht adäquat durch andere  $\beta$ -Isoformen ersetzen, wie in Tierversuchen mit  $\beta$ 1-Tubulin-Knockoutmäusen gezeigt wurde. Andere  $\beta$ -Tubuline wurden zwar kompensatorisch hochreguliert, eine Thrombozytopenie sowie eine reduzierte Anzahl an Marginalbändern konnte aber nicht verhindert werden (143). Mäuse

## Diskussion

mit  $\beta$ 1-Tubulinmangel zeigten eine reduzierte Anzahl an Thrombozyten, die zudem eine veränderte Form aufweisen und deren Mikrotubulifilamente im Elektronenmikroskop in der Peripherie deutlich reduzierte Wickelungen zeigten (144). Bei Hunden mit  $\beta$ 1-Tubulindefekt traten ebenfalls vermehrt Makrothrombozyten auf (145). Somit ist es wahrscheinlich, dass die beim Index-Patienten gefundenen großen Thrombozyten auf die Tubulin-Mutation zurückzuführen ist.

Bei der Mutter ist die heterozygote Variante im *TUBB1*-Gen ebenfalls vorhanden. Allerdings ist sie bei ihr asymptomatisch, d.h. es traten bisher keine Blutungskomplikationen auf. Bei dem Vater des Index-Patienten war die Mutation nicht nachweisbar.

Zusätzlich zur heterozygoten *TUBB1*-Mutation wurde beim Index-Patienten SPD-1-Index nach weiteren Mutationen gesucht und eine weitere bisher noch nicht in der Literatur beschriebene heterozygote Mutation im *ITGB3*-Gen (Exon 14, c.2221T>C; p.Trp741Arg) detektiert. Interessanterweise waren weder Mutter noch Vater des Index-Patienten Träger dieser *ITGB3*-Variante. Diese als wahrscheinlich pathogen klassifizierte Variante äußerte sich phänotypisch in der ca. 50% Expression des GPIIb-IIIa Rezeptors mit verringerter *in vitro* Aktivierungskapazität von GPIIb-IIIa, erklärt aber allein nicht die beim Index-Patienten beschriebene Schwere der Blutungsneigung.

Klinisch auffällige Patienten sind in der Regel homozygot oder compound heterozygot. Dagegen weisen heterozygote Personen, deren Rezeptorbesatz aufgrund des autosomal rezessiven Erbgangs zu 50–70% intakt ist, eine fast normale Thrombozytenaggregation auf. Sie sind in der Regel klinisch unauffällig und werden meist erst durch das familiäre Screening detektiert. Das Ausmaß der Blutungsneigung hängt von der existierenden Menge an intaktem GPIIb-IIIa auf der Thrombozytenoberfläche ab. Bei einem Mindestgehalt von 20–30% intaktem GPIIb-IIIa ist nicht mit schweren Blutungskomplikationen zu rechnen (146).

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass die Kombination von zwei neuen heterozygoten Varianten im *TUBB1*- (c.862G>A; p.E288K) und *ITGB3*-Gen (*ITGB3*, Exon 14, c.2221T>C; p.Trp741Arg) zu einer schweren Thrombozytopenie und Thrombozytopathie führen, die durch Defekte der Sekretion aller 3 Granula-Typen ( $\alpha$ -,  $\delta$ -Granula und Lysosomen) und des GPIIb-IIIa (CD41/61) charakterisiert sind. Dies resultiert beim Patienten SPD-1-Index in einer erhöhten Blutungsneigung. Zudem verdeutlichen die

Ergebnisse wie wichtig es ist bei Patienten mit Thrombozytopenie sowohl Thrombozytenfunktion als auch den morphologischen Phänotyp zu untersuchen. Interessanterweise wurde kürzlich ein Case Report publiziert, in dem eine Familie mit GPIIb-IIIa- und *TUBB1*-Kombinationsdefekt beschrieben wird, bei der eine Makrothrombozytopenie und verlängerte Blutungszeit vorlag, hervorgerufen durch 2 heterozygote *ITGB3*- (p.P189S und p.C210S) und eine heterozygote *TUBB1*-Mutation (p.G146R) (147).

### 5.2.2 Patientin SPD-2-Index: Schwere Thrombozytopathie und $\delta$ -Granula-Dysfunktion assoziiert mit zwei neuen heterozygoten Varianten im *ITGA2B*- und *F2RL3*-Gen

In dieser Arbeit wurde eine weitere Patientin mit ausgeprägter Blutungsneigung untersucht (ISTH-BAT Blutungsscore: 6). Bei der 8-jährigen Index-Patientin bestehen seit Geburt ausgeprägte Hämatome im Bereich des Stammes und der Extremitäten. Die Index-Patientin hat eine zweieiige Zwillingschwester, bei der keine Blutungsneigung besteht. Bei den nicht-blutsverwandten Eltern ist ebenfalls keine erhöhte Blutungsneigung beschrieben.

Ähnlich wie beim o.g. Patienten wurde bei der Patientin SPD-2-Index ein verminderter GPIIb-IIIa-Rezeptorbesatz (ca. 51%) gemessen bei gleichzeitiger pathologischer Agonisten-induzierter Thrombozytenaggregation. Bei der Mutter und Zwillingschwester wurde ebenfalls ein verminderter GPIIb-IIIa-Rezeptorbesatz gemessen, wenn auch nur diskret vermindert bei der Zwillingschwester. Die Thrombozyten des Vaters wiesen hingegen einen normwertigen GPIIb-IIIa-Rezeptorbesatz auf.

Neben der quantitativen Bestimmung des GPIIb-IIIa-Rezeptors wurde auch die funktionelle Untersuchung der *in vitro* Aktivierungskapazität von GPIIb-IIIa (PAC-1-Bindung) durchgeführt. Es zeigte sich bei Index-Patientin und Mutter eine pathologisch veränderte PAC-1-Expression nach Stimulierung mit ADP (48 bzw. 52%) und TRAP (10 bzw. 37%), wohingegen Zwillingschwester und Vater diesbezüglich unauffällig waren (79 bzw. 82%). In Zusammenschau der Ergebnisse der Durchflusszytometrie und der pathologisch veränderten Thrombozytenaggregation ist dies ein deutlicher Hinweis auf das Vorliegen einer heterozygoten Mutation im GPIIb-IIIa-Gen bei der Index-Patientin und Mutter.



## Diskussion

Zur Diagnosesicherung wurde die genetische Analyse der zwei Gene des GPIIb-IIIa-Komplexes durch Sequenzierung der relevanten Genbereiche durchgeführt. Hierbei konnte die Verdachtsdiagnose Glanzmann Thrombasthenie bestätigt werden und es wurde eine Missense-Mutation in Exon 18 der GPIIb-Untereinheit (ITGA2B: c.1787A>AG, p.I596IT) nachgewiesen. Diese heterozygote Variante war auch bei der Zwillingsschwester nachweisbar und wurde von der Mutter an beide Töchter weitervererbt. Der Vater ist kein Träger dieser Variante.

Bei der Index-Patientin fiel im Vergleich zur Mutter auf, dass die TRAP-induzierte PAC-1-Bindung deutlich stärker reduziert war als die ADP-induzierte PAC-1-Bindung. Dieses Phänomen ist durch das alleinige Vorliegen einer heterozygoten GPIIb-IIIa-Mutation nicht erklärbar und deutet darauf hin, dass ein zusätzlicher thrombozytärer Defekt bei der Index-Patientin vorliegt. Aus diesem Grund wurde die Thrombin-induzierte Exozytose der  $\alpha$ - und  $\delta$ -Granula (bzw. Lysosomen) untersucht. Was die Sekretion der  $\alpha$ -Granula bzw. die CD62P-Expression angeht, war diese bei Index-Patientin und ihren Familienangehörigen nicht beeinträchtigt. Im Gegensatz dazu zeigte die Freisetzung der  $\delta$ -Granula bzw. CD63-Expression, dass diese bei der Index-Patientin vermindert war, nicht jedoch bei den Familienangehörigen.

Es wurde daher auch nach Mutationen gesucht, die ursächlich für die bei der Index-Patientin nachgewiesene Sekretionsstörung sein könnten. Interessanterweise wurden bei der Index-Patientin heterozygote Varianten in den Genen *F2RL3* (Protease-aktivierter Rezeptor 4 (PAR-4)), *LTBP1* (Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1), *TGFB1* (Transforming growth factor beta 1), *RAB38* (Ras-related protein Rab-38), *RAB27A* (Ras-related protein Rab-27A) und *ARHGAP17* (Rho GTPase Activating Protein 17) nachgewiesen, die in Zusammenhang mit einer gestörten Thrombozytenfunktion gebracht werden. Das *F2RL3*-Gen kodiert für den Protease-aktivierten Rezeptor 4 (PAR-4), der sich auf humanen Thrombozyten findet und die durch Thrombin stimulierte Aktivierung der Thrombozyten vermittelt (148, 149). *LTBP1* gehört zur Familie der latenten TGF- $\beta$  Bindungsproteine und moduliert so die Aktivität von TGF- $\beta$  (150). TGF- $\beta$  erfüllt eine Vielzahl an verschiedenen Funktionen im Organismus: Es reguliert die Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Adhäsion von Zellen (151). *RAB38* gehört zur Familie der kleinen GTPasen und ist an der Regulation der Pigmentierung in Melanozyten involviert (152). Eine Variante des Griscelli-Syndrom wird verursacht durch

## Diskussion

eine Punktmutation in dem Gen, das Rab27a codiert. Dabei ist der Transport von Melanosomen zur Zellperipherie und die Sekretion lytischer Granula aus zytotoxischen T-Zellen gestört (153). ARHGAP17 ist an der Aufrechterhaltung einer intakten Funktion der Tight Junctions involviert, in dem es die Aktivierung der kleinen GTPase Cdc42 reguliert, welche die Funktion eines molekularen Schalters in komplexen Signal-Netzwerken übernimmt, die eine Vielzahl unterschiedlicher Signalkaskaden miteinander verknüpfen und selektive Signalantworten erlauben (154).

Beispielweise wurden die heterozygoten *LTBP1*- und *ARHGAP17*-Mutationen bei Patienten mit Sekretionsstörungen identifiziert (150), primär bei delta-Granula Defekten (155).

Da die nicht-symptomatische Zwillingsschwester der Index-Patientin alle Varianten der nachgewiesenen Mutationen ebenfalls in heterozygoter Form besitzt bis auf *F2RL3*, *LTBP1* und *TGFB1*, tragen wahrscheinlich diese Mutationen (primär *F2RL3*) in Kombination mit der heterozygoten *ITGA2B* Variante zur Blutungsneigung bei der Index-Patientin bei. Die Mutationen *F2RL3*, *LTBP1* und *TGFB1* wurden auch beim Vater der Index-Patientin nachgewiesen, führen aber bei ihm in Abwesenheit der heterozygoten *ITGA2B*-Mutation zu keiner erhöhten Blutungsneigung.

Das *F2RL3*-Gen kodiert für den Protease-aktivierten Rezeptor 4 (PAR-4). Bis heute wurden vier verschiedene PARs identifiziert, wobei sich nur PAR-1 und PAR-4 auf humanen Thrombozyten finden und die durch Thrombin stimulierte Aktivierung der Thrombozyten vermitteln, im Falle von PAR-4 primär durch G-Proteine der Gq-Familie, Proteinkinasen und Ca<sup>2+</sup>-abhängige Signalwege (148, 149). Sie unterscheiden sich in ihrer Affinität zu Thrombin. Während PAR-1 die höchste Affinität mit einem EC50 von 0,05 nmol/L für Thrombin besitzt, ist PAR-4 der am wenigsten affine Rezeptor mit für die Aktivierung benötigten EC50 von 5 nmol/L. Bisher gibt es in der Literatur nur wenige bekannte Mutationen in kodierenden Sequenzen des *F2RL3*-Gens, die die PAR-4 Expression oder Funktion beeinflussen. Norman et al. (2016) konnten erstmals bei einem 66-jährigen männlichen Patienten, der seit Geburt an einer verstärkten Blutungsneigung in Form von Schleimhautblutungen leidet, zeigen, dass das Vorliegen einer heterozygoten Variante im *F2RL3*-Gen (c.471A>G; p.Tyr157Cys) mit einer verminderten PAR-4 Funktion assoziiert ist (156). Die Aminosäure Tyrosin157 ist innerhalb der Transmembran-Domäne 3 von PAR-4 ein hoch-konservierter Rest, der bei anderen G-Protein gekoppelten

## Diskussion

Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung einer normalen Rezeptor-Struktur spielt, daher ist es wahrscheinlich, dass sich die Tyr157Cys Substitution bei dem Index-Patienten nachteilig auf die Rezeptorfunktion auswirkt. Im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen zeigten die Thrombozyten des Index-Patienten eine verminderte Aggregationsantwort nach Stimulation mit dem PAR4-Agonisten AYPGKF und Thrombin. Außerdem wiesen die Thrombozyten eine verminderte P-Selektin-Expression, PAC-1-Bindung und intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Mobilisation nach Stimulation mit AYPGKF auf, wohingegen die Antwort auf den PAR1-spezifischen Agonisten SFLLRN normwertig war, sodass hier von einem selektiven Defekt der PAR4-Funktion ausgegangen werden kann. Die c.471A>G *F2RL3*-Variante war bei zwei Söhnen des Patienten nachweisbar, bei denen ebenfalls eine pathologische Thrombozytenfunktion vorlag. Allerdings zeigten die beiden Söhne keine erhöhte Blutungsneigung.

In Zusammenschau der Ergebnisse kann abgeleitet werden, dass die Kombination von zwei neuen heterozygoten Varianten im *ITGA2B*-Gen (*ITGA2B*: c.1787A>AG, p.I596IT) und *F2RL3*-Gen (c.471A>G; p.Tyr157Cys) zu einer schweren Thrombozytopathie führen könnte, die durch Defekte der Sekretion der  $\delta$ -Granula und des GPIIb-IIIa-Rezeptors (CD41/CD61) charakterisiert sind. Dies resultiert bei der Patientin SPD-2-Index in einer erhöhten Blutungsneigung.

Um die Auswirkungen der nachgewiesenen Sequenzvarianten zu überprüfen, könnten Expressionsuntersuchungen in Zellkultursystemen durchgeführt werden, bei denen man die mutante und wildtypische cDNA in einen Vektor kloniert und in eine geeignete, immortalisierte Zelllinie, transifiziert. Anschließend würde dann die Analyse der Proteinexpression folgen, sowie die funktionelle Untersuchung des Proteins.

In der aktuellen Literatur existieren kaum Berichte, dass eine Kombination von heterozygoten Sequenzvarianzen, wie sie in dieser Arbeit bei den Patienten SPD-1-Index und SPD-2-Index beschrieben wurden, zu einer erhöhten Blutungsneigung führt. Dies liegt nicht zuletzt daran, dass insbesondere bei Patienten mit milder bis moderater Blutungsneigung unklarer Genese infolge unzureichender diagnostischer Möglichkeiten oft keine exakte Diagnose gestellt wird, obwohl eine SPD als Ursache zugrunde liegt. Eine weltweit durchgeführte Umfrage unter 202 Laboren ergab, dass von den jährlich diagnostizierten bekannten hereditären Thrombozytenstörungen, die Glanzmann Thrombasthenie (9.7%), die  $\delta$ -Granula-Defekte (9.3%) und die  $\alpha$ -Granula-Defekte (3.7%)

## Diskussion

ausmachen, wobei hier hauptsächlich syndromale Formen diagnostiziert wurden (157). Diese Studie zeigte auch, dass bei ca. 35 % der Patienten keine genaue Diagnose gestellt werden konnte, so dass der tatsächliche Anteil an isolierten Granula-Defekten aufgrund unvollständiger Diagnostik unterschätzt wird. Hier könnte zukünftig die Routine-Anwendung der Genotypisierung (Panel und Exome Sequencing) einen wichtigen Beitrag zur Identifizierung pathogener Varianten bei Patienten mit thrombozytären Defekten, insbesondere mit SPD, leisten. Denn nur wenn die zugrundeliegenden molekularen und zellulären Pathomechanismen bei SPD aufgeklärt werden können, ist man in der Lage sensitive diagnostische Tests zu entwickeln, die eine zuverlässige Diagnosestellung erlauben, welches die entscheidende Voraussetzung für eine adäquate Therapie ist.

## 6 Zusammenfassung

Die Charakterisierung von Thrombozyten-Defekten bei Patienten mit Verdacht auf hereditären Thrombozytopathien stand im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit. Hauptziel war ein besseres Verständnis von familiär bedingten und GPIIb-IIIa-abhängigen Thrombozyten-Dysfunktionen, der genetischen Ursachen und deren Auswirkungen auf die Blutungsneigung zu gewinnen. Zudem wurde der Einfluss von Kombinationen von heterozygoten Varianten in Genen, die für den GPIIb-IIIa-Rezeptor und für Proteine der Signaltransduktion oder Granula-Sekretion kodieren, auf die Thrombozytenfunktion und auf den Schweregrad der Blutungsneigung untersucht.

Es wurden die Lichttransmissionsaggregometrie und Durchflusszytometrie verwendet, um Aktivierungsgrad und Aktivierbarkeit der Thrombozyten bezüglich Aggregation, *in vitro* Aktivierungskapazität von GPIIb-IIIa, Oberflächen-Rezeptoren (CD42b, CD42a, CD36, GPVI) sowie die aktivierungsabhängige Granula-Exozytose und Sekretion der Granulainhaltstoffe zu untersuchen. Des Weiteren wurden molekulargenetische Verfahren (Whole Exome Sequencing und Sanger Sequenzierung) eingesetzt, um neue pathogene Varianten im Exom bei Patienten mit Thrombozytopathien zu identifizieren.

Es wurden Patienten mit Verdacht auf Glanzmann Thrombasthenie (GT) untersucht. In dem untersuchten Patientenkollektiv wurden 7 verschiedene Mutationen im *ITGA2B*- und *ITGB3*-Gen in insgesamt 6 Patienten identifiziert. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen **zum ersten Mal** bei Patienten mit GT eine Erhöhung der thrombozytären CD63-Expression nach Aktivierung mit Thrombin. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte sein, dass aufgrund des fehlenden bzw. verminderten Gehalts an GPIIb-IIIa und des damit einhergehenden geringeren *crowding*-Effekts, CD63 vermehrt in die unbesetzten Bereiche der Plasmamembran inseriert werden kann. Dieses Ergebnis eröffnet einen neuen Ansatzpunkt zum Verständnis von möglichen kompensatorischen Aktivierungsmechanismen bei hereditären Thrombozyten-Funktionsstörungen.

Des Weiteren wurden in dieser Dissertation 2 Kinder (SPD-1-Index und SPD-2-Index) mit ausgeprägter Blutungsneigung (ISTH-BAT Blutungsscore: 6) untersucht inkl. Familienangehörige. Bei dem Patienten SPD-1-Index wurde eine Sequenzvariante im *ITGB3*-Gen identifiziert (c.2221T>C; p.Trp741Arg), die sich phänotypisch in einer 50%-igen Expression des GPIIb-IIIa-Rezeptors und einer gestörten *in vitro*

## Zusammenfassung

Aktivierungskapazität von GPIIb-IIIa zeigt. Zudem wurde bei diesem Patienten eine heterozygote Variante im *TUBB1*-Gen (c.862G>A; p.E288K Substitution) nachgewiesen, die vorbeschrieben ist und als pathogen mit unklarer Signifikanz klassifiziert ist. Zusätzlich wurde eine pathologische Exozytose aller 3 Granula-Typen mit verminderter Expression von P-Selektin, LAMP-3 und LAMP-1 nachgewiesen. Ursächlich für die gestörte Freisetzungsreaktion könnte das mittels Immunofluoreszenzmikroskopie nachgewiesene pathologisch veränderte  $\beta$ 1-Tubulin sein. Allerdings führte das alleinige Vorhandensein der heterozygoten *TUBB1*-Variante beim asymptomatischen Vater zu keiner Granulafreisetzungsstörung und zu keiner GPIIb-IIIa-Aktivierungsstörung, sodass sich schlussfolgern lässt, dass wahrscheinlich nur die Kombination der beiden heterozygoten Varianten zu einer relevanten Thrombozytenstörung mit erhöhter Blutungsneigung führt. Bei der Patientin SPD-2-Index wurde eine heterozygote Variante im *ITGA2B*-Gen (c.1787A>AG, p.I596IT) identifiziert, die aber zu keiner relevanten Aggregations- oder Fibrinogenbindungsstörung führt. Allerdings wurde bei ihr eine gestörte Freisetzung der  $\delta$ -Granula detektiert. Zudem wurden bei ihr weitere Varianten in Genen nachgewiesen, die im Zusammenhang stehen thrombozytäre Sekretionsstörungen zu verursachen. Hierunter befinden sich die Gene *F2RL3*, *LTBP1* und *TGFB1*, die vermutlich (primär *F2RL3*) in Kombination mit der heterozygoten GPIIb-IIIa-Variante zur Blutungsneigung bei der Patientin SPD-2-Index beitragen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Kombination von heterozygoten Varianten in Genen, die für den GPIIb-IIIa-Rezeptor und für Proteine der Signaltransduktion und Sekretion kodieren, zu einer ausgeprägten Thrombozyten-Dysfunktion mit erhöhter Blutungsneigung führen können. Da in der aktuellen Literatur bisher keine vergleichbaren Fälle beschrieben wurden und längst nicht alle Gene bekannt sind, die eine thrombozytäre „Storage Pool“ Erkrankung verursachen, leisten die in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis genetischer Ursachen von thrombozytären Granula-Defekten und deren Auswirkungen auf thrombozytäre Signaturen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Streif W, Knöfler R. Leitlinie-Thrombozytopathien; Version 2.1: Diagnose von Thrombozytenfunktionsstörungen -Thrombozytopathien; 2018.
2. Gawaz MP. Das Blutplättchen. Stuttgart u.a.: Thieme; 1999.
3. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 2002; 8(11):1227–34.
4. Bhatt DL, Topol EJ. Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2(1):15–28.
5. Furie B, Furie BC. The molecular basis of platelet and endothelial cell interaction with neutrophils and monocytes: role of P-selectin and the P-selectin ligand, PSGL-1. *Thromb Haemost* 1995; 74(1):224–7.
6. Konstantopoulos K, Chow TW, Turner NA, Hellums JD, Moake JL. Shear stress-induced binding of von Willebrand factor to platelets. *Biorheology* 1997; 34(1):57–71.
7. Fabre JE, Nguyen M, Latour A, Keifer JA, Audoly LP, Coffman TM et al. Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice. *Nat Med* 1999; 5(10):1199–202.
8. Jurk K, Kehrel BE. Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost* 2005; 31(4):381–92.
9. Dorsam RT, Kunapuli SP. Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation. *J Clin Invest* 2004; 113(3):340–5.
10. Nesbitt WS, Giuliano S, Kulkarni S, Dopheide SM, Harper IS, Jackson SP. Intercellular calcium communication regulates platelet aggregation and thrombus growth. *J Cell Biol* 2003; 160(7):1151–61.
11. Singbartl K, Forlow SB, Ley K. Platelet, but not endothelial, P-selectin is critical for neutrophil-mediated acute postischemic renal failure. *FASEB J* 2001; 15(13):2337–44.
12. Furie B, Furie BC, Flaumenhaft R. A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion. *Thromb Haemost* 2001; 86(1):214–21.

13. Lüscher EF, Weber S. The formation of the haemostatic plug--a special case of platelet aggregation. An experiment and a survey of the literature. *Thromb Haemost* 1993; 70(2):234–7.
14. Ruggeri ZM. Mechanisms of shear-induced platelet adhesion and aggregation. *Thromb Haemost* 1993; 70(1):119–23.
15. Calvete JJ. Clues for understanding the structure and function of a prototypic human integrin: the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex. *Thromb Haemost* 1994; 72(1):1–15.
16. Smyth SS, Parise LV. Regulation of ligand binding to glycoprotein IIb-IIIa (integrin alpha IIb beta 3) in isolated platelet membranes. *Biochem J* 1993; 292 (Pt 3):749–58.
17. Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 1995; 268(5208):233–9.
18. Ginsberg MH, Du X, O'Toole TE, Loftus JC. Platelet integrins. *Thromb Haemost* 1995; 74(1):352–9.
19. Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 1988; 71(4):831–43.
20. Phillips DR, Charo IF, Scarborough RM. GPIIb-IIIa: the responsive integrin. *Cell* 1991; 65(3):359–62.
21. Plow EF, D'Souza SE, Ginsberg MH. Ligand binding to GPIIb-IIIa: a status report. *Semin Thromb Hemost* 1992; 18(3):324–32.
22. Charo I, Kieffer N, Phillips D. Platelet Membrane Glycoproteins: In: Colman R, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Company; 1994.
23. Wencel-Drake JD, Plow EF, Kunicki TJ, Woods VL, Keller DM, Ginsberg MH. Localization of internal pools of membrane glycoproteins involved in platelet adhesive responses. *Am J Pathol* 1986; 124(2):324–34.
24. Woods VL, Wolff LE, Keller DM. Resting platelets contain a substantial centrally located pool of glycoprotein IIb-IIIa complex which may be accessible to some but not other extracellular proteins. *J Biol Chem* 1986; 261(32):15242–51.



25. Niiya K, Hodson E, Bader R, Byers-Ward V, Koziol JA, Plow EF et al. Increased surface expression of the membrane glycoprotein IIb/IIIa complex induced by platelet activation. Relationship to the binding of fibrinogen and platelet aggregation. *Blood* 1987; 70(2):475–83.
26. Michelson AD. *Platelets*. 2nd ed. Burlington: Elsevier Science; 2011.
27. Springer TA, Zhu J, Xiao T. Structural basis for distinctive recognition of fibrinogen gammaC peptide by the platelet integrin alphaIIb beta3. *J Cell Biol* 2008; 182(4):791–800.
28. Parise LV, Helgerson SL, Steiner B, Nannizzi L, Phillips DR. Synthetic peptides derived from fibrinogen and fibronectin change the conformation of purified platelet glycoprotein IIb-IIIa. *J Biol Chem* 1987; 262(26):12597–602.
29. Hartwell DW, Wagner DD. New discoveries with mice mutant in endothelial and platelet selectins. *Thromb Haemost* 1999; 82(2):850–7.
30. Lefer AM, Weyrich AS, Buerke M. Role of selectins, a new family of adhesion molecules, in ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1994; 28(3):289–94.
31. McEver RP. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovasc Res* 2015; 107(3):331–9.
32. McEver RP. Role of selectins in leukocyte adhesion to platelets and endothelium. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 714:185–9.
33. McEver RP. Selectins. *Curr Opin Immunol* 1994; 6(1):75–84.
34. McEver RP. Selectin-carbohydrate interactions during inflammation and metastasis. *Glycoconj J* 1997; 14(5):585–91.
35. McEver RP, Cummings RD. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest* 1997; 100(11 Suppl):S97-103.
36. Ott I, Neumann FJ, Gawaz M, Schmitt M, Schömig A. Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation* 1996; 94(6):1239–46.
37. Theilmeier G, Lenaerts T, Remacle C, Collen D, Vermylen J, Hoylaerts MF. Circulating activated platelets assist THP-1 monocytoïd/endothelial cell interaction under shear stress. *Blood* 1999; 94(8):2725–34.

38. Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 2004; 306(5698):990–5.
39. Reddy A, Caler EV, Andrews NW. Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell* 2001; 106(2):157–69.
40. Dell'Angelica EC, Mullins C, Caplan S, Bonifacino JS. Lysosome-related organelles. *FASEB J* 2000; 14(10):1265–78.
41. Howe CL, Granger BL, Hull M, Green SA, Gabel CA, Helenius A et al. Derived protein sequence, oligosaccharides, and membrane insertion of the 120-kDa lysosomal membrane glycoprotein (lgp120): identification of a highly conserved family of lysosomal membrane glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(20):7577–81.
42. Yang Y-G, Sari IN, Zia MF, Lee SR, Song SJ, Kwon HY. Tetraspanins: Spanning from solid tumors to hematologic malignancies. *Exp Hematol* 2016; 44(5):322–8.
43. Israels SJ, McMillan-Ward EM, Easton J, Robertson C, McNicol A. CD63 associates with the alphaIIb beta3 integrin-CD9 complex on the surface of activated platelets. *Thromb Haemost* 2001; 85(1):134–41.
44. Hotta H, Ross AH, Huebner K, Isobe M, Wendeborn S, Chao MV et al. Molecular cloning and characterization of an antigen associated with early stages of melanoma tumor progression. *Cancer Res* 1988; 48(11):2955–62.
45. Berditchevski F, Zutter MM, Hemler ME. Characterization of novel complexes on the cell surface between integrins and proteins with 4 transmembrane domains (TM4 proteins). *Mol Biol Cell* 1996; 7(2):193–207.
46. Berditchevski F, Bazzoni G, Hemler ME. Specific association of CD63 with the VLA-3 and VLA-6 integrins. *J Biol Chem* 1995; 270(30):17784–90.
47. Radford KJ, Mallesch J, Hersey P. Suppression of human melanoma cell growth and metastasis by the melanoma-associated antigen CD63 (ME491). *Int J Cancer* 1995; 62(5):631–5.
48. Skubitz KM, Campbell KD, Iida J, Skubitz AP. CD63 associates with tyrosine kinase activity and CD11/CD18, and transmits an activation signal in neutrophils. *J Immunol* 1996; 157(8):3617–26.

49. Radford KJ, Thorne RF, Hersey P. CD63 associates with transmembrane 4 superfamily members, CD9 and CD81, and with beta 1 integrins in human melanoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 222(1):13–8.
50. Hammond C, Denzin LK, Pan M, Griffith JM, Geuze HJ, Cresswell P. The tetraspan protein CD82 is a resident of MHC class II compartments where it associates with HLA-DR, -DM, and -DO molecules. *J Immunol* 1998; 161(7):3282–91.
51. Berditchevski F, Odintsova E. Tetraspanins as regulators of protein trafficking. *Traffic* 2007; 8(2):89–96.
52. Levy S, Shoham T. The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(2):136–48.
53. Kitani S, Berenstein E, Mergenhagen S, Tempst P, Siraganian RP. A cell surface glycoprotein of rat basophilic leukemia cells close to the high affinity IgE receptor (Fc epsilon RI). Similarity to human melanoma differentiation antigen ME491. *J Biol Chem* 1991; 266(3):1903–9.
54. Yoshida T, Kawano Y, Sato K, Ando Y, Aoki J, Miura Y et al. A CD63 mutant inhibits T-cell tropic human immunodeficiency virus type 1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. *Traffic* 2008; 9(4):540–58.
55. Hirst J, Bright NA, Rous B, Robinson MS. Characterization of a fourth adaptor-related protein complex. *Mol Biol Cell* 1999; 10(8):2787–802.
56. Lekishvili T, Fromm E, Mujoomdar M, Berditchevski F. The tumour-associated antigen L6 (L6-Ag) is recruited to the tetraspanin-enriched microdomains: implication for tumour cell motility. *J Cell Sci* 2008; 121(Pt 5):685–94.
57. Latysheva N, Muratov G, Rajesh S, Padgett M, Hotchin NA, Overduin M et al. Syntenin-1 is a new component of tetraspanin-enriched microdomains: mechanisms and consequences of the interaction of syntenin-1 with CD63. *Mol Cell Biol* 2006; 26(20):7707–18.
58. Jung K-K, Liu X-W, Chirco R, Fridman R, Kim H-RC. Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *EMBO J* 2006; 25(17):3934–42.

59. Duffield A, Kamsteeg E-J, Brown AN, Pagel P, Caplan MJ. The tetraspanin CD63 enhances the internalization of the H,K-ATPase beta-subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(26):15560–5.
60. Takino T, Miyamori H, Kawaguchi N, Uekita T, Seiki M, Sato H. Tetraspanin CD63 promotes targeting and lysosomal proteolysis of membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304(1):160–6.
61. Chen, JW., Murphy, TL., Willingham, MC., Pastan, I., August, JT. (1985) Identification of two lysosomal membrane glycoproteins. *J Cell Biol*, 101(1), 85-95
62. Febbraio, M., Silverstein, RL. (1990) Identification and characterization of LAMP-1 as an activation-dependent platelet surface glycoprotein *J Biol Chem*, 265(30), 18531-18537.
63. Collier BS, Shattil SJ. The GPIIb/IIIa (integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3) odyssey: a technology-driven saga of a receptor with twists, turns, and even a bend. *Blood* 2008; 112(8):3011–25.
64. Nurden AT. Glanzmann thrombasthenia. *Orphanet J Rare Dis* 2006; 1:10.
65. Hardisty RM, Hutton RA. Bleeding tendency associated with "new" abnormality of platelet behaviour. *Lancet* 1967; 1(7497):983–5.
66. Weiss HJ, Chervenick PA, Zalusky R, Factor A. A familial defect in platelet function associated with impaired release of adenosine diphosphate. *N Engl J Med* 1969; 281(23):1264–70.
67. Raccuglia G. Gray platelet syndrome. A variety of qualitative platelet disorder. *Am J Med* 1971; 51(6):818–28.
68. Albers CA, Cvejic A, Favier R, Bouwmans EE, Alessi M-C, Bertone P et al. Exome sequencing identifies NBEAL2 as the causative gene for Gray Platelet Syndrome. *Nat Genet* 2011; 43(8):735–7.
69. Kahr WHA, Hinckley J, Li L, Schwertz H, Christensen H, Rowley JW et al. Mutations in NBEAL2, encoding a BEACH protein, cause gray platelet syndrome. *Nat Genet* 2011; 43(8):738–40.
70. Michelson AD. Gray platelet syndrome. *Blood* 2013; 121(2):250.

71. Daly ME. Transcription factor defects causing platelet disorders. *Blood Rev* 2017; 31(1):1–10.
72. Turro E, Greene D, Wijgaerts A, Thys C, Lentaigne C, Bariana TK et al. A dominant gain-of-function mutation in universal tyrosine kinase SRC causes thrombocytopenia, myelofibrosis, bleeding, and bone pathologies. *Sci Transl Med* 2016; 8(328):328ra30.
73. Nurden AT, Nurden P. The gray platelet syndrome: clinical spectrum of the disease. *Blood Rev* 2007; 21(1):21–36.
74. White JG. Ultrastructural studies of the gray platelet syndrome. *Am J Pathol* 1979; 95(2):445–62.
75. Gunay-Aygun M, Huizing M, Gahl WA. Molecular defects that affect platelet dense granules. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30(5):537–47.
76. Müller-Berghaus G, Pötzsch B, editors. *Hämostaseologie: Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik*. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg; 1999.
77. McNicol A, Israels SJ, Robertson C, Gerrard JM. The empty sack syndrome: a platelet storage pool deficiency associated with empty dense granules. *Br J Haematol* 1994; 86(3):574–82.
78. Grønskov K, Ek J, Brøndum-Nielsen K. Oculocutaneous albinism. *Orphanet J Rare Dis* 2007; 2:43.
79. Huizing M, Helip-Wooley A, Westbroek W, Gunay-Aygun M, Gahl WA. Disorders of lysosome-related organelle biogenesis: clinical and molecular genetics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008; 9:359–86.
80. Jurk K. Platelet granules - secretory and secretive. *Hamostaseologie* 2017; 37(3):208–10.
81. Power B, Ferreira CR, Chen D, Zein WM, O'Brien KJ, Introne WJ et al. Hermansky-Pudlak syndrome and oculocutaneous albinism in Chinese children with pigmentation defects and easy bruising. *Orphanet J Rare Dis* 2019; 14(1):52.

82. Jesus Rojas W de, Young LR. Hermansky-Pudlak Syndrome. *Semin Respir Crit Care Med* 2020; 41(2):238–46.
83. Merideth MA, Introne WJ, Wang JA, O'Brien KJ, Huizing M, Gochuico BR. Genetic variants associated with Hermansky-Pudlak syndrome. *Platelets* 2020; 31(4):544–7.
84. Huizing M, Malicdan MCV, Wang JA, Pri-Chen H, Hess RA, Fischer R et al. Hermansky-Pudlak syndrome: Mutation update. *Hum Mutat* 2020; 41(3):543–80.
85. Bowman SL, Bi-Karchin J, Le L, Marks MS. The road to lysosome-related organelles: Insights from Hermansky-Pudlak syndrome and other rare diseases. *Traffic* 2019; 20(6):404–35.
86. Toro C, Nicoli E-R, Malicdan MC, Adams DR, Introne WJ. GeneReviews®: Chediak-Higashi Syndrome. Seattle (WA); 1993.
87. Honda N, Ohnishi K, Fujishiro T, Ikeda M, Ito K. Alteration of release and role of adenosine diphosphate and thromboxane A2 during collagen-induced aggregation of platelets from cattle with Chediak-Higashi syndrome. *Am J Vet Res* 2007; 68(12):1399–406.
88. White JG. Electron-dense chains and clusters in platelets from patients with storage pool-deficiency disorders. *J Thromb Haemost* 2003; 1(1):74–9.
89. Ji X, Chang B, Naggert JK, Nishina PM. Lysosomal Trafficking Regulator (LYST). *Adv Exp Med Biol* 2016; 854:745–50.
90. Bolton-Maggs PHB, Chalmers EA, Collins PW, Harrison P, Kitchen S, Liesner RJ et al. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO. *Br J Haematol* 2006; 135(5):603–33.
91. Cox K, Price V, Kahr WHA. Inherited platelet disorders: a clinical approach to diagnosis and management. *Expert Rev Hematol* 2011; 4(4):455–72.
92. van Ommen CH, Peters M. The bleeding child. Part I: primary hemostatic disorders. *Eur J Pediatr* 2012; 171(1):1–10.

93. Harrison P, Mackie I, Mumford A, Briggs C, Liesner R, Winter M et al. Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. *Br J Haematol* 2011; 155(1):30–44.
94. Lehman CM, Blaylock RC, Alexander DP, Rodgers GM. Discontinuation of the bleeding time test without detectable adverse clinical impact. *Clin Chem* 2001; 47(7):1204–11.
95. BORN GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962; 194:927–9.
96. Althaus K, Zieger B, Bakchoul T, Jurk K. Standardization of Light Transmission Aggregometry for Diagnosis of Platelet Disorders: An Inter-Laboratory External Quality Assessment. *Thromb Haemost* 2019; 119(7):1154–61.
97. Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Sixma JJ. Patients with a prolonged bleeding time and normal aggregation tests may have storage pool deficiency: studies on one hundred six patients. *Blood* 1987; 70(3):620–3.
98. Dawood BB, Wilde J, Watson SP. Reference curves for aggregation and ATP secretion to aid diagnose of platelet-based bleeding disorders: effect of inhibition of ADP and thromboxane A(2) pathways. *Platelets* 2007; 18(5):329–45.
99. Blais N, Pharand C, Lordkipanidzé M, Sia YK, Merhi Y, Diodati JG. Response to aspirin in healthy individuals. Cross-comparison of light transmission aggregometry, VerifyNow system, platelet count drop, thromboelastography (TEG) and urinary 11-dehydrothromboxane B(2). *Thromb Haemost* 2009; 102(2):404–11.
100. Dovlatova N, Lordkipanidzé M, Lowe GC, Dawood B, May J, Heptinstall S et al. Evaluation of a whole blood remote platelet function test for the diagnosis of mild bleeding disorders. *J Thromb Haemost* 2014; 12(5):660–5.
101. Castilloux JF, Moffat KA, Liu Y, Seecharan J, Pai M, Hayward CPM. A prospective cohort study of light transmission platelet aggregometry for bleeding disorders: is testing native platelet-rich plasma non-inferior to testing platelet count adjusted samples? *Thromb Haemost* 2011; 106(4):675–82.

102. Linnemann B, Schwonberg J, Mani H, Prochnow S, Lindhoff-Last E. Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: an adjustment for platelet count is not necessary. *J Thromb Haemost* 2008; 6(4):677–83.
103. Dawood BB, Lowe GC, Lordkipanidzé M, Bem D, Daly ME, Makris M et al. Evaluation of participants with suspected heritable platelet function disorders including recommendation and validation of a streamlined agonist panel. *Blood* 2012; 120(25):5041–9.
104. Jurk K. Analysis of platelet function and dysfunction. *Hamostaseologie* 2015; 35(1):60–72.
105. Watson S, Daly M, Dawood B, Gissen P, Makris M, Mundell S et al. Phenotypic approaches to gene mapping in platelet function disorders - identification of new variant of P2Y12, TxA2 and GPIIb/IIIa receptors. *Hamostaseologie* 2010; 30(1):29–38.
106. Henson J, Tischler G, Ning Z. Next-generation sequencing and large genome assemblies. *Pharmacogenomics* 2012; 13(8):901–15.
107. Desai AN, Jere A. Next-generation sequencing: ready for the clinics? *Clin Genet* 2012; 81(6):503–10.
108. Pareek CS, Smoczynski R, Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing. *J Appl Genet* 2011; 52(4):413–35.
109. Tennessen JA, Bigham AW, O'Connor TD, Fu W, Kenny EE, Gravel S et al. Evolution and functional impact of rare coding variation from deep sequencing of human exomes. *Science* 2012; 337(6090):64–9.
110. Maher B. Personal genomes: The case of the missing heritability. *Nature* 2008; 456(7218):18–21.
111. Kam-Thong T, Czamara D, Tsuda K, Borgwardt K, Lewis CM, Erhardt-Lehmann A et al. EPIBLASTER-fast exhaustive two-locus epistasis detection strategy using graphical processing units. *Eur J Hum Genet* 2011; 19(4):465–71.
112. Schork NJ, Murray SS, Frazer KA, Topol EJ. Common vs. rare allele hypotheses for complex diseases. *Curr Opin Genet Dev* 2009; 19(3):212–9.



113. Jurk, K., Analysis of platelet function and dysfunction. *Hamostaseologie*, 2015. 35(1): p. 60-72.
114. Rahman, M., Introduction to Flow Cytometry. Handbook. AbD Serotec.
115. Lorocho S, Trabold K, Gambaryan S, Reiß C, Schwierczek K, Fleming I, et al. Alterations of the platelet proteome in type I Glanzmann thrombasthenia caused by different homozygous delG frameshift mutations in ITGA2B. *Thrombosis and haemostasis* 2017; 117(3):556–569.
116. Eckert WA, Kartenbeck J. Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1997.
117. Renart J, Reiser J, Stark GR. Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76(7):3116–20.
118. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-424.
119. Gresele P, Orsini S, Noris P, Falcinelli E, Alessi MC, Bury L et al. Validation of the ISTH/SSC bleeding assessment tool for inherited platelet disorders: A communication from the Platelet Physiology SSC. *J Thromb Haemost* 2020; 18(3):732–9.
120. Nurden AT. Glanzmann thrombasthenia. *Orphanet J Rare Dis* 2006; 1(1):10. Available from: URL: <https://doi.org/10.1186/1750-1172-1-10>.
121. <https://glanzmann.mcw.edu/>.
122. Loftus JC, Smith JW, Ginsberg MH. Integrin-mediated cell adhesion: the extracellular face. *J Biol Chem* 1994; 269(41):25235–8.
123. Grimaldi CM, Chen F, Wu C, Weiss HJ, Coller BS, French DL. Glycoprotein IIb Leu214Pro mutation produces glanzmann thrombasthenia with both quantitative and qualitative abnormalities in GPIIb/IIIa. *Blood* 1998; 91(5):1562–71.
124. Rosenberg N, Yatuv R, Sobolev V, Peretz H, Zivelin A, Seligsohn U. Major mutations in calf-1 and calf-2 domains of glycoprotein IIb in patients with Glanzmann thrombasthenia

enable GPIIb/IIIa complex formation, but impair its transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *Blood* 2003; 101(12):4808–15.

125. Basani RB, Vilaire G, Shattil SJ, Kolodziej MA, Bennett JS, Poncz M. Glanzmann thrombasthenia due to a two amino acid deletion in the fourth calcium-binding domain of alpha IIb: demonstration of the importance of calcium-binding domains in the conformation of alpha IIb beta 3. *Blood* 1996; 88(1):167–73.

126. French DL, Seligsohn U. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors and Glanzmann's thrombasthenia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(3):607–10.

127. Vannier C, Behnisch W, Bartsch I, Sandrock K, Ertle F, Schmidt K et al. Novel homozygous mutation (c.175delG) in platelet glycoprotein ITGA2B gene as cause of Glanzmann's thrombasthenia type I. *Klin Padiatr* 2010; 222(3):150–3.

128. Ruan J, Peyruchaud O, Alberio L, Valles G, Clemetson K, Bourre F et al. Double heterozygosity of the GPIIb gene in a Swiss patient with Glanzmann's thrombasthenia. *Br J Haematol* 1998; 102(4):918–25.

129. Blair TA, Michelson AD, Frelinger AL. Mass Cytometry Reveals Distinct Platelet Subtypes in Healthy Subjects and Novel Alterations in Surface Glycoproteins in Glanzmann Thrombasthenia. *Sci Rep* 2018; 8(1):10300.

130. Longhurst CM, White MM, Wilkinson DA, Jennings LK. A CD9, alphaIIb beta3, integrin-associated protein, and GPIIb/IIIa complex on the surface of human platelets is influenced by alphaIIb beta3 conformational states. *Eur J Biochem* 1999; 263(1):104–11.

131. Brisson C, Azorsa DO, Jennings LK, Moog S, Cazenave JP, Lanza F. Co-localization of CD9 and GPIIb-IIIa (alpha IIb beta 3 integrin) on activated platelet pseudopods and alpha-granule membranes. *Histochem J* 1997; 29(2):153–65.

132. Loroch S, Trabold K, Gambaryan S, Reiß C, Schwierczek K, Fleming I et al. Alterations of the platelet proteome in type I Glanzmann thrombasthenia caused by different homozygous delG frameshift mutations in ITGA2B. *Thromb Haemost* 2017; 117(3):556–69.

133. Richards, S., Aziz, N., Bale, S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of

Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 17, 405–423 (2015).

134. Lecine P, Italiano JE, Kim SW, Villeval JL, Shivdasani RA. Hematopoietic-specific beta 1 tubulin participates in a pathway of platelet biogenesis dependent on the transcription factor NF-E2. *Blood* 2000; 96(4):1366–73.

135. Navarro-Núñez L, Teruel R, Antón AI, Nurden P, Martínez-Martínez I, Lozano ML et al. Rare homozygous status of P43  $\beta$ 1-tubulin polymorphism causes alterations in platelet ultrastructure. *Thromb Haemost* 2011; 105(5):855–63.

136. Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest* 2005; 115(12):3348–54.

137. Italiano JE, Bergmeier W, Tiwari S, Falet H, Hartwig JH, Hoffmeister KM et al. Mechanisms and implications of platelet discoid shape. *Blood* 2003; 101(12):4789–96.

138. Schwer HD, Lecine P, Tiwari S, Italiano JE, Hartwig JH, Shivdasani RA. A lineage-restricted and divergent beta-tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Curr Biol* 2001; 11(8):579–86.

139. Schulze H. Gegenwärtige Modelle der Thrombozytopoese. *Pathologe* 2010; 31 Suppl 2:183–7.

140. Freson K, Vos R de, Wittevrongel C, Thys C, Defoor J, Vanhees L et al. The TUBB1 Q43P functional polymorphism reduces the risk of cardiovascular disease in men by modulating platelet function and structure. *Blood* 2005; 106(7):2356–62.

141. Kunishima S, Kobayashi R, Itoh TJ, Hamaguchi M, Saito H. Mutation of the beta1-tubulin gene associated with congenital macrothrombocytopenia affecting microtubule assembly. *Blood* 2009; 113(2):458–61.

142. Kunishima S, Nishimura S, Suzuki H, Imaizumi M, Saito H. TUBB1 mutation disrupting microtubule assembly impairs proplatelet formation and results in congenital macrothrombocytopenia. *Eur J Haematol* 2014; 92(4):276–82.

143. Weiss DJ, editor. *Schalm's veterinary hematology*. 6. ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell; 2010.

144. Schulze H. Neue Erkenntnisse zur Zellbiologie der Thrombozytopoese und Pathophysiologie congenitaler Thrombozytopenien. Berlin, Medizinische Fakultät Charité, Habilitationsschrift.; 2008.
145. Davis B, Toivio-Kinnucan M, Schuller S, Boudreaux MK. Mutation in beta1-tubulin correlates with macrothrombocytopenia in Cavalier King Charles Spaniels. *J Vet Intern Med* 2008; 22(3):540–5.
146. Kirchmaier CM, Schirmer A, Jablonka B, Meyer M, Just M, Breddin HK. Correlation of bleeding complications with the number of platelet GPIIb-IIIa receptors in patients with Thrombasthenia Glanzmann. *Ann Haemat* 1992; (64: abstr. 19.).
147. Guillet B, Bayart S, Pillois X, Nurden P, Caen JP, Nurden AT. A Glanzmann thrombasthenia family associated with a TUBB1-related macrothrombocytopenia. *J Thromb Haemost*. 2019;17(12):2211-2215. doi:10.1111/jth.14622
148. Coughlin SR. Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. *J Thromb Haemost* 2005; 3(8):1800–14.
149. Lee H, Hamilton JR. Physiology, pharmacology, and therapeutic potential of protease-activated receptors in vascular disease. *Pharmacol Ther* 2012; 134(2):246–59.
150. Leo VC, Morgan NV, Bem D, Jones ML, Lowe GC, Lordkipanidzé M et al. Use of next-generation sequencing and candidate gene analysis to identify underlying defects in patients with inherited platelet function disorders. *J Thromb Haemost* 2015; 13(4):643–50.
151. Morikawa M, Derynck R, and Miyazono K. TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol* May 2016;8:a021873
152. Loftus, S.K., D.M. Larson, L.L. Baxter, A. Antonellis, Y. Chen, X. Wu, Y. Jiang, M. Bittner, J.A. Hammer III, and W.J. Pavan. 2002. Mutation of melanosome protein RAB38 in chocolate mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99:4471–4476
153. Mancini, A. J., Chan, L. S., Paller, A. S. Partial albinism with immunodeficiency: Griscelli syndrome: report of a case and review of the literature. *J. Am. Acad. Derm.* 38: 295-300, 1998;38(2 Pt 2):295-300.

## Literatur

154. Wells CD, Fawcett JP, Traweger A, Yamanaka Y, Goudreault M, Elder K et al. A Rich1/Amot complex regulates the Cdc42 GTPase and apical-polarity proteins in epithelial cells. *Cell* 2006; 125(3):535–48.
155. Maynard DM, Heijnen HFG, Gahl WA, Gunay-Aygun M. The  $\alpha$ -granule proteome: novel proteins in normal and ghost granules in gray platelet syndrome. *J Thromb Haemost* 2010; 8(8):1786–96.
156. Norman JE, Cunningham MR, Jones ML, Walker ME, Westbury SK, Sessions RB et al. Protease-Activated Receptor 4 Variant p.Tyr157Cys Reduces Platelet Functional Responses and Alters Receptor Trafficking. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2016; 36(5):952–60.
157. Gresele P, Harrison P, Bury L, Falcinelli E, Gachet C, Hayward CP et al. Diagnosis of suspected inherited platelet function disorders: results of a worldwide survey. *J Thromb Haemost* 2014; 12(9):1562–9.

## **Danksagung**

## Lebenslauf

### Lebenslauf

#### Persönliche Daten:

---

Name	Dr. phil. nat. Daniele Pillitteri
Adresse	Rhönring 25 64289 Darmstadt
geboren am	17. Oktober 1978
geboren in	Darmstadt, Deutschland
Staatsangehörigkeit	italienisch, deutsch
Familienstand	ledig

#### Beruflicher Werdegang:

---

2019 – heute	Assistenzarzt Laboratoriumsmedizin MVZ Dr. Riegel GmbH, Wiesbaden
2018 – 2019	Assistenzarzt Nephrologie an der DKD HELIOS Klinik Wiesbaden
2015 – 2018	Geschäftsführer der GFF Studienzentrum GmbH, Wiesbaden
2009 – 2018	Projektleiter im Forschungslabor „Thrombose, Hämostase und vaskuläre Medizin“ im Fachbereich Hämostaseologie an der Stiftung Deutschen Klinik für Diagnostik GmbH, Wiesbaden
2004 – 2009	Doktorand im Forschungslabor „Thrombose, Hämostase und vaskuläre Medizin“ an der Stiftung Deutschen Klinik für Diagnostik GmbH, Wiesbaden

#### Qualifikationen:

---

05/2018	Approbation als Arzt
---------	----------------------

## Lebenslauf

05/2009	Promotion zum Dr. phil. nat. an der J.W. Goethe Universität, Frankfurt am Main im Fachbereich Biochemie Thema der Dissertation: „Neue Wirkungsmechanismen zur Hämostasehemmung durch Faktor Xa- und IIa-Inhibitoren“ Abschluss: Dr. phil. nat. (sehr gut)
2008	Master of Business Administration (MBA) (gut)
2004	Diplom-Biologe (Note: sehr gut mit Auszeichnung)

### Hochschulausbildung:

---

2012 – 2018	Studium der Humanmedizin an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
2006 – 2008	Berufsbegleitender Weiterbildungsstudiengang an der FH Mainz Abschluss: Master of Business Administration (MBA)
1998 – 2004	Studium der Biologie an der TU Darmstadt Abschluss: Diplom

### Schulausbildung:

---

1989 – 1998	Ludwig-Georgs-Gymnasium in Darmstadt, Abschluss: Abitur
-------------	---

### Publikationen:

---

Döhrmann M, Makhoul S, Gross K, Krause M, **Pillitteri D**, von Auer C, Walter U, Lutz J, Volf I, Kehrel BE, Jurk K. CD36-fibrin interaction propagates FXI-dependent thrombin generation of human platelets. FASEB J. 2020 May 28. doi: 10.1096/fj.201903189R. Online ahead of print.



Makhoul S, Trabold K, Gambaryan S, Tenzer S, **Pillitteri D**, Walter U, Jurk K. cAMP- and cGMP-elevating agents inhibit GPIIb/IIIa-mediated aggregation but not GPIIb/IIIa-stimulated Syk activation in human platelets. *Cell Commun Signal*. 2019 Sep 13;17(1):122.

van Geffen JP, Brouns SLN, Batista J, McKinney H, Kempster C, Nagy M, Sivapalaratnam S, Baaten CCFMJ, Bourry N, Frontini M, Jurk K, Krause M, **Pillitteri D**, Swieringa F, Verdoold R, Cavill R, Kuijpers MJE, Ouwehand WH, Downes K, Heemskerk JWM. High-throughput elucidation of thrombus formation reveals sources of platelet function variability. *Haematologica* 2019; 104(6):1256–67.

Kirchmaier CM, **Pillitteri D**. Diagnosis and Management of Inherited Platelet Disorders. *Transfus Med Hemother*. 2010;37(5):237-246.

**Pillitteri D**, Bassus S, Boller K, Mahnel R, Scholz T, Westrup D, Wegert W, Kirchmaier CM. Thrombin-induced interleukin 1beta synthesis in platelet suspensions: impact of contaminating leukocytes. *Platelets*. 2007 Mar;18(2):119-27.

Kirchmaier CM, **Pillitteri D**. [Congenital thrombocytopathies]. *Internist (Berl)*. 2010 Sep;51(9):1109-14, 1116-7.

**Pillitteri D**, Pilgrimm AK, Kirchmaier CM. Novel Mutations in the GPIIb and GPIIIa Genes in Glanzmann Thrombasthenia. *Transfus Med Hemother*. 2010;37(5):268-277.

Knöfler R, Eberl W, Schulze H, Bakchoul T, Bergmann F, Gehrlich S, Geisen C, Gottstein S, Halimeh S, Harbrecht U, Kappert G, Kirchmaier C, Kehrel B, Lösche W, Krause M, Mahnel R, Meyer O, Pilgrimm AK, **Pillitteri D**, Rott H, Santoso S, Siegemund A, Schambeck C, Scheer M, Schmugge M, Scholl T, Strauss G, Zieger B, Zotz R, Hermann M, Streif W. [Diagnosis of inherited diseases of platelet function. Interdisciplinary S2K guideline of the Permanent Paediatric Committee of the Society of Thrombosis and Haemostasis Research (GTH e. V.)]. *Hamostaseologie*. 2014;34(3):201-12.

## Lebenslauf

Lenz T, Zorner J, Kirchmaier C, **Pillitteri D**, Badenhoop K, Bartel C, Geiger H, Hasselbacher K, Tuschy U, Westermann J, Salewski L. Multicenter study on the diagnostic value of a new RIA for the detection of free plasma metanephrines in the work-up for pheochromocytoma. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Aug;1073:358-73.

## Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

### **Funktionelle und zellbiologische Untersuchungen von genetisch determinierten Thrombozytopathien**

Aus dem Centrum für Thrombose und Hämostase der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter der Leitung von Prof. Dr. U. Walter ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht\*. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Teile dieser Dissertation wurden in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

Döhrmann M, Makhoul S, Gross K, Krause M, **Pillitteri D**, von Auer C, Walter U, Lutz J, Volf I, Kehrel BE, Jurk K. CD36-fibrin interaction propagates FXI-dependent thrombin generation of human platelets. FASEB J. 2020 May 28. doi: 10.1096/fj.201903189R. Online ahead of print.

Makhoul S, Trabold K, Gambaryan S, Tenzer S, **Pillitteri D**, Walter U, Jurk K. cAMP- and cGMP-elevating agents inhibit GPIIb/IIIa-mediated aggregation but not GPIIb/IIIa-stimulated Syk activation in human platelets. Cell Commun Signal. 2019 Sep 13;17(1):122.

van Geffen JP, Brouns SLN, Batista J, McKinney H, Kempster C, Nagy M, Sivapalaratnam S, Baaten CCFMJ, Bourry N, Frontini M, Jurk K, Krause M, **Pillitteri D**, Swieringa F,

Verdoold R, Cavill R, Kuijpers MJE, Ouwehand WH, Downes K, Heemskerk JWM. High-throughput elucidation of thrombus formation reveals sources of platelet function variability. *Haematologica*. 2019 Jun;104(6):1256-1267.

---

(Ort, Datum)

---

(Unterschrift)

\*) im Falle des Nichtzutreffens entfernen