

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin
am Campus Virchow-Klinikum
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Konzentration des Zytokins APRIL (A proliferation-inducing
ligand) korreliert positiv mit der Krankheitsaktivität der primären
Autoimmunthrombozytopenie**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nuha Ghosoun

aus Latakia (Syrien)

Datum der Promotion: 10.03.2017

Inhaltsübersicht

Inhaltsverzeichnis.....III

Abbildungsverzeichnis.....VI

Tabellenverzeichnis..... VII

Abkürzungsverzeichnis..... VIII

1	Abstrakt.....	12
2	Abstract.....	14
3	Einleitung.....	16
4	Ziele und Fragestellung dieser Studie.....	37
5	Material und Methoden	38
6	Ergebnisse.....	57
7	Diskussion	75
8	Zusammenfassung und Zukunftsausblick.....	88
9	Literaturverzeichnis.....	91
10	Eidesstattliche Versicherung.....	99
11	Lebenslauf	100
12	Danksagung.....	102

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1	Abstrakt.....	12
1.1	Einführung	12
1.2	Methodik	12
1.3	Ergebnisse	12
1.4	Schlussfolgerung	13
2	Abstract.....	14
2.1	Introduction	14
2.2	Methods.....	14
2.3	Results.....	14
2.4	Conclusion	15
3	Einleitung.....	16
3.1	Immunthrombozytopenie (ITP)	16
3.1.1	Definition und Geschichte	16
3.1.2	Pathophysiologie.....	16
3.1.3	Inzidenz	17
3.1.4	Diagnostik	18
3.1.5	Therapie.....	19
3.2	Die Rolle der Zytokine in der Pathophysiologie der ITP	20
3.3	Die Tumornekrosefaktoren Super Familie (TNF-SF)	22
3.3.1	Das Zytokin BAFF	25
3.3.2	Das Zytokin APRIL.....	25
3.3.3	Die Struktur von APRIL.....	26
3.3.4	Regulierung der zellulären Produktion von APRIL.....	27
3.3.5	APRIL Expression.....	27
3.3.6	Rezeptoren von APRIL	27
3.3.7	Signaltransduktion durch APRIL	29
3.3.8	APRIL und Immunreaktionen.....	31
3.3.9	APRIL und die Megakaryopoese	33
3.3.10	Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG)	34
3.3.11	Die Syndekan Familie	34
4	Ziele und Fragestellung dieser Studie.....	37

Inhaltsverzeichnis

5	Material und Methoden	38
5.1	Probanden- und Patientenpotential.....	38
5.1.1	Patienten.....	38
5.1.2	Probanden	39
5.2	Geräte.....	40
5.3	Material	40
5.3.1	Chemikalien des Enzymgekoppelten Immunadsorptionstests, ELISA	40
5.3.2	Puffer und Lösungen für die FACS Analysen	41
5.3.3	Chemikalien für die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion und Echtzeit-qPCR	42
5.3.4	Antikörper, Antikörper-Konjugate und Antigene.....	43
5.3.5	Synthetische Oligonukleotide.....	44
5.4	Methoden.....	45
5.4.1	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest, ELISA.....	45
5.4.2	Genexpressionsanalyse von BAFF und APRIL von PBMCs.....	48
5.4.3	Durchflusszytometrische Untersuchungen.....	51
5.4.4	Statistische Auswertungen.....	55
6	Ergebnisse	57
6.1	Quantifizierung der APRIL-Serumkonzentrationen	57
6.1.1	Serumkonzentration von APRIL bei ITP-Patienten und Kontrollen	57
6.1.2	Differenzierung zwischen Patienten mit primärer und sekundärer ITP im Vergleich zu Gesunden.....	58
6.1.3	Korrelation der APRIL-Konzentration mit der Thrombozytenzahl	60
6.1.4	Der Einfluss der Therapie auf die APRIL-Konzentration	62
6.1.5	Geschlechtsspezifische Unterschiede der APRIL-Konzentration.....	65
6.2	Genexpressionen von BAFF und APRIL in PBMCs.....	66
6.3	Durchflusszytometrische Analysen	68
6.3.1	Identifizierung der Thromozytenpopulation	68
6.3.2	Bestimmung der spontanen Thrombozyten-Voraktivierung	69
6.3.3	Nachweis der basalen Bindung von APRIL auf der Thrombozytenoberfläche	70
6.3.4	Untersuchung der Expression der Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA auf der Thrombozytenoberfläche	72

Inhaltsverzeichnis

6.3.5	Anbindung von APRIL an Thrombozyten.....	73
7	Diskussion	75
8	Zusammenfassung und Zukunftsausblick.....	88
9	Literaturverzeichnis.....	91
10	Eidesstattliche Versicherung.....	99
11	Lebenslauf	100
12	Danksagung.....	102

Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mitglieder der TNF- Superfamilie.....	23
Abbildung 2: Aminosäuresequenz des humanen APRILs	26
Abbildung 3: Die Homologie zwischen APRIL und anderen TNFL-SF Mitgliedern	26
Abbildung 4: Interaktionen von APRIL/BAFF mit den entsprechenden Rezeptoren	28
Abbildung 5: Signalwege von APRIL bei Tumorzellen und B-Zellen	30
Abbildung 6: Struktur von Syndekan-4 (schematische Darstellung).....	36
Abbildung 7: Eichkurve zur Bestimmung der Konzentration von APRIL	48
Abbildung 8: Thermoprofil der Genexpressionsstudie.....	50
Abbildung 9: Übersicht zum qPCR Lauf am Beispiel von β -Actin.	51
Abbildung 10: Übersicht der Gatingstrategie zur durchflusszytometrischen Analyse von Thrombozyten	55
Abbildung 11: Vergleich der APRIL-Serumkonzentration aller ITP-Patienten mit den gesunden Kontrollen	57
Abbildung 12: Differenzierung zwischen primären und sekundären ITP- Patienten	58
Abbildung 13: Zusammenhang zwischen den APRIL Serumspiegeln und den Thrombozytenzahlen.....	60
Abbildung 14: Korrelation der APRIL-Konzentrationen mit den Thrombozytenzahlen.....	61
Abbildung 15: Einfluss der Therapie auf die APRIL Konzentrationen	62
Abbildung 16: Zusammenhang der Therapiewirksamkeit mit dem APRIL Serumspiegel	63
Abbildung 17: Differenzierung der Therapie bei primären ITP-Patienten.....	64
Abbildung 18: Differenzierung nach dem Geschlecht.....	65
Abbildung 19: Vergleich der relativen Genexpressionen von BAFF und APRIL zwischen ITP-Patienten und Kontrollen.	66
Abbildung 20:Relative Quantifizierung der Genexpressionen von BAFF (TNFS13B) und APRIL (TNFS13) nach der $\Delta\Delta$ ct-Methode	67
Abbildung 21: Exemplarische Darstellung CD41-PE, CD61-PerCP, IgG-FITC markierter Thrombozyten sowie deren Bestimmung der Voraktivierung mit Hilfe von CD62P.	68
Abbildung 22: Exemplarische Darstellung zur Bestimmung der Expression des Aktivierungsmarkers CD62P im Overlay-Histogram	69
Abbildung 23: Exemplarische Darstellung der basalen Bindung von APRIL ...	70
Abbildung 24: Normalisierte basale Bindung von APRIL an humanen Thrombozyten.....	71
Abbildung 25: Fehlende Oberflächenexpression von BAFF-R, TACI und BCMA auf der Thrombozytenoberfläche.....	72
Abbildung 26: Exemplarische Darstellung von APRIL-Bindung an die Thrombozyten im.....	73
Abbildung 27: Normalisierte Anbindung von APRIL an Thrombozyten.	74
Abbildung 28: Möglicher Signaltransduktionsweg nach Anbindung von APRIL an Integrin und Syndekan-4	86

Tabellenverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Differentialdiagnose der Thrombozytopenien	18
Tabelle 2: Rolle von APRIL bei der Immunreaktion	32
Tabelle 3: Demographische Daten und klinische Diagnose der untersuchten Patienten.	38
Tabelle 4: Eingesetzten Medikamente bei den behandelten Studienpatienten .	39
Tabelle 5: Angewendete Antikörper, Antikörper-Konjugate und Antigene	43
Tabelle 6: Übersicht der PrimePCR Assay	44
Tabelle 7: Distribution der Konzentrationen von APRIL und deren Prävalenz der untersuchten Probanden	59

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

ACDA	Acid Citrat Dextrose Adenin
ADP	Adenosindiphosphat.
ADP	Adenosindiphosphat
AID	Aktivierung- Induzierten Cytidindesaminase
AITP	Autoimmunthrombozytopenie
AKT	Protein Kinase B; Serin-Threonin-Kinase
ANA	Antinukläreantikörper
APC	Allophycocyanin
APRIL	A proliferation inducing ligand
AP-1	Aktivator Protein 1 (engl. activator protein 1)
APS	Antiphospholipiedsyndrom
ARA	Autoimmunrheumatische Arthritis
AS	Aminosäure
Bad	Ein pro-apoptotisches Protein der Bcl-2-Familie (engl. Bcl-2-Antagonist of Cell Death)
BAFF	B cell activating factor belonging to the TNF family
BAFF-R	B cell activating factor – receptor
Bak	Bcl-2 Homologes Antagonist/Killer
Bax	Bcl-2 Associated X Protein
Bcl-2	B-Zell-Lymphom/Leukämie-2
Bcl-x	Mitglied der Bcl-2 Familie, antiapoptotisch
BCMA	B cell maturation antigen
BlyS	B-Lymphozyten-Stimulator
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CAML	Calcium modulator and cyclophilin ligand
cFLIP	ein Inhibitor der Apoptose (engl. The cellular FLICE-inhibitory protein)
cIAP	ein Mitglied der Inhibitoren des programmierten Zelltodes (Apoptose) Familie
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CD	Differenzierungsmarker oder Differenzierungsantigen

Abkürzungsverzeichnis

CRD	Cystein-reiche Domäne
cDNA	komplementäre DNA (engl. complementary DNA)
c-maf	ein Th2-spezifischer Transkriptionsfaktor
CSR	Antikörperisotypenwechsel (engl. class switch recombination)
DC	Dendritische Zelle (engl. dendritic cell)
DD	Toddomäne (engl. Death Domane)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Desoxyribonucleid Acid)
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymgekoppelter Immuntest (Eng. enzyme linked immunosorbent assay)
ERK	extrazelluläre Signal-bezogene Kinase (engl. extracellular signal regulated Kinase)
EST	Expressed Sequence Tags
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FAS	Zelltodrezeptor
FC	der konstante Bereich eines Antikörpers (Engl Fragment crystallizable)
FCS	Fetales Kälberserum (engl. fetal calf serum)
FITC	Fluorescein-Isothyocyanat
GAG	Glykosaminoglykane
GC	Keimzentrum (engl. germinal center)
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GP	Glykoprotein
HLA	humanes Leukozytenantigen (engl. Human Leukocyte Antigen)
huBAFF	humanes BAFF
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
IAP	Apoptose Inhibitor Protien
Ig	Immunglobulin
IgA	Immunglobulin Klasse A
IgG	Immunglobulin Klasse G
IgM	Immunglobulin Klasse M

Abkürzungsverzeichnis

IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
INF- α	Interferon-alpha
INF- γ	Interferon-gamma
ITP	idiopathische thrombozytopenische Purpura
JNK	c-Jun N-terminale Kinase (engl. c-Jun N-terminal kinase)
kD	Kilodalton
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MK	Megakaryozyten
M Molar	(1 mol/l)
MALT	Mucosa assoziiertes lymphatisches Gewebe
mRNA	Messenger RNA
MAIPA	(Engl. Monoclonal platelet antigen capture assays)
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase (engl. .mitogen-activated protein kinase)
muBAFF	murines BAFF
MS	Multiple Scleroses
mTor	Ziel des Rapamycins im Säugetier (engl. mammalian Target of Rapamycin)
LMP	latentes Membranprotein
LT β	Lymphotoxin β
NF-AT	Nuklearer Faktor Aktivierter T-Zellen
NF κ B	Nuklearer Faktor κ B
OD	Optische Dichte
OPG	Osteoprotegerin
PAF	Platelet-activating factor
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PBMC	Periphere Blutmononukleare Zellen
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. Polymerase chain reaction)
PDGF	Platelet-derived growth factor
PE	Phycoerythrin
PI	Propidium Iodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase

Abkürzungsverzeichnis

PKC-alpha	Protein kinase C-alpha
PKR	Protein Kinase Rezeptor
p38	Stress-aktivierte MAPK von 38 kD
qPCR	Quantitative PCR
PRR	Pattern-Erkennung Rezeptor (engl. pattern recognition receptor)
RA	Rheumatoide Arthritis
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. Ribonucleid Acid)
RNS	Reactive Nitrogen Species
RT	Raumtemperatur, Real Time PCR oder Reverse Transkriptase
SCF	Stem Cell Factor
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SHM	somatische Hypermutationen
TACI	transmembran activator and CAML interactor
S6K1	ribosomalen Protein S6 Kinase 1
Th1	T-Helferzellen 1
Th2	T-Helferzellen 2
TGF- β	Transforming growth factor
THD	TNF homology domain
TIM	(TRAF)- interagierenden Proteine
TLR	Toll-like Rezeptoren
TM	Transmembrandomäne
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFL-SF	TNF-Ligand-Superfamilie
TNF-R	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TNFR-SF	Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie
TRAP-6	Thrombin receptor-activating peptide-6
TPO	Thrombopoietin
5-LOX	5-Lipooxygenase

Abstrakt

1 Abstrakt

1.1 Einführung

Die Immunthrombozytopenie (ITP) ist eine Autoimmunerkrankung, die durch verminderte Thrombozytenzahl und verstärkte Blutungsneigung charakterisiert ist. Erhöhte Konzentration des Zytokins APRIL „A proliferation-inducing ligand“ wurde bereits in einer Reihe von Autoimmunerkrankungen festgestellt, wie dem systemischen Lupus Erythematoses, der Multiplen Sklerose und der rheumatischen Arthritis. Erhöhte Serumkonzentration von dem B-Zell aktivierenden Faktor (BAFF), ein Homolog von APRIL, wurde bei ITP-Patienten nachgewiesen.

1.2 Methodik

Zu überprüfen, ob APRIL ebenfalls bei Patienten mit ITP erhöht ist, wurden APRIL-Serumkonzentrationen von insgesamt 62 ITP-Patienten sowie 38 Gesunden mit ELISA gemessen. Zusätzlich wurden die Genexpressionsprofile von BAFF und APRIL mit Hilfe der Echtzeit-qPCR quantifiziert. Die Oberflächenexpression von APRIL-Rezeptoren TACI und BCMA und die Anbindung von APRIL an Thrombozyten wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht.

1.3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass APRIL-Serumkonzentration bei ITP-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen erhöht ist ($p = 0,0057$). Die Aufteilung der ITP-Patienten in Patienten mit primärer ($n = 40$) und sekundärer ITP ($n = 22$) ergab, dass APRIL ausschließlich bei Patienten mit primärer ITP im Vergleich zu den Kontrollen erhöht ist ($p = 0,0003$). Darüber hinaus konnte eine starke Korrelation der APRIL-Konzentration mit der Krankheitsaktivität festgestellt werden (Spearman $R = -0,4907$, $p = 0,0013$). Die Genexpressionsanalysen zeigten, dass BAFF nicht signifikant erhöht ist, wobei ein statistisch signifikanter Unterschied in der APRIL-Genexpression zwischen ITP-Patienten und den Kontrollen festgestellt werden konnte ($p = 0,0265$). Die Genexpression von BAFF und APRIL waren hingegen bei Patienten in Remission signifikant vermindert ($p = 0,0133$ und $p = 0,0097$). Die Expression von TACI und BCMA auf die Thrombozytenoberfläche konnte nicht nachgewiesen werden,

Abstrakt

trotzdem wurde eine physiologische Beladung der Thrombozyten mit APRIL sowie die Anbindung von rekombinantem APRIL an Thrombozyten festgestellt.

1.4 Schlussfolgerung

Die Serumkonzentration von APRIL korreliert stark mit der Krankheitsaktivität. Die erhöhten Serumkonzentrationen von APRIL können jedoch nicht durch eine gesteigerte Genexpression erklärt werden. Somit scheinen Regulationsmechanismen auf Proteinebene eine Rolle zu spielen. Da TACI und BCMA von Thrombozyten nicht exprimiert werden, ist davon auszugehen, dass APRIL an die Thrombozyten möglicherweise über die Heparansulfat Seitenketten des auf der Thrombozytenoberfläche vorhandenen Syndekan-4 bindet. Die Interaktion zwischen APRIL und Syndekan-4 könnte möglicherweise die Apoptoseinduktion von TNF-alpha und TNFR 1 von Thrombozyten begünstigen, was ein bislang unbekannter Mechanismus der Thrombozytopenie darstellt. APRIL stellt somit ein vielversprechendes, therapeutisches Target für die Behandlung von ITP-Patienten dar.

Abstract

2 Abstract

2.1 Introduction

The Immune thrombocytopenia (ITP) is an autoimmune disease that is characterized by decreased platelet numbers and a bleeding tendency. A proliferation-inducing ligand (APRIL) is a member of the Tumor necrosis factors (TNF) family. It has the ability to stimulate the proliferation of tumor cells, megakaryocytes and play a physiological role in B cell biology. Elevated serum level of the B-cell activating factor (BAFF), a homologue of APRIL, has been demonstrated in patients with ITP. For this reason, we investigated whether APRIL was also increased in patients with ITP.

2.2 Methods

APRIL Serum concentrations were investigated in 62 ITP patients and in 38 healthy controls using ELISA. In addition, the gene expression profiles of BAFF and APRIL were quantified using RT-PCR. Therefore, we used flow cytometric analyses to verify the expression of the APRIL receptors TACI and BCMA on platelets and to investigate the binding of APRIL to platelets surface.

2.3 Results

APRIL serum levels were increased significantly in patients with ITP when compared with the control group ($p = 0.0057$). ITP patients were divided into primary ($n = 40$) and secondary ITP patients ($n = 22$). Only the patients with primary ITP showed significantly higher APRIL concentrations compared to healthy donors ($p = 0.0003$). Moreover, a strong correlation between the APRIL concentration and the disease activity could be established (Spearman $R = -0.4907$, $p = 0.0013$). In contrast to BAFF, a statistically significant difference in the APRIL gene expression was found between ITP patients and the controls in RT-PCR analysis ($p = 0.0265$). However, the gene expression of both BAFF and APRIL were significantly reduced in patients in remission ($p = 0.0133$ and $p = 0.0097$). The expression of TACI and BCMA on the platelet surface was not found, nevertheless a physiological loading of the platelets with APRIL as well as the binding of a recombinant APRIL to platelets surface was shown using flow cytometry.

Abstract

2.4 Conclusion

The elevated APRIL serum level correlates strongly with the disease activity. However, the increased serum levels cannot be explained by an increased gene expression. Thus, regulatory mechanisms at the protein level appear to play a role. Furthermore, we showed that APRIL binds to platelets. This may occur through Syndecan-4. The interaction of Syndecan-4 with APRIL may possibly favor the induction of apoptosis of platelets by TNF-alpha and TNFR1 thereby presenting a previously unknown mechanism of thrombocytopenia. Thus, APRIL presents a promising therapeutic target for the treatment of ITP patients.

3 Einleitung

3.1 Immunthrombozytopenie (ITP)

3.1.1 Definition und Geschichte

Die Immunthrombozytopenie (ITP), früher bezeichnet als idiopathische thrombozytopenische Purpura, ist eine erworbene Autoimmunerkrankung, die durch eine vorübergehende oder anhaltende Thrombozytopenie charakterisiert ist und mit oder ohne verstärkter Blutungsneigung einhergehen kann [1]. Als klinisches Bild wurde die Purpura bereits in der griechisch-römischen Zeit von Ärzten wie Hippokrates und Galen beschrieben. Im Jahr 1025 beschrieb Avicenna einen Fall mit chronischer Purpura, die zur Diagnose der ITP passt. Paul Gottlieb Werlhof stellte im Jahr 1735 das klassische Bild der Immunthrombozytopenie (ITP bzw. Morbus Werlhof) dar [2]. Der Hinweis auf den immunpathologische Hintergründe dieser Krankheit kam von Harrington und Shulman im Jahr 1951, nachdem Plasmatransfusionen von Morbus Werlhof Patienten zur Thrombozytopenie bei gesunden Empfängern führten [3].

3.1.2 Pathophysiologie

Die ITP ist eine Autoimmunerkrankung, wobei Thrombozyten durch anti-thrombozytäre Autoantikörper opsoniert und Fc-Rezeptor-vermittelt durch Makrophagen im retikuloendothelialen System abgebaut werden [4]. Meist gehören diese Autoantikörper zur Klasse IgG, die gegen Epitope verschiedener Glykoproteine (GPIIb/IIIa, GPIb/IX, GPV) gerichtet sein können. Die Ursache, die zur Bildung von Autoantikörpern führt, ist bislang unbekannt. Generell wird zwischen einer primären ITP (ohne Begleiterkrankungen) und einer sekundären ITP (mit Begleiterkrankungen) unterschieden. Die primäre ITP wird in der Regel durch anti-thrombozytäre Autoantikörper hervorgerufen, die zu einem gesteigerten Abbau der Thrombozyten in den Sequestrationsorganen führt. Autoantikörper können nicht nur die FC-Rezeptor vermittelte Phagozytose begünstigen, sondern können auch die Thrombozytenfunktion sowie die Thrombozytenbildung beeinflussen [5]. Bei einem Teil der Patienten, lässt sich neben dem vermehrten Thrombozytenabbau eine

Einleitung

gestörte Thrombozytopoese nachweisen [6, 7]. Die sekundäre ITP kommt begleitend bei anderen Grunderkrankungen vor, wie z.B. dem systemischen Lupus Erythematodes (SLE), der chronischen lymphatischen Leukämie, bei Lymphomen, und bei Infektionen mit HIV, Helicobacter pylori und Hepatitis C [1, 5]. Neue Erkenntnisse über die sekundären Formen der ITP führen zur Annahme, dass verschiedene Mechanismen für die Entstehung der Erkrankung verantwortlich sein könnten [5].

Pathophysiologisch und klinisch lässt sich die ITP bei adulten Patienten von der ITP bei pädiatrischen Patienten unterscheiden. Bei der pädiatrischen ITP ist der Auslöser der Thrombozytopenie oft eine vorausgegangene Infektion. Bei der Mehrheit dieser jungen Patienten bildet sich die ITP ohne therapeutische Interventionen spontan innerhalb weniger Wochen zurück. Nur bei wenigen Kindern nimmt die Erkrankung einen chronischen Verlauf an. Der Verlauf der ITP bei Erwachsenen ist fast immer chronisch [8]. Das klinische Bild der chronischen ITP ist extrem variable. Einige Patienten bleiben asymptomatisch, wobei andere hingegen eine lebensbedrohliche Blutung entwickeln können. Bei einem Teil der Patienten, lässt sich neben dem vermehrten Thrombozytenabbau eine gestörte Thrombozytopoese nachweisen [6, 7]. Darüber hinaus scheinen die T-Lymphozyten eine bedeutende Rolle bei der Pathophysiologie der ITP zu spielen [5, 9].

3.1.3 Inzidenz

Mit einer Inzidenz von 2-4 Neuerkrankungen pro 100.000 / Jahr gehört die ITP zu den seltenen Erkrankungen. Zum Beispiel liegt die Inzidenz in Dänemark bei 3,2 [10], in Großbritannien bei 1,6 pro 100.000 jährlich [11]. In Deutschland wurde die Prävalenz der ITP mit ca. 2 chronischen ITP-Patienten pro 10,000 Personen bestimmt. Die Prävalenz kann sich zu anderen europäischen Ländern unterscheiden.

Einleitung

3.1.4 Diagnostik

Im Blutbild ist die Thrombozytopenie mit einer Thrombozytenzahl kleiner 100×10^9 /L, oft der einzige auffällige Befund [12]. Da es bislang keine ITP-spezifischen Marker gibt, wird die ITP über eine Ausschlussdiagnostik diagnostiziert [13, 14]. Differentialdiagnostisch kommen zahlreiche Thrombozytopenien in Frage (Tabelle 1).

Tabelle 1: Differentialdiagnose der Thrombozytopenien

Pseudothrombozytopenie (EDTA-Thrombozytopenie)
Hereditäre Thrombozytopenie
Medikamenten-induzierte Thrombozytopenie
Zytostatika-induzierte Thrombozytopenie
Virustatika-induzierte Thrombozytopenie
Heparin-induzierte Thrombozytopenie
Posttransfusionelle Purpura
Schwangerschaftsassozierte Thrombozytopenie
Lymphome
Lebererkrankungen
Morbus Gaucher
Alkoholabusus
Sarkoidose
Schwere Vitaminmängel (B12, Folsäure, auch schwerster Eisenmangel)
Große Hämangiome (z.B. Kasabach-Merritt-Syndrom)
Verbrauchskoagulopathie
Thrombotisch thrombozytopenische Purpura und hämolytisch urämisches Syndrom

Nach Matzdorff, A., A. Giagounidis, et al. 2010 [15].

Anti-thrombozytäre Autoantikörper sind für die Diagnostik der ITP ein sehr wichtiges Tool. Allerdings lassen sich nur bei ca. 60% der Patienten Autoantikörper nachweisen [9]. Dies deutet möglicherweise auf eine geringe Nachweisgrenze der derzeit angewendeten Tests, auf bislang unbekannte Autoantigene und/oder auf andere Mechanismen hin, die den Thrombozytenabbau unabhängig von Autoantikörpern bewirken [5]. Aufgrund dessen, dass der Nachweis von Autoantikörpern schwierig ist und differentialdiagnostisch eine Vielzahl von Erkrankungen ausgeschlossen werden müssen, bleibt es gelegentlich unklar, ob eine primäre ITP tatsächlich vorliegt oder nicht.

Einleitung

3.1.5 Therapie

Nur bei etwa 5 – 9% der chronischen ITP Fälle kommt es ohne Therapie zur spontanen Remission [16]. Die Indikation und die Auswahl der Therapie sind eher von Schweregrad der Blutungssymptome als von der Thrombozytenzahl abhängig [15]. Außerdem ist die ITP eine benigne Erkrankung und die Behandlung mit Immunsuppressiva ist häufig mit starken Nebenwirkungen verbunden. Derzeitige therapeutische Maßnahmen stellen vor allem Prednisolon und Dexamethason als First-Line Therapie dar. Die Splenektomie, die in den 1950er Jahren noch als First-Line Therapie galt, wird heute nur noch selten angewandt. Intravenöse Immunglobuline (IVIg) können einen raschen Anstieg ermöglichen, der jedoch in der Regel nur kurz anhält. Diese Therapie wird daher oft im Notfall angewendet. Bei akuten lebensbedrohlichen Blutungsneigungen ist eine massive Thrombozytentransfusion effektiv [17]. Alle diese Medikamente wirken unspezifisch und nur ein Drittel aller Patienten erreichen mit den derzeitigen Therapieoptionen eine langanhaltende Remission [18, 19]. Neuartige Therapieansätze stellen derzeit die Thrombopoietin-Rezeptor Antagonisten (Eltrombopag (Revolade) oder Nplate (Romiplostim)) dar. Langzeiteffekte dieser Therapie bleiben jedoch abzuwarten [20].

In den 1990er Jahren wurde die Effektivität von Interferon- α (INF- α) als Therapieansatz bei chronischen und therapierefraktären ITP-Patienten untersucht [21-24]. Obwohl die Ergebnisse vielversprechend waren, hat sich diese Therapie bis heute nicht durchgesetzt. Es wurde ebenfalls ein Fall beschrieben, bei dem ein Patient mit Hepatitis C vermittelte ITP erfolgreich mit Interferon- β behandelt werden konnte [25].

Einleitung

3.2 Die Rolle der Zytokine in der Pathophysiologie der ITP

Autoreaktive B- und T-Zellen können auch bei gesunden Individuen nachgewiesen werden, wodurch die Möglichkeit zur Reaktivität gegen körpereigene Strukturen in jedem normalen Individuum besteht [26]. Offenbar wird dort jedoch die Immunreaktion durch periphere Toleranzmechanismen unterdrückt. Warum es bei ITP zum Verlust der Toleranz und somit zur Immunantwort gegen körpereigene Thrombozyten kommt, ist bislang unbekannt. Man geht jedoch davon aus, dass die Toleranzmechanismen u.a. über Zytokine reguliert werden [27]. Zur Zytokinfamilie gehören Interferone, Interleukine, Chemokine und koloniestimulierende Faktoren sowie die Tumornekrosefaktoren.

Der Zusammenhang von Zytokinen in der Immunantwort soll zum Verständnis kurz demonstriert werden: Eine virale Infektion hat die Antigenpräsentation viraler Strukturen (Epitope) zur Folge. Diese ist durch eine T-Helferzellen 2 (Th2) Polarisation gekennzeichnet sowie durch die Hochregulierung von den Interleukinen IL-4, IL-5 und IL-13, wobei IL-12, Interferon-gamma (INF- γ) und Transforming growth factor-beta (TGF- β) vermindert sind. Dieses Zytokinprofil induziert die Aktivierung von naiven B-Zellen und regt die Antikörperbildung an. Kommt es zu Kreuzreaktionen viraler Epitope mit autologen Strukturen, so wird die Bildung von Autoantikörpern weiter begünstigt. Durch die ständige Präsenz des vermeintlichen Pathogenen (bei ITP sind es Thrombozyten, GPIIb/IIIa) nimmt die Erkrankung einen chronischen Verlauf. Das Zytokinprofil verschiebt sich, was eine T-Helferzellen 1 (Th1) Polarisation zur Folge hat, bei der Interleukine-2, INF- γ und Tumornekrosefaktor-Alpha (TNF- α) erhöht und IL-4 und IL-6 vermindert sind. So konnte gezeigt werden, dass IL-2, Interferon-gamma (INF- γ) und IL-10 nur bei chronischen ITP-Patienten im Serum erhöht sind [28]. Thrombozyten speichern viele Zytokine in ihren α -Granula, die nach Aktivierung z.B. durch die Anbindung von IgG Molekülen (Autoantikörpern) in die Zirkulation freigesetzt werden [29]. Zu diesen Zytokinen zählen Platelet-activating factor (PAF), Platelet-derived growth factor (PDGF), TGF- β und Chemokine wie Rantes (CCL5), wobei all diese Zytokine Makrophagen anlocken (Chemotaxis) und aktivieren und somit die Phagozytose IgG-beladener Thrombozyten fördern [30, 31].

Einleitung

Eine Thrombozytopenie kann jedoch auch durch eine gestörte Thrombozytenbildung verursacht werden. Auch hier spielen Zytokine eine wesentliche Rolle und können die Thrombozytenbildung sowie die Megakaryopoese direkt beeinflussen. Zu diesen Faktoren zählen z.B. IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, Stem Cell Factor (SCF), Thrombopoietin (TPO), Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) und Granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), wobei diese Zytokine bei ITP-Patienten zum Teil dysreguliert vorliegen [31].

Derzeit werden Zytokine jedoch nicht routinemäßig in Zentrallabors gemessen, sodass die Messungen primär in Forschungslaboren erfolgen [32]. Im Rahmen solcher Forschungsarbeiten werden in der Regel jedoch nur einzelne Zytokine analysiert. Die hoch-sensitive Technologie des enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA), die auch im Rahmen dieser Doktorarbeit eingesetzt wurde, stellt dabei den Gold-Standard zur Quantifizierung der Zytokinen dar.

Die am häufigsten untersuchten Zytokine sind IL-1, IL-6 und TNF-alpha. Erhöhte Serumspiegel dieser Zytokine vermitteln Entzündungsreaktionen. Eine Senkung dieser Zytokinspiegel kann daher eine therapeutische Option darstellen. In der Tat konnten erhöhte Serumspiegel von IL-6 und TNF- α auch bei ITP-Patienten festgestellt sowie eine Korrelation von IL-6 mit der Thrombozytenzahl nachgewiesen werden [33-35]. Die Identifizierung dysregulierter Zytokine, die in den Pathomechanismen der ITP involviert sind, stellen vielversprechende therapeutische Ansätze dar.

Vor kurzem hat diese Arbeitsgruppe gezeigt, dass das Zytokin BAFF (B cell activating factor, TNFSF13b) im Serum von ITP-Patienten erhöht ist [36]. BAFF ist ein hochwirksamer Stimulator, der die Reifung, die Zellfunktion und die Überlebensdauer von B-Zellen reguliert [37]. Erhöhte BAFF Serumspiegel werden mit dem Überleben autoreaktiver B-Zellen [38] sowie mit der Bildung von Autoantikörpern (Anti-Doppelstrang-DNA-Antikörpern in SLE, anti-SSA Antikörper im primären Sjögren-Syndrom und Rheumafaktoren in RA) assoziiert [39]. Daher scheinen die Mitglieder der Tumornekrosefaktoren in der Pathogenese der ITP eine Rolle zu spielen. Eine anti-BAFF Therapie (Belimumab) wurde bereits für ITP-

Einleitung

Patienten vorgeschlagen. Die Untersuchung von anti-BAFF therapeutischen Antikörpern befinden sich bereits in der Phase II klinischer Studien. Aber auch andere Zytokine der Tumornekrosefaktoren spielen bei der ITP eine bedeutsame Rolle.

3.3 Die Tumornekrosefaktoren Super Familie (TNF-SF)

Die ersten wegweisenden Arbeiten mit deutlichem Hinweis auf das Vorhandensein der Tumornekrosefaktoren (TNF) stammen aus dem Jahr 1975 von Carswell et al [40]. Sie sind multifunktionelle Botenstoffe mit pleiotroper Wirkung. Sie agieren in vielfältigen biologischen Prozessen, wie z.B. in der Differenzierung, Proliferation und Regulierung von Zellen des Immunsystems. Darüber hinaus können sie die Sekretion anderer Zytokine der TNF Familie vermitteln [41].

Die Zell-TNF-Interaktionen können je nach der Zelllinie und den gegenwärtigen biophysiologicalen Umständen zu verschiedenen, sogar manchmal gegensätzlichen Wirkungen führen.[42]. So können TNF-Liganden sowohl die Zelldifferenzierung und Proliferation von Tumorzellen als auch deren Apoptose regulieren [43]. Genetisch wurde die TNF-Superfamilie in zwei Untergruppen gegliedert: die TNF-Ligand-Superfamilie (TNFL-SF) und die TNF-Rezeptor-Superfamilie (TNFR-SF). Bekannt sind bis zum heutigen Tag 19 Liganden und 29 Rezeptoren [44] (Abb. 1).

Einleitung

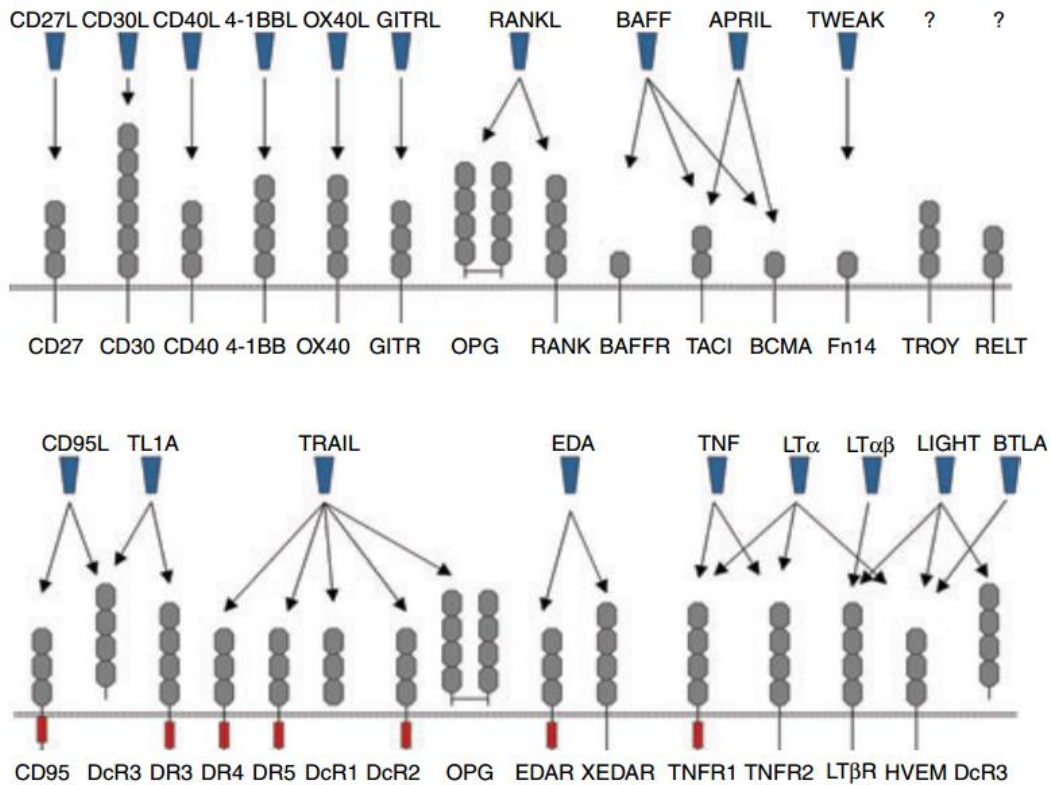


Abbildung 1: Mitglieder der TNF- Superfamilie

Die TNF- Superfamilie beinhaltet 19 Liganden (blau) und 29 Rezeptoren (braun). Die Wechselwirkungen der Liganden mit den entsprechenden Rezeptoren wurden mit Pfeilen gezeigt. Die Ektodomäne der Rezeptoren wurden mit der entsprechenden Anzahl von CRDs in grau dargestellt. Die Signaltransduktion bei Rezeptoren der ersten TNFR-SF Gruppe erfolgt über ihre zyttoplasmatischen Todesdomänen (rote Zylinder). CRDs: Cystein-reiche Domäne [44].

Die TNF-Liganden sind zellmembranständige Proteine vom Typ II. Sie werden als Homotrimere oder Heterotrimere exprimiert [45]. Sie bestehen aus einem carboxyterminalen extrazellulären und einem aminoterminalen intrazellulären Abschnitt, die durch eine einzelne Transmembran-Domäne aneinander gekoppelt sind. An der Region zwischen Transmembran- und Rezeptor-bindenden Domänen erfolgt die Spaltung und somit die Ausschüttung der Liganden in löslicher Form. Sowohl in membrangebundener als auch in löslicher Form sind sie jedoch biologisch aktiv [44].

Mitglieder der TNFL-SF besitzen als gemeinsames Merkmal eine C-terminale TNF-Homologie-Domäne (THD), welche über eine Konsensussequenz verfügt, die für den Aufbau der Sekundär- und Quatärstruktur der Liganden unerlässlich ist [45].

Einleitung

Während manche Mitglieder der TNFL-SF mit einem einzelnen Rezeptor interagieren, können andere an mehreren Rezeptoren binden, wie z.B. die Liganden A proliferation-inducing ligand (APRIL) und B-Zellen-aktivierender Faktor (BAFF) [43] (Abb. 1).

Die Mitglieder der TNFR-SF sind typische Typ I oder Typ III Transmembranproteine. Charakteristisch für diese Rezeptoren ist, dass sie in ihrer extrazellulären Untereinheit eine gemeinsame Cystein-reiche Domäne (CRD) aufweisen [46]. Durch zwei intermolekulare Disulfidbrücken entsteht eine stabile dreidimensionale Struktur, die als Ligandenbindungsstelle dieser Rezeptorklasse dient [45]. Variationen der Sequenzen und Anordnung der Aminosäuren innerhalb der CRD Domänen sind für die Gestalt, die Spezifität und die Flexibilität des entsprechenden Rezeptors verantwortlich [46].

Nach Bindung der Liganden an den entsprechenden Rezeptoren kommt es zur Einstellung von intrazellulären Adapterproteinen, die verschiedene Signaltransduktionen vermitteln. Es gibt zwei zytoplasmatischen Adaptermolekülklassen: die Todesdomäne Proteine (Death Domane, (DD)) und die TNF-Rezeptor-assoziierten-Proteine (TRAFs). Je nach dem Mechanismus, über welchen die Rezeptoren zur Aktivierung der intrazellulären Signalwege führen, lassen sich die Rezeptoren in drei große Gruppen klassifizieren [47]:

1. **Die erste Gruppe** schließt u.a. Rezeptor TNF-related Apoptosis inducing Ligand-Rezeptor 1 (TRAIL-R1), TRAIL-R2, TRAIL-R4, und TNF-Like-Rezeptor Apoptose Protein (TRAMP) ein (Abb. 1). Mitglieder dieser Gruppe verfügen in ihrem intrazellulären Teil über Todesdomänen, die die Caspase-Kaskade aktivieren und schließlich die Apoptose induzieren [44].
2. Neben BAFF-R, TACI und BCMA beinhaltet die **zweite Gruppe** u.a. TNFRII, CD27, CD30, CD40, LT β R, OX40, 4-1BB (Abb. 1). Gekennzeichnet ist diese Gruppe durch ihren zytoplasmatischen Teil, ein TNF-Rezeptor-assoziierten-Faktor (TRAF)-interagierendes Motive (TIM). Aktivierung dieser Rezeptoren führt zur Rekrutierung und Anlagerung der TRAF-Familienmitgliedern an diese zytoplasmatische TIM-Domäne. Infolgedessen werden Signalkaskaden wie

Einleitung

NF- κ B, JNK, p38, extrazelluläre Signal bezogene Kinase (ERK) und Phosphatidylinositol -3-Kinase (PI3K) aktiviert. Bis heute sind sechs TRAFs (TRAF1 bis TRAF6) identifiziert. Sie agieren bei der Regulierung verschiedener zellulärer Prozesse wie der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung und dem Zelltod [44].

3. Rezeptoren **der dritten Gruppe**, wie TRAIL-R3, DcR3 und Osteoprotegerin (OPG) besitzen keine intrazellulären Adapterproteine, damit vermitteln sie keine Signaltransduktionswege. Stattdessen regulieren sie die Aktivität der signaltransduzierenden Rezeptoren durch die Konkurrenz um die entsprechenden Liganden. (Abb. 1) [44].

3.3.1 Das Zytokin BAFF

BAFF (B-Zellen aktivierender Faktor), wird auch als Blys (B-Lymphozyten-Stimulator), CD257, TALL-1, THANK, oder zTNF4 bezeichnet, ist ein hochwirksamer Stimulator, der die Reifung, die Zellfunktion und die Überlebensdauer von B-Zellen reguliert [37]. Der Ligand BAFF weist eine hohe Homologie (~ 30%) zu APRIL auf. Im Gegensatz zu APRIL wird BAFF nicht von B-Lymphozyten exprimiert, sondern von anderen Zellen des lymphatischen Systems wie Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, neutrophilen Granulozyten und T-Lymphozyten. BAFF kommt in membranständiger als auch in löslicher Form vor [37, 48]. BAFF-R vermittelt die meisten Signale von BAFF, die zur Verlängerung der Überlebenszeit der B-Lymphozyten beitragen [49, 50].

3.3.2 Das Zytokin APRIL

APRIL ist ein relativ neues Mitglied der TNF-Familie. Aufgrund seiner Fähigkeit, die Proliferation von Tumorzellen in vitro und vivo zu stimulieren, wurde es als „A proliferation-inducing ligand“ bezeichnet [51]. In der Literatur wurde der Ligand auch als TNSF13A, Tall-2, TRDL-1, CD256, UNQ383/PRO715 oder ZTNF2 genannt.

Einleitung

3.3.3 Die Struktur von APRIL

Das aus 250 Aminosäuren bestehende Typ II Protein besteht aus einem 28 Aminosäuren langen zytoplasmatischen Teil, einem 21 Aminosäuren langen hydrophoben Transmembranbereich und einer 201 Aminosäuren langen extrazellulären Domäne [52] (Abb. 2).

```

                                TM
MPASSPFLLLAPKGGPGNMGGFVREPALSVALWLSWGAALGAVACAMALIT 50

QQTELQSLRREVSRLLQGTGGPSQNGEGYPWQSLPEQSSDALEAWENGERS 100

RKRRRAVLTLQKQKQKQHSVLHLVLPINATSKDDSDVTEVMMQPALRRGRGLQA 150
    |sAPRIL      *
QGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFR CIRSM 200

PSPHPRAYNSCYSGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHGTF LGFVKL 250
  
```

Abbildung 2: Aminosäuresequenz des humanen APRILs

TM; Die Transmembrandomäne, (*); N- Glykosilierungsstelle sAPRIL; die NH₂-Terminus des rekombinanten APRIL [51].

Die Sequenz der extrazellulären Domäne des APRILs zeigt den höchsten Grad an Homologie mit BAFF 50%, mit FasL 21%, mit TNF- α 20%, mit LT β 18% und mit TRAIL und TRANCE je 15% [51] (Abb. 3).

```

APRIL 117 VHLVLPINATSKDDSDVTEVMMQPALRRGRGLQA...QGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVT...FTMGQV
TNFa 89 VAHYVNPQAEQG...QWLNLR...R...NALLANGVELRDNQLVPESEGLYLYSQVLFQGGCPS...TH...L...IT
LT a 64 AAHLIDPDKONS...LWRAN...TDRAFLQDGFSLSNNSLVPTSCHYLYSQVWFSGKAYSPKATSSPLYLAEV
FASL 146 VAHLTEKSNRSRMP...EWEDT...Y...CIVLLSGVKY...KGGGLVNETGLYLYSKVYFQGGSCN...NLPLSKY
TRAIL 123 AAHTEITRGRSNTLSSPNSKNEKALGRKINSWESSR...S...H...F...L...N...L...H...L...R...N...G...E...L...Z...H...E...K...G...E...Y...Y...S...Q...Y...F...F...Q...E...E...I...K...
TWEAK 143 AAHYEVHPRPGDGAQAGV...DGTVSGWEKARINSSPLRYNR...QIGEFVTRAGLYLYCQVHFDEGKAVY...LKLDL...L...D...G...V...
TRANCE 164 FAHLTIINATDIPSGSH...KVSLSSWYHD...R...W...G...K...S...N...M...T...F...S...N...G...K...L...E...V...N...Q...D...E...F...Y...L...Y...A...N...C...F...E...H...H...T...S...G...D...L...A...T...E...Y...L...Q...M...V...Y...

APRIL 182 VSREGQ...RQETLFR CIRSM...S...P...S...H...P...R...A...Y...N...S...C...Y...S...G...V...F...H...L...H...Q...G...D...I...L...S...V...I...I...P...R...A...R...A...K...L...N...L...S...P...H...G...T...F...L...G...F...V...K...L
TNFa 157 SRIAVS...QTK...N...L...S...A...I...K...S...P...C...Q...R...E...T...P...E...G...A...E...A...K...P...W...Y...E...P...Y...L...G...G...F...P...O...L...E...K...G...D...R...L...S...A...E...Z...N...R...P...D...Y...L...D...F...A...E...S...Q...V...F...G...I...L...I...A...L
LT a 136 QLFSSQ...PFH...P...L...S...S...Q...K...M...V...P...G...L...Q...P...W...L...H...S...Y...H...G...A...F...O...L...T...O...G...D...L...S...T...H...T...D...G...I...P...H...L...V...L...S...P...S...T...V...P...F...G...A...F...A...L
FASL 212 YMRNSKY...P...Q...D...V...H...E...G...K...M...M...S...C...T...T...G...M...W...A...R...S...S...Y...L...G...A...F...E...N...L...S...D...H...L...Y...N...V...S...E...L...S...L...N...F...E...S...Q...T...F...G...L...K...L
TRAIL 189 VQYIYKMTSYEDP...L...L...K...S...A...R...N...S...C...S...K...D...A...Y...G...L...Y...S...Y...G...G...F...E...L...K...E...N...D...R...E...P...V...S...T...N...E...H...L...D...M...D...H...E...A...S...P...F...G...A...F...I...
TWEAK 223 ALRCLEE...F...S...A...T...A...A...S...L...G...P...Q...L...R...L...C...C...S...G...L...L...R...P...S...S...L...R...R...T...L...P...W...A...H...K...A...A...P...F...L...T...F...G...L...E...Q...
TRANCE 242 TKTSIKI...E...S...S...H...T...L...K...G...G...S...T...K...Y...S...G...N...S...P...H...F...Y...S...I...N...V...G...G...F...F...K...L...R...S...E...K...S...I...E...S...N...P...S...I...L...D...P...D...Q...D...A...T...F...G...A...F...K...
  
```

Abbildung 3: Die Homologie zwischen APRIL und anderen TNFL-SF Mitgliedern

Veranschaulichung der extrazellulären Proteinsequenz von APRIL und einigen Mitgliedern der TNF-Familie Liganden. Identische und homologe Zeichen werden in schwarz und grau dargestellt. TNFa, TNF- α ; LTa, LT α . [51].

Einleitung

3.3.4 Regulierung der zellulären Produktion von APRIL

APRIL ist ein Transmembranprotein Typ II, das im Gegensatz zu den meisten TNF-Liganden nicht auf der zellulären Oberfläche vorkommt, sondern lediglich als löslicher Ligand freigegeben wird [52]. Durch eine Furin-Konvertase wird APRIL innerhalb des Golgi Apparates verarbeitet und proteolytisch von seiner Bindungsstelle an der Plasmamembran gespalten und schließlich außerhalb der Zelle in einer löslichen Form freigesetzt [52].

3.3.5 APRIL Expression

Die höchste Expression von APRIL wurde bei einer Reihe von Tumorzelllinien registriert. Mechanismen, die für diese Expression verantwortlich sind, sind wenig bekannt. In vielen B-Zell-Malignitäten wurden somatische Hypermutationen (SHM), einschließlich konstitutiven Expressionen der Aktivierung induzierten Cytidindesaminase (AID), für die APRIL Transkription verantwortlich gemacht [53]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Epstein-Barr-Virus (EBV) Proteine, nämlich das latente Membranprotein-1 und -2 (LMP-1 und -2), die mit mehreren B-Zell-Malignitäten assoziiert sind, die Expression sowohl von BAFF als auch von APRIL hochregulieren [54].

In geringen Maße wird APRIL von inaktivierten B-Zellen, inaktivierten B1-Zellen, B-Vorläuferzellen, Monozyten, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und T-Lymphozyten sezerniert [55]. Diese Produktion von APRIL tritt als Reaktion auf verschiedene Zytokine auf, wie Interferon- α oder Interferon- γ , Interleukin-4 oder in Verbindung mit CD40 oder der Mustererkennungsrezeptoren (engl. pattern recognition receptors (PRR)) [56, 57]. Darüber hinaus wurde von einer Expression von APRIL aus Zellen wie Epithelzellen, Osteoklasten und Megakaryozyten berichtet [58, 59].

3.3.6 Rezeptoren von APRIL

Derzeit sind zwei Mitglieder der TNF-Rezeptor Superfamilie mit speziellen Bindungsaffinitäten zu APRIL identifiziert. Dabei handelt es sich um TACI (Transmembrane activator and calcium modulator cyclophilin ligand interactor) und

Einleitung

BCMA (B cell maturation antigen receptor) [60-63]. Beide Rezeptoren binden Homotrimere von BAFF und APRIL, während der BAFF-R lediglich BAFF-Heterotrimere mit hoher Affinität bindet. Daher wird BAFF-R als spezieller Rezeptor von BAFF betrachtet [49, 60]. Molekulare Interaktionen zwischen BCMA und TACI mit BAFF und APRIL wurden durch den Ansatz von strukturellen- und Mutationstechniken im Detail untersucht, um die Spezifität und die Affinität der Ligand-Rezeptor Wechselwirkung aufzuklären [64]. Während TACI beide Liganden mit gleicher Affinität bindet, ist die Interaktion von BCMA mit APRIL viel stärker als die Wechselwirkung zwischen BCMA und BAFF [64]. Die Ligand-Rezeptor Interaktionen bei Mäusen und Menschen sind in der Abbildung 4 schematisch dargestellt.

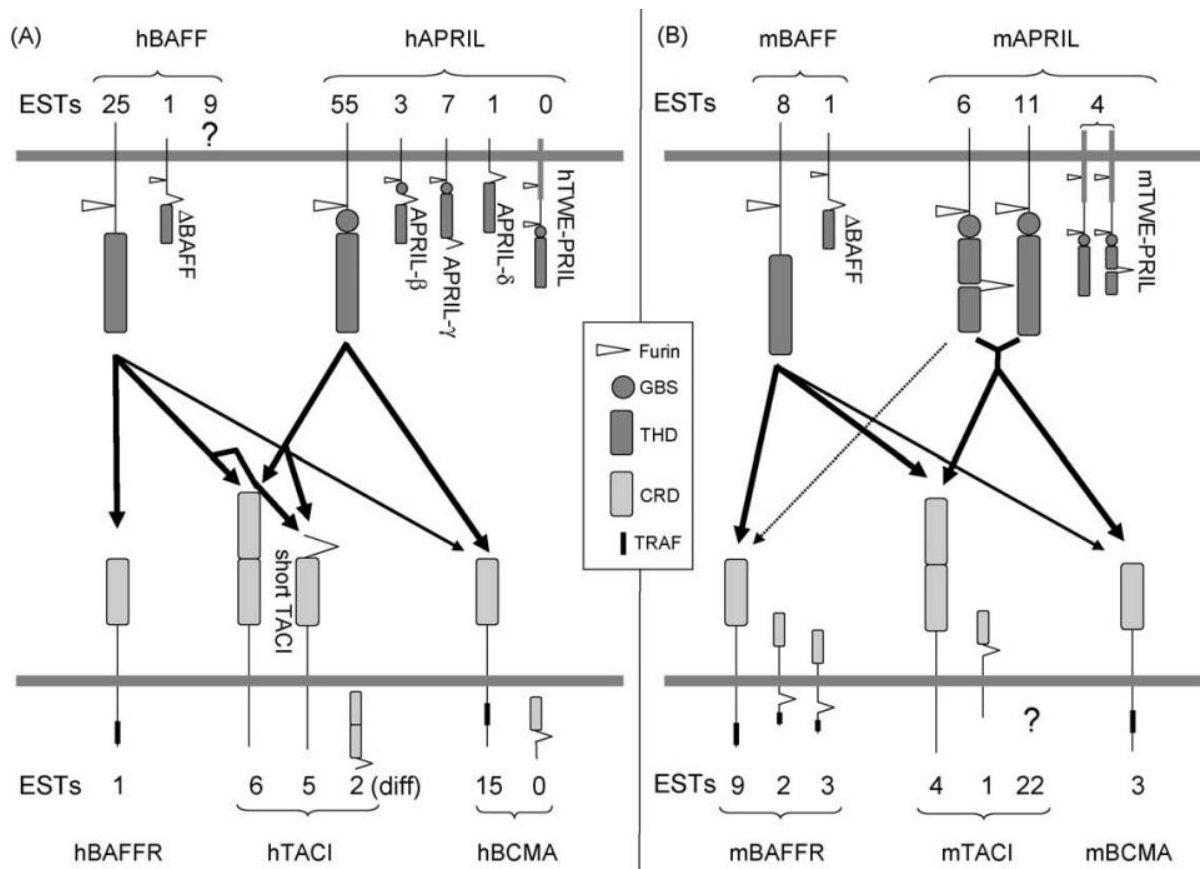


Abbildung 4: Interaktionen von APRIL/BAFF mit den entsprechenden Rezeptoren

Dicke Pfeile repräsentieren stark affine Interaktionen, wobei dünne Pfeile auf Interaktionen mit niedrigerer Affinität hinweisen. Wenig charakterisierte Spleiß-Varianten sind im Maßstab von 50% dargestellt. CRD: Cystein-reiche Domäne, GBS: Glykosaminoglykane bindende Sequenz, ESTs: Expressions-Sequenz-Marken (engl. expressed Sequence Tags), TRAF: stark konservierte Region des BAFF-R und BCMA, welche an TRAF3 binden [64].

Einleitung

3.3.7 Signaltransduktion durch APRIL

Der von APRIL angetriebene Signalweg hängt von dem spezifischen korrespondierenden Rezeptor und vom Zelltyp ab. Die APRIL Interaktion mit BCMA/TACI schaltet den klassischen NF- κ B Signalweg an, der die Hochregulierung von anti-apoptotischen Molekülen und die Runterregulierung von pro-apoptotischen Komponenten bewirkt, sodass der apoptotische Prozess unterbrochen wird. Wegen der Beteiligung von internen Adaptern im Zytosol gewinnt dieses Signal seine Spezifität und Stärke [58]. Der Ligand-BCMA Komplex bindet TNF-Rezeptor-assoziierte Faktoren (TRAF1, TRAF2 und TRAF3). Diese führen zur Aktivierung von NF- κ B, p38, mitogenactivating protein kinase (MAPK) und c-Jun NH₂-Terminalkinase (JNK). Infolgedessen geschieht die Übermittlung von Zellproliferations- und Zellüberlebenssignalen [65]. Der APRIL- TACI Komplex interagiert mit den TNFR-assoziierten Faktoren TRAF2, TRAF5 und TRAF6. Anschließend kommt es zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1 und NF-AT [66, 67] (Abb. 5). Wenig verstanden sind jedoch die Mechanismen, die sich unmittelbar nach der Rezeptor-Ligand Interaktion ereignen. Zum Beispiel es ist nicht klar, ob BCMA verschiedene TRAFs auf einmal aktiviert, oder ob nur einer aktiviert wird. Ebenso ist unklar, ob die TRAFs erst ab einer bestimmten Schwelle der Liganden oder in Reaktion auf bestimmte Liganden oder Formen der Liganden, aktiviert werden [58].

Einleitung

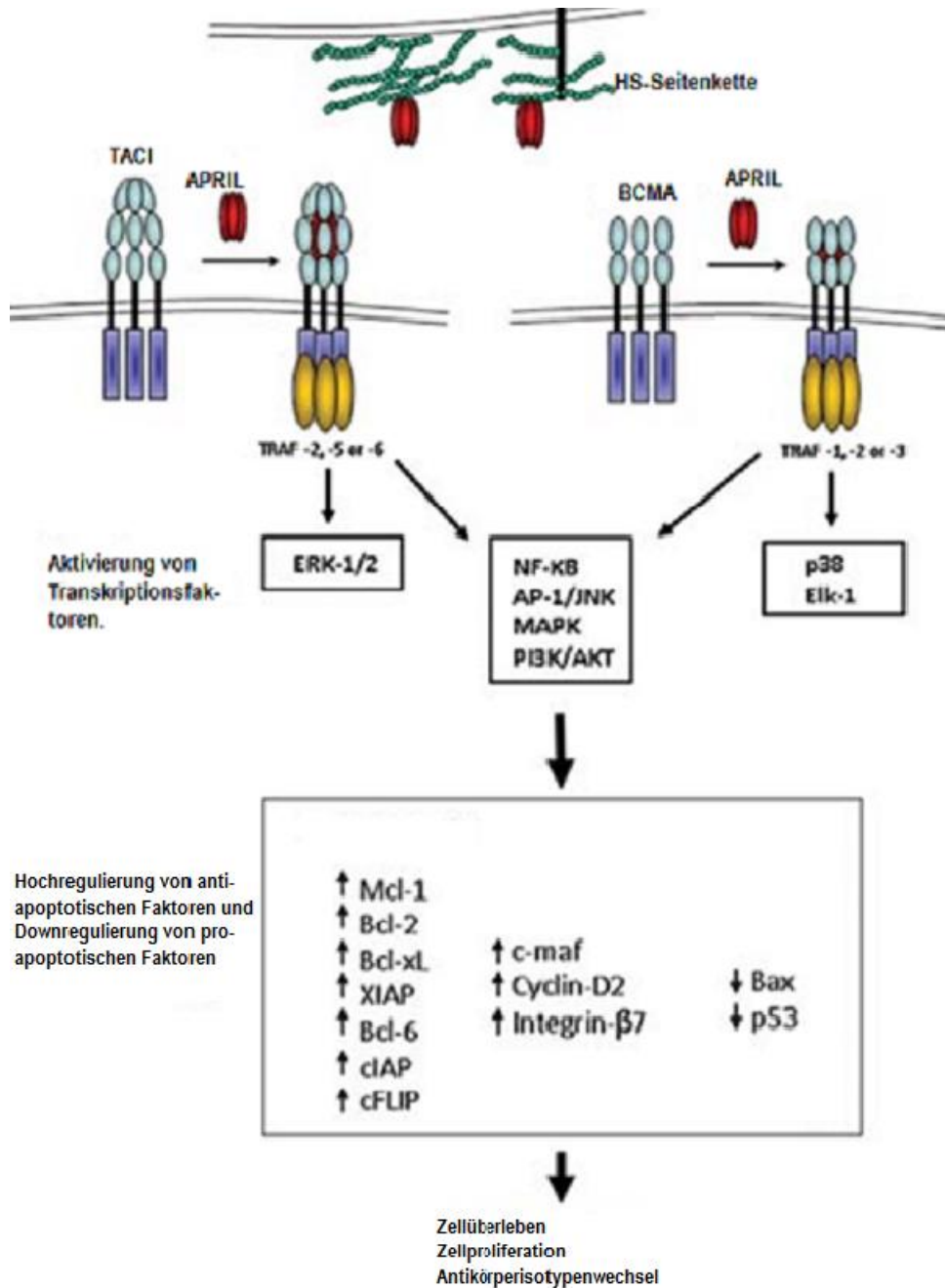


Abbildung 5: Signalwege von APRIL bei Tumorzellen und B-Zellen

APRIL bindet an BCMA und TACI sowie an Hepransulfat Proteoglykan (HSPG). Der Signalweg von APRIL beginnt mit der Rekrutierung von TNF-Rezeptor-assoziierten Faktoren (TRAFs). Im Wesentlichen beruht die Wirkung von TACI und BCMA auf der Aktivierung von NF-κB, p38, mitogenactivating protein kinase (MAPK) und c-Jun NH₂-Terminalkinase (JNK). Infolgedessen kommt es zur Hochregulierung von mehreren anti-apoptotischen Faktoren. In einigen Tumorzelllinien kommt es auch zur Downregulation von anderen pro-apoptotischen Molekülen. Das Endergebnis ist eine verlängerte Zellüberlebenszeit und eine gesteigerte Zellproliferationsrate. In B- Zellen treibt TACI den Signalweg zur Antikörperisotypenwechsel (class switch recombination, (CSR)) und IgA-Produktion an. Modifiziert nach Kemberly et al. 2009 [68].

Einleitung

3.3.8 APRIL und Immunreaktionen

Die Fähigkeit des rekombinanten APRIL primären B- und T-Zellen *in vitro* zu stimulieren und die Immunglobulin M (IgM) - Produktion von peripheren B-Zellen im Blut zu fördern, wurde bereits beschrieben. [61, 63, 69]. APRIL scheint den Isotypenwechsel (class switch recombination, CSR) zu regulieren, der während der T-Zell-abhängigen B-Zell-Aktivierung stattfindet. Viele Studien machten die APRIL-TACI Interaktion für den IgG-IgA Isotypwechsel und die Immunglobulinproduktion in B-Lymphozyten sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen verantwortlich. Deshalb wurde TACI zum Hauptmediator dieser Wechselwirkung erklärt [54, 56, 70-72]. In der Tabelle 2 sind die wichtigsten Auswirkungen von APRIL auf Immunzelllinien zusammengefasst.

In vitro wiesen die mit APRIL transfizierte T-Zellen, verstärkte Zellproliferationsraten sowie eine erhöhte IL-2-Produktion auf [73]. Diese proliferative Wirkung wurde später auf die Interaktion zwischen APRIL und TACI zurückgeführt [67]. Ferner wurde eine gesteigerte Überlebensfähigkeit der mit APRIL transfizierten T-Zellen *in vitro* registriert. Diese ging mit erhöhten Bcl-2 Expressionen in diesen Zellen einher. Dieser anti-apoptotische Effekt von APRIL konnte nicht durch die Zugabe von TACI/BCMA blockierenden Antikörpern aufgehoben werden [73]. Dieser Befund deutet darauf hin, dass noch mindestens ein unbekannter APRIL-Rezeptor existieren muss.

Einleitung

Tabelle 2: Rolle von APRIL bei der Immunreaktion

Zelllinie	B-Zellen in der Milz	Plasmazellen im Knochenmark	Plasmazellen der Schleimhaut
Expression von Rezeptor/Ligand	BAFF-R, TACI und BCMA je nach Reifungsstadium. GC B-Zellen und normale B-Zellen exprimieren kein APRIL.	Überexpression von BCMA auf Plasmazellen und Plasmablasten.	Die Expression von TACI ist essentiell für CSR. Plasmazellen und B-Zellen der Keimzentren exprimieren BCMA.
Vorgeschlagene Mechanismen	APRIL- TACI Interaktion löst CSR aus. APRIL- TACI/BCMA Interaktion verlängert die Überlebenszeit von IgA-produzierenden B-Zellen. Die Polymerisation von APRIL ist für seine Interaktion mit TACI notwendig.	BCMA vermittelt die überlebenssignale. TACI übermittelt die CSR Signalisierung. Bindung an HSPG ist essentiell für die effektive APRIL-Wirkung. Hochregulierung von Bcl-xL. Die Ausreifung der Plasmablasten zu Plasmazellen benötigt BCMA und TACI	Spezifischer Klassenwechsel von IgA1 zu IgA2. Hochregulierung von Bcl-2, Bcl-xL und Mcl-1. APRIL-HSPG Interaktion bildet Plasmazellennische
Stützende Zellen	Dendritische Zellen setzen APRIL als Antwort auf eine Reihe von Stimulationen frei.	Stromazellen im Knochenmark produzieren hohe Konzentrationen von APRIL.	DZ produzieren APRIL in Reaktion auf die TLR Rezeptor-Signalisierung durch PKP-Aktivierung. Obere MALT: tonsillare Epithelzellen sezernieren APRIL. Untere MALT: neutrophile Granulozyten produzieren APRIL, der die IgA Produktion stimuliert.

Abkürzungen: CSR: Antikörperisotypenwechsel ,GC-B Zellen: B Zellen des Keimzentrums, MALT: Mucosa assoziierte lymphatische Gewebe (nach Kimberly 2009 [58]).

Einleitung

3.3.9 APRIL und die Megakaryopoese

In vitro wurde bewiesen, dass APRIL auch an der Reifung und Differenzierung von Megakaryozyten beteiligt ist. Dabei wirkt APRIL wie ein autokriner Wachstumsfaktor, der von den Megakaryozyten bis zu ihren fortgeschrittenen Reifungsstadien exprimiert wird [59]. Allerdings exprimieren Megakaryozyten weder TACI noch BCMA, wodurch sich die Frage stellt, wie dieser autokrine Effekt ermöglicht wird.

1.2.10 Identifizierung eines weiteren APRIL-Rezeptors

Ähnlich wie bei Megakaryozyten konnte eine proliferative Wirkung von APRIL *in vivo* bei bestimmten Tumorzelllinien beobachtet werden, die weder TACI noch BCMA exprimieren. Beispielsweise stimulierte die Behandlung mit APRIL die Proliferation von Jurkat T-Leukämiezellen. Ähnliche Ergebnisse wurden bei anderen Zelllinien, wie NIH-3T3-Fibroblasten, Zellen von Lungenkarzinom, HT29-Kolonkarzinomzellen und A549 Epithelzellen aufgezeichnet. Diese Beobachtungen führten zur Annahme, dass es mindestens einen weiteren Rezeptor für APRIL geben muss, der für diesen stimulierenden Effekt verantwortlich ist [74].

Kürzlich machten zwei Studien bekannt, dass APRIL an Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) bindet. Diese könnten den spezifischen Rezeptor von APRIL darstellen [75, 76]. Es konnte festgestellt werden, dass APRIL an eine ionisch geladene Heparansulfat-Seitenkette eines Proteoglykans bindet. APRIL bindet an diesem Rezeptor mittels seiner NH₂-terminalen basischen Aminosäuresequenz QKQKKQ und an anderen drei basischen Aminosäuren Arg178, His 203 und Arg129, die auf der Proteinoberfläche verstreut vorzufinden sind. APRIL ist in der Lage Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) sowohl auf der Zelloberfläche als auch in der extrazellulären Matrix (ECM) zu binden [75, 76]. Umfangreiche Untersuchungen wiesen, dass HSPGs als Korezeptoren für eine Vielzahl löslicher Liganden fungieren, wie Fibroblasten Wachstumsfaktoren (FGFs), transformierenden Wachstumsfaktoren- β 1 und β 2-, vaskulären Endothelien Wachstumsfaktoren (VEGF), CC- und CXC-Chemokine sowie verschiedene Zytokine [77]. Proteoglykane sind auch als Tumormarker bekannt [78-80]. All diese Feststellungen führten zur Vermutung, dass die Vermittlung der intrazellulären Signale bei Tumorzelllinien,

Einleitung

denen die klassischen APRIL-Rezeptoren TACI und BCMA fehlen, auf die HSPG-APRIL Interaktion zurückfuhr.

3.3.10 Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG)

HSPGs sind eine Gruppe von Proteinen, die wenigstens eine kovalent verknüpfte Heparansulfat (HS)-Seitenkette beinhalten. Die Grundstruktur der linearen HS-Seitenketten weist eine unverzweigte, sich wiederholende Folge von Disaccharideinheiten auf, wobei einer der beiden Zuckerreste immer ein Aminozucker (N-Acetylglukosamin oder N-Acetylgalaktosamin) und der zweite Zucker meist eine Uronsäure (Glukuronsäure oder Iduronsäure) ist. Die HS-Seitenketten binden O-glykosidisch an Serinreste der Sequenz Glu/Asp-X-Ser-Gly über die Bindungsstelle Glukuronsäure-Galaktose-Galaktose-Xylose [81, 82].

Sulfatierung und Epimerisierung der HS-Seitenketten erzeugen zahlreiche Modifikationen des entsprechenden Proteoglykans. Aufgrund der Variabilität dieser Modifikationen entsteht eine größere Flexibilität in der Gestaltung sowie eine stark negative Ladung, sodass die elektrostatischen Bindungsinteraktionen des Proteoglykanes dadurch verstärkt werden. Einige dieser Wechselwirkungen sind sehr spezifisch und werden durch bestimmte Zuckersequenzen in der HS-Seitenketten vermittelt [83, 84].

Je nach der Primärstruktur und Art der Membranassoziationen lassen sich die Heparansulfat-Proteoglykane im Wesentlichen in zwei Untergruppen klassifizieren; die transmembranen Syndekane und die Membran assoziierten (Glykosylphosphatidylinositol-verankert) Glypikane.

3.3.11 Die Syndekan Familie

Syndekane sind eine große Familie von Heparansulfat-Proteoglykanen. Zur Syndekanen gehören in Säugetieren vier homologe Mitglieder: Syndekan-1 [85], Syndekan-2 (Fibroglykan) [86], Syndekan-3 (N-Syndekan) [87] und Syndekan-4, auch als Ryudokan oder Amphigykan bekannt [88]. Alle Syndekane sind aus einem Kernprotein aufgebaut, das ein Typ I Transmembranprotein ist. Das besteht aus

Einleitung

einer extrazellulären Domäne, deren Sequenz variabel ist (Identität 10 bis 20% beträgt), einer hydrophoben Transmembrandomäne und einer kurzen C-terminalen zytoplasmatischen Domäne. Im Gegensatz zur extrazellulären Domäne sind die Transmembrandomänen und die zytoplasmatischen Domänen hochkonserviert (Sequenzhämologie von 60 bis 70%) und an einer Reihe verschiedener biologischer Prozesse, wie z. B. an der zellulären Adhäsion, Proliferation, und Ausreifung, beteiligt [77, 89, 90].

Die Transmembrandomäne der Syndekane ist für ihre Oligomerization *in vivo* als auch *in vitro* erforderlich. Darüber hinaus scheint die durch die Transmembrandomäne induzierende Oligomerization für die Funktionalität der Syndekan 2 und 4 von entscheidender Bedeutung zu sein [91]. An die extrazelluläre Domäne des Kernproteins sind eine oder mehrere Glykosaminoglykanketten gebunden. Durch ihre Fähigkeit eine Reihe von Wachstumsfaktoren, extrazellulären Matrixfaktoren und anderen Proteinen zu binden, leisten die HS-Seitenketten einen regulatorischen Effekt bei der Zelladhäsion und der Zellteilungsaktivität [92]. Syndekan-2 und -4 tragen ausschließlich die Glykosaminoglykan-Ketten vom Heparansulfat-Typ, während neben Heparansulfat-Ketten auch Chondroitinsulfat-Ketten an Syndekan-1 und -3 anhaften können [93]. Syndekan-2 ist reichlich auf mesenchymalen Zellen lokalisiert, während Syndekan-1 und Syndekan-3 charakteristisch für epitheliale und neuronale Zellen sind [77, 93]. Syndekan-4 wird von verschiedenen Zelllinien wie z. B. Neuronzellen, Endothelzellen, Epithelzellen, Fettzellen, Fibroblasten und Thrombozyten exprimiert [91].

Im Gegensatz zu Syndekan-4 wurden die Syndekane 1,2,3 in den Thrombozyten nicht nachgewiesen. Das Kernprotein von Syndekan-4 (MG von 30 kD) ist kovalent an Serinresten verankert, die bis über hundert lineare Glykosaminoglykanketten umfassen. An seinem extrazellulären Teil trägt Syndekan-4 drei Heparansulfat-Ketten, die selektiv bestimmte Liganden binden können. Bei der Interaktionen mit der Liganden reichen die Transmembrandomänen aus, um eine intrazellulären Signaltransduktion auszulösen [91]. Thrombozyten exprimieren Syndekan-4 auf ihrer Oberfläche [94]. Blockierende Syndekan-4 Antikörper sind in der Lage die ADP induzierten Thrombozytenaggregation zu hemmen [94]. Daher ist davon

Einleitung

auszugehen, dass Syndekan-4 bei der Regulierung der Thrombozytenfunktion unmittelbar involviert ist (Abb. 6).

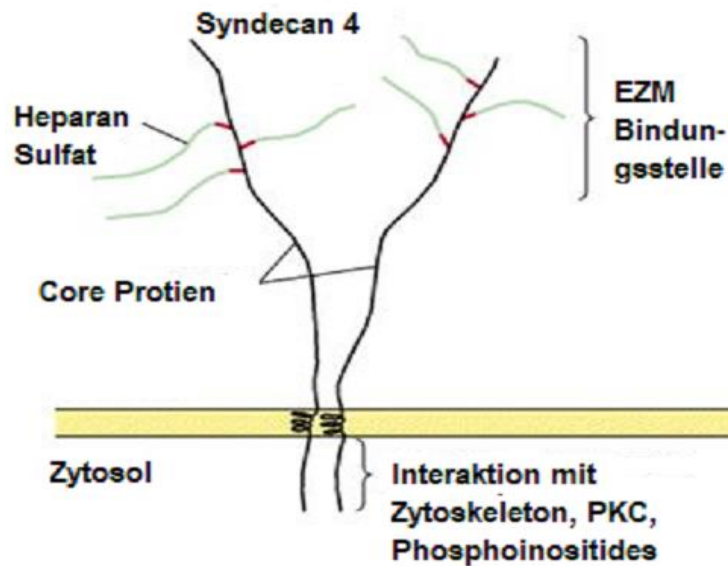


Abbildung 6: Struktur von Syndekan-4 (schematische Darstellung)

Die extrazelluläre Domäne des Kernproteins ist relativ lang und trägt drei HS-Seitenketten. Die Transmembrandomäne besteht aus einer einzigen membrandurchspannenden hydrophoben Helix. Die intrazelluläre Domäne nimmt an vielen biologischen Prozessen teil.

Zur Funktionalität von Syndekan-4 tragen hauptsächlich seine Heparansulfat-Seitenketten der Ektodomäne bei. Diese sind in der Lage verschiedene extrazelluläre Mediatoren, zahlreiche Wachstumsfaktoren und Zytokine zu binden. Dazu zählen z.B. die Wachstumsfaktoren der FGF-Familie, TGF- β 1 und -2, verschiedene Interleukine (IL-2, -3, -4, -5, -7, -8) und Koagulationsfaktoren wie Anthitrombin III [95]. Die Wechselwirkung mit den HS-Ketten führt zur Anlagerung der Faktoren auf der Zelloberfläche, was die Bindung an ihren jeweiligen primären Rezeptor ermöglicht [77]. Zusätzlich nimmt man an, dass die HS-Ketten die Dimerization der Faktoren stabilisieren [77]. Syndekan-4 interagiert auch mit Integrinen. Somit wird die Zell-Zell-Adhäsion unterstützt [82, 92].

Ziele und Fragestellung dieser Studie

4 Ziele und Fragestellung dieser Studie

Die Ätiologie sowie die Pathomechanismen der ITP sind bislang nicht vollständig aufgeklärt. Autoreaktive Immunzellen konnten jedoch bei ITP-Patienten festgestellt werden. Warum es bei ITP zum Verlust der Toleranz und somit zur Immunantwort gegen körpereigene Strukturen kommt, ist bislang unbekannt. Man geht jedoch davon aus, dass die Toleranzmechanismen u.a. über Zytokine reguliert werden [27]. In einer Vorarbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die BAFF-Konzentrationen im Serum von Patienten mit ITP signifikant erhöht ist. BAFF und APRIL teilen sich die beiden Rezeptoren TACI und BCMA und treten oft synergisch im Immunszenario in Erscheinung. Ob APRIL jedoch wie BAFF bei der ITP im Serum erhöht ist, wurde bis zum Zeitpunkt der Aufgabenstellung dieser Doktorarbeit nicht untersucht.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollen daher die Konzentrationen von APRIL bei ITP-Patienten bestimmt werden. Parallel zu den APRIL-Serumkonzentrationen sollen die Genexpression von BAFF und APRIL untersucht werden, um festzustellen, ob eine möglicherweise erhöhte Serumkonzentration von APRIL durch eine erhöhte Genexpression vermittelt wird. Wie bereits hergeleitet wurde, mag APRIL im Gegensatz zu BAFF über Heparansulfat Proteoglykane an Thrombozyten binden. Diese Anbindung wurde bislang nicht untersucht. Eine Anbindung könnte auf ein regulatorisches Potential von APRIL in der thrombozytären Apoptoseregulation hindeuten, und einen bislang unbekanntem Mechanismus des Thrombozytenabbaus darstellen. Daher soll im Rahmen dieser Forschungsarbeit die physiologische Bindung von APRIL sowie das Anbinden eines rekombinanten APRIL Liganden an Thrombozyten mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht werden.

Material und Methoden

5 Material und Methoden

5.1 Probanden- und Patientenpotential

5.1.1 Patienten

In dieser Arbeit wurden insgesamt 62 Patienten eingeschlossen (42 Frauen sowie 20 Männer). Das Durchschnittsalter der Studienpatienten lag bei 51 Jahren. Bei 40 Patienten wurde entsprechend der Richtlinien der amerikanischen Gesellschaft für Hämatologie [13] eine primäre Autoimmunthrombozytopenie und bei 22 Patienten eine sekundäre Autoimmunthrombozytopenie diagnostiziert (Tabelle 3).

Tabelle 3: Demographische Daten und klinische Diagnose der untersuchten Patienten

Variable	ITP	ES	AIHA	SLE	RA	VITP
Zahl der Patienten	40	12	5	2	1	2
Geschlecht (F\M)	24\16	11\1	4\1	1\1	1\0	1\1
Alter (Jahren)	53	45,5	64	44,97	29	42
Mittelwert der Thrombozytenzahl $\times 10^9 / \text{BL}$	85	167	150	239	293	163

Abkürzungen: Immunthrombozytopenie (ITP), Evans Syndrom (ES), Autoimmunhämolytische Anämie (AIHA), Systemischer Lupus Erythematodes (SLE), Rheumatische Arthritis (RA), viral induzierte Thrombozytopenie (VITP).

Siebzehn der primären Patienten hatten zur Zeit der Untersuchung eine aktive ITP. Diese Patienten hatten eine niedrige Thrombozytenzahl ($< 50 \times 10^3 / \mu\text{l}$) sowie Blutungsneigungen. Die restlichen Patienten hatten keine Blutungsneigung und die Thrombozytenzahl lag bei $> 50 \times 10^3 / \mu\text{l}$ bis $100 \times 10^3 / \mu\text{l}$. Drei Patienten waren sowohl klinisch als auch seitens der Laborparameter unauffällig, sodass sich die Erkrankungen in kompletten Remissionen befanden ($\text{Plt.} > 150 \times 10^3 / \mu\text{l}$). Sechszwanzig primären ITP-Patienten wurden mit Kortikosteroiden bzw. Immunsuppressiva behandelt. Die Tabelle 4 fasst die üblicherweise zu verabreichenden Medikamente sowie deren Konzentrationen zusammen, die bei der Studienpatienten eingesetzt wurden. Bei 15 Patienten war zur Zeit der Untersuchung keine Therapie notwendig. Keiner der untersuchten Patienten hatte während der Studiendauer Medikamente eingenommen, die bekanntlich zu Thrombozytopenien

Material und Methoden

führen können. Alle Patienten wurden ambulant im Virchow Klinikum der Charité Berlin, betreut.

Tabelle 4: Eingesetzten Medikamente bei den behandelten Studienpatienten

Predniso(lo)n	1 – 4 mg/kg p.o. tgl. für 1–2 Wochen, danach langsame Dosisreduktion
Dexamethason	40 mg p.o. tgl. über 4 Tage, 4 – 6 Zyklen alle 14 – 28 Tage
Intravenöse Immunglobuline G	0,4 g/kg/Tag über 5 Tage oder 1 g/kg/Tag über 2 Tage
Azathioprin	1 - 4 mg/kg p.o. tgl.
Cyclophosphamid	1 - 2 mg/kg p.o. tgl.
Mycophenolatemofetil	1 - 2 g/ tgl.
Anti-D	50 - 75 µg/kg i.v. oder s.c.

5.1.2 Probanden

Als Kontrollgruppe wurden 38 freiwillige gesunde Blutspender herangezogen, die über einem Zeitraum von mindestens zwei Wochen vor dem Blutabnahmezeitpunkt keine Medikamente zu sich genommen hatten, die die Thrombozytenzahl, die Thrombozytenfunktion oder die Thrombozytenaggregation beeinflussen. Sowohl die Patienten, als auch die gesunden Probanden wurden von den Abläufen und den Aspekten der Studie ausführlich aufgeklärt. Eine schriftliche Einwilligungserklärung wurde von jedem Patienten und Probanden eingeholt.

Material und Methoden

5.2 Geräte

- Automatischer Zellcounter (Sysmex: XP-300 und K4500)
- Zentrifuge Hettich Rotana / TR MACH
- Photometer (Hitachi U-3010 + UV Solutions V2.2)
- Auswertungssoftware FACS DIVA (Becton Dickinson, Heidelberg).
- Durchflusszytometer / FACS CANTO II (Becton Dickinson, Heidelberg).
- Durchflusszytometer / FACScan der Firma Becton Dickinson
- Software zur Datenbearbeitung FlowJo (TreeStar, USA) und Flowing Software (University of Turku, Finnland).
- Statistikprogramm (GraphPad Prism)
- NanoDrop 1100 Photometer
- iCycler (BIO-RAD)
- BIO-RAD CFX96 Multicolor Real-Time PCR Detection System mit CFX Manager Software zur Datenauswertung. (Bio-Rad Laboratoris. Ing.).

5.3 Material

5.3.1 Chemikalien des Enzymgekoppelten Immunadsorptionstests, ELISA

Das Kit zur Quantifizierung der APRIL-Konzentration im Serum wurde von Firma ALEXIS Biochemicals, AXXORA, Deutschland bezogen. Dieses Kit beinhaltete folgende Bestandteile

- Waschpuffer Konzentrat 20 x (PBS mit 1%Tween 20) wurde in 5% ig in steriles Wasser verdünnt und auf pH 7,4 abgestimmt.
- Assaypuffer Konzentrat 20 x (PBS mit 1%Tween 20) wurde in 5% ig in Waschpuffer verdünnt.
- APRIL Standard 100 ng/ml wurde in 40 µl steriles Wasser gelöst.
- Sample Diluent.
- Substrat Solution (tetramethyl-benzidine).
- Stop Solution (1M Phosphorsäure).
- Benötigt wurde zusätzlich PBS mit 0,5% BSA.

Material und Methoden

5.3.2 Puffer und Lösungen für die FACS Analysen

Acid Citrat Dextrose Adenin (ACDA): Fertiglösung: 111 µl/ ml Plasma.

Albuminlösung (20 %ig): 0,4 g Albumin wurden in 2 ml Aqua dest. gelöst.

Ausgangslösung: 16 g NaCl, 0,4 g KCl, 2g NaHCO₃ und 0,1 g NaH₂PO₄ (Monohydrat) wurden in 100 mL Aqua dest. gelöst.
Die Ausgangslösung ist ein Bestandteil der Grundlösung, die zur Herstellung des Waschpuffers verwendet wurde.
Der Waschpuffer wurde bei der Herstellung von Plättchenreiches Plasma eingesetzt.

Apyrase (2000 U): wurde in 2 ml NaCl gelöst. (Grade III, Sigma Aldrich).

Glucoselösung (10 %ig): 1 g D-Glucose wurde in 10 mL Aqua dest gelöst.

Grundlösung: zu 50 ml Aqua dest. wurden 5 ml Ausgangslösung, 1 ml Glucoselösung (10%), 1,75 ml Albuminlösung (20%) gegeben und auf 100 ml mit Aqua dest. aufgefüllt.
Anschließend wurden 30 ml davon auf 37 C° vorgewärmt und für weitere experimentelle Schritte bereitgestellt, wie z.B. die Herstellung von Plättchen reiches Plasma sowie die FACS Untersuchungen.

Hirudin (2000 U): wurde in 2 ml Aqua dest. gelöst. (Pentapharm).

Suspensionspuffer: Suspensionspuffer bestand aus PBS/BSA 0,5% (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung mit 0,5 g Rinderserumalbumin).

Waschpuffer(pH 6,4): Waschpuffer bestand aus 30 ml vorgewärmte Grundlösung, 30 µl Hirudin und 75 µl Apyrase.
Der Waschpuffer wurde bei der Herstellung von Plättchenreiches Plasma eingesetzt.

FACS-Puffer: PBS mit 2% FKS und 0,05% Natriumazid.

Material und Methoden

Tris Buffer Saline: 25 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM KCl, pH 7,4. (intern
Vorbereitet).

5.3.3 Chemikalien für die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion und Echtzeit-qPCR

DPBS: Dulbecco-Phosphatpuffersaline (Biochrom AG).

Biocoll: (Biochrom AG).

Trizol™: Amion.(Invitrogen LifeTechnologies).

Chloroform abs.: (Sigma Aldrich).

Isopropanol abs.: (Merck).

Ethanol abs.: (Merck).

Nuklease-freies Wasser: (Ambion).

M-MLV RT: Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase
(Invitrogen).

First-Strand-Puffer: (pH 8.3) besteht aus 250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl und 15 mM
MgCl₂ (Invitrogen).

DTT 0,1 M Dithiothreitol (Invitrogen).

Sybr Green Mastermix Platinum SYBR Green qPCR Supermix. (Invitrogen).

Material und Methoden

5.3.4 Antikörper, Antikörper-Konjugate und Antigene

Tabelle 5: Angewendete Antikörper, Antikörper-Konjugate und Antigene

Name	Beschreibung	Testansatz	Bezugsquelle
Coating Anti-APRIL	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper, der den humanen löslichen APRIL erkennt.	ELISA	ALEXIS Biochemichals
APRIL Standard	Lyophilizierter rekombinanter APRIL	ELISA	ALEXIS Biochemichals
Biotin-Conjugate	Biotin Kaninchen-Antikörper, der den humanen löslichen APRIL erkennt	ELISA	ALEXIS Biochemichals
Streptavidin-HRP	Bindet an Biotin.	ELISA	ALEXIS Biochemichals
MegaAPRIL	Löslicher rekombinanter humaner APRIL, der mit FLAG® vereint ist.		ALEXIS Biochemichals
Anti- APRIL (Sacha2)	Monoklonaler Ratte-Antikörper, der den humanen APRIL (Sacha2) erkennt	FACS	ALEXIS Biochemichals
Anti-Rat IgG-FITC	Polyklonaler Maus- Antikörper, der Ratt IgG erkennt.	FACS	ALEXIS Biochemichals
Anti-FLAG BioM2	Mit Biotin gebundener monoklonaler Maus-IgG 1-Antikörper, der die FLAG-Sequenz des Fusion -Proteins erkennt.	FACS	Sigma Aldrich
Streptavin-FITC	Bindet an Biotin	FACS	Sigma Aldrich
Anti-CD41-PE	PE konjugierter monoklonaler Maus – Antikörper, der den thrombzytenspezifischen Oberflächenmarker CD41 erkennt.	FACS	Beckman Coulte
Anti-CD61-PerCP	PerCP konjugierter monoklonaler Maus – Antikörper, der den thrombzytenspezifischen Oberflächenmarker CD61 erkennt.	FACS	Becton Dickinson
Anti-CD62P-FITC	FITC konjugierter monoklonaler Maus – Antikörper, der den thrombzytenspezifischen Oberflächenmarker CD62P (P-Selectin) erkennt.	FACS	Bioscience
Anti-BAFF R- FITC	FITC konjugierter monoklonaler Maus – IgG 2a Antikörper, der den humanen BAFF-R erkennt.	FACS	eBioscience
Anti -hBCMA-APC	APC konjugierter polyklonaler Ziege- IgG Antikörper, der das humane BCMA erkennt.	FACS	R&Dsystems
Anti-TACI-PE	PE konjugierter monoklonaler Maus –IgG 2a Antikörper, der das humane TACI erkennt.	FACS	eBioscience
Mouse IgG 1-FITC	FITC-konjugierter monoklonaler Maus-IgG 1 Antikörper, der als negative Kontrolle dient.	FACS	Immunotech
Goat IgG Control	APC- konjugierter normaler Ziege- IgG Antikörper, der als negative Kontrolle dient.	FACS	R&Dsystems
Mouse IgG-PE	PE-konjugierter monoklonaler Maus-IgG 1 Antikörper, der als negative Kontrolle dient.	FACS	BD

Material und Methoden

5.3.5 Synthetische Oligonukleotide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden PrimePCR Assays der Firma Biorad verwendet. Dabei handelt es sich um bereits technisch validierte Primersequenzen, die bereits in Konzentration und Komposition optimiert sind, sodass keine weiteren Optimierungen notwendig waren. Die Primersequenzen und deren Konzentration sind aus patentrechtlichen Gründen unbekannt. Folgende Produkte wurden verwendet:

Tabelle 6: Übersicht der PrimePCR Assay

Produkt	Assay Information	Unique Assay ID
PrimePCR SYBR Green Assay: ACTB	Exonic	qHsaCED0036269
PrimePCR SYBR Green Assay: TNFSF13 (APRIL)	Exonic	qHsaCED0020042
PrimePCR SYBR Green Assay: TNFSF13B (BAFF)	Intron-spanning	qHsaCID0010485
PrimePCR SYBR Green Assay: SCARA3	Intron-spanning	qHsaCID0008300

Material und Methoden

5.4 Methoden

5.4.1 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest, ELISA.

5.4.1.1 Prinzip der ELISA-Technik

Beim ELISA handelt es sich um einen Antigen-Antikörper Suchtest. Ein Antikörper wird eingesetzt, um einen spezifischen Stoff (Analyt) nachzuweisen. Der Nachweis erfolgt in der Regel mit einem Enzym-gekoppelten sekundären Antikörper. Kommt es zu einer spezifischen Bindung des Analyten, so kann der sekundäre Antikörper binden und es kommt zu einer Reaktion mit der Substratlösung. Nach dem Stoppen der Reaktion (i.d.R. mit H_2SO_4) wird dann die Lichtabsorption bzw. die Signalstärke der Lösung photometrisch gemessen. Diese ist dann proportional zur Konzentration des spezifischen Analyten, so dass der ELISA-Test nicht nur qualitative, sondern auch quantitative Aussagen liefert.

In dieser Arbeit erfolgte die Quantifizierung des löslichen humanen APRIL mit Hilfe eines Protokolls (The Human APRIL ELISA, BMS2008), das von der Firma Bender MedSystems für Forschungszwecke entwickelt und etabliert wurde. Im Prinzip handelt es sich bei diesem Protokoll um eine Sandwich ELISA. Der primäre Anti-APRIL Antikörper (ALEXIS Biochemichals) ist bereits an den Boden der verwendeten Mikrotitertestplatte gebunden.

Nach Zugabe von Serum oder Standardlösung bindet der nachzuweisende lösliche APRIL an den primären Antikörper. Im Anschluss wird ein zweiter Biotin-konjugierter Anti-APRIL-Antikörper hinzugefügt. Der sekundäre Antikörper erkennt ein anderes Epitop von APRIL, sodass beide Antikörper an unterschiedliche Stellen von APRIL simultan binden. Nach Ablauf der Inkubation erfolgt ein Waschschrift, um die nicht oder unspezifisch gebundenen Antigene zu entfernen und eine falsch positive Reaktion zu Verhindern. Um diesen Antikörper-Antigen-Antikörper Komplex nachzuweisen, wird das mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) markierter Streptavidin zugegeben, das sich selektiv mit Biotin-Komplexen verbindet. Nach einem weiteren Waschschrift, entsteht eine Farbentwicklung mit Hilfe eines chromogenen Substrats. Die Reaktion wird mit einer Stopplösung beendet. Der entwickelte Farbumschlag absorbiert das Licht bei bestimmter Wellenlänge und die Lichtabsorption kann photometrisch erfasst werden.

Material und Methoden

5.4.1.2 Bestimmung der APRIL- Serumkonzentration

10 ml Vollblut wurde mittels Venenpunktionsbesteck (Butterfly Safty -Lok TM) im Serum Röhrchen entnommen. Die Proben wurden bei 2600 g für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde das Serum in Eppendorf Tube aliquotiert. Die Seren wurden eingefroren und bei -20° Grad bis zur Durchführung des Messverfahrens aufbewahrt.

Alle Reagenzien wurden gründlich ohne Blasenbildung vor dem Gebrauch angesetzt. Die benötigte Anzahl an Teststreifen wurde so bestimmt, dass jede Probe/Standard doppelt getestet wurde. Der Streifenhalter wurde mit der benötigten Anzahl von Streifen bestückt.

Die 96-Welle Mikrotiterplatte sollte zuerst konditioniert werden, dabei wurde jede Kavität zweimal mit 300 µl Waschpuffer gewaschen. Nach dem letzten Ansaugvorgang wurde die Platte auf einem Papiertuch ausgeklopft, umgedreht und für 15 Minuten unter Vermeidung von Austrocknung auf ein erneutes Papiertuch gelegt. Eine Geometrische Verdünnungsreihe des Standards wurde hergestellt, indem 100 µl von Sample Diluent in jede Standard-Kavität eingegeben wurde und anschließend 100 µl rekombinante APRIL-Standard in die ersten Kavität eingegeben und gut gemischt wurde. Von der ersten Verdünnungsstufe wurde dann 100 µl auf die nächste Kavität übertragen. Diese Prozedur wurde 5-mal bis zum Erreichen der letzten Kavität wiederholt. Da wurde 100 µl aus der Mischung weggeworfen. Jede Blank-Kavität wurde ausschließlich mit 100 µl von Sample Diluent eingefüllt. Zur Vorbereitung der Proben Teststreifen wurden 50 µl des Sample Diluent zuerst in jede Kavität vorgelegt. Anschließend wurde 50 µl von jeder Probe zugegeben. Somit ergab sich ein Verdünnungsfaktor von 2, der bei der späteren Ermittlung der APRIL-Konzentrationen berücksichtigt wurde. Schließlich wurden 50 µl der verdünnten Biotin-Konjugate in alle Vertiefungen einschließlich der Blanks pipettiert.

Die Platte wurde dann mit einer Folie abgedeckt und auf einem Mikrotiterplatten - Schüttler bei 200 U/min bei Raumtemperatur (18 ° bis 25 ° C) für 2 Stunden inkubiert, so dass die Proben und die Kontrollen ausreichend mit der Konjugate-1

Material und Methoden

Gebrauchsverdünnung vermischt werden. Nach der ersten Inkubation wurde die Platte wie bereits beschrieben gewaschen und ausgeklopft. In jede Vertiefung wurden 100 µl des verdünnten Streptavidin-HRP zugegeben, einschließlich der Blanks. Danach wurde die Platte mit einer Folie verschlossen und auf einem Mikrotiterplatten Schüttler für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschvorgang erfolgte die Zugabe von 100 µl frisch hergestellter TMB Substratlösung (Tetramethylbenzidin) in alle Vertiefungen. Eine dritte Inkubation der Platte erfolgte für 10 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Um die enzymatische Reaktion zu stoppen, wurden 50 µl Stopp Solution (Phosphorsäure) in der gleichen Reihenfolge und den gleichen Zeitabständen wie die Substratlösung in jede Vertiefung gegeben.

Der durch diese enzymatische Reaktion entwickelte Farbumschlag absorbiert das Licht bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die Extinktionszunahme des in der analysierten Lösungen gebildeten Farbstoffs wurde spektrometrisch an einem ELISA-Reader (Photometer) gemessen. Zunahme der Extinktion ist der APRIL-Konzentration aus der Probe, dem Standard, und der Kontrolle proportional, solange die gemessenen optischen Dichten innerhalb des linearen Messbereiches lagen, der vom Hersteller zwischen 0 und 2 festgelegt wurde.

Nach Herstellerangabe sollte die relative Standardabweichung der Doppelbestimmung der optischen Dichte weniger als 20% sein. Bei jedem Testansatz wurde eine Eichkurve aus 4 - 6 verschiedenen Standard-Konzentrationen (0 - 50 ng/ml) erstellt (Abb. 7). Ein Bestimmtheitsmaß von $> 0,95$ wurde als akzeptable betrachtet.

Material und Methoden

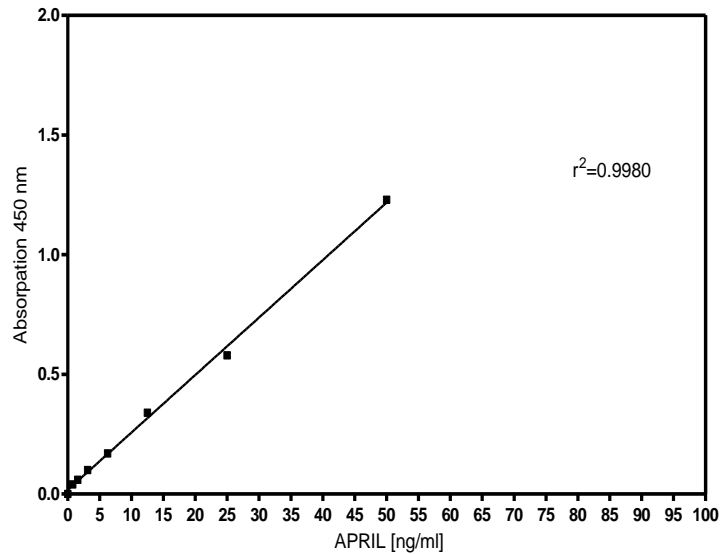


Abbildung 7: Eichkurve zur Bestimmung der Konzentration von APRIL

Zur Erstellung der Kalibrationskurve wurden aus der Standardlösung folgende Verdünnungen hergestellt: 1:2 - 1:4 - 1:8 - 1:16 - 1:32. Von diesen Verdünnungen sowie vom Nullwert (Blank) wurden die OD_{450} gemessen.

Die APRIL-Konzentrationen aus den Proben wurden anhand der mitgeführten Kalibrationskurve und nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor 2 berechnet. Nach Herstellerangaben wurde bei diesem Test ein linearer Messbereich der Lichtabsorption zwischen 0 und 2 festgelegt. Die gemessenen optischen Dichten aller untersuchten Serumproben lagen innerhalb des Linearitätsbereiches. Validierung der Methode durch den Hersteller ermittelte die Unpräzisionen in der Analysenserie $VC = 8,1\%$ und zwischen den Analysenserien $VC = 7,8\%$.

5.4.2 Genexpressionsanalyse von BAFF und APRIL von PBMCs

5.4.2.1 Isolierung von peripheren mononuklearen Zellen (PBMCs)

PBMCs wurden mit Hilfe des Ficoll Dichtegradienten isoliert. 5 mL EDTA-Vollblut wurden mit 5 mL Dulbecco-Phosphatpuffersaline (DPBS) verdünnt und auf 5 mL Biocoll aufgeschichtet. Durch die Zentrifugierung für 25 min. bei 650 g (ohne Bremse) bildet sich eine Schicht von mononuklearen Zellen. Diese Schicht wurde mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette in ein neues 15 mL Falcon Tube überführt, mit DPBS aufgefüllt und gewaschen, indem die Zellen für 5 min. bei 520 g pelletiert wurden. Das Zellpellet wurde dann resuspendiert, in ein 1,5 mL Eppendorf überführt und mit 1 mL Trizol™ lysiert und sofort bei -80°C eingefroren.

Material und Methoden

5.4.2.2 RNA Isolierung mit Trizol™

Die Isolierung der RNA erfolgte nach Herstellerangaben. Pro 1 mL Trizol wurden 200 µl Chloroform zugegeben, gut gemischt und 15 min. bei 12.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Um Protein- und DNA Kontaminationen zu vermeiden, wurde die obere (wässrige) Phase abgenommen, ohne das Proteinpellet (Interphase) zu berühren. Anschließend wurde 500 µl Isopropanol der wässrigen Phase zugegeben, um die RNA zu präzipitieren (Inkubation für 10 min bei RT). Um die RNA zu pelletieren wurden die Proben erneut bei 12.000 rpm für 10 min. bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die RNA wurde 1x mit 75%iges Ethanol gewaschen. Nach einem Zentrifugierungsschritt bei 7.500 rpm für 5 min. wurde der Überstand vorsichtig abgehoben. Restliches Ethanol wurde bei Raumtemperatur verdampft ohne dabei das RNA Pellet auszutrocknen. Das Pellet wurde in 50 µl Nuklease-freien Wasser resuspendiert. Die Konzentrationsbestimmung von RNA wurde mit Hilfe des NanoDrop 1100 gemessen.

5.4.2.3 Messung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration wurde mit Hilfe des NanoDrop 1100 Spektralphotometer (ThermoScientific) gemessen. Dabei wurde lediglich 1 µl der isolierten totalRNA unverdünnt eingesetzt. Zuvor wurde das Gerät mit Nuklease-freien Wasser (Ambion) kalibriert (Blank). Die Konzentrationen lagen bei den ITP-Patienten im Durchschnitt bei 241 ± 112 ng/µl und bei den Kontrollen bei 358 ± 80 ng/µl. Der Reinheitsgrad der Isolierten RNA (Proteinkontaminationen) konnte durch das Verhältnis von 260/280 nm klassifiziert werden. Werte zwischen 1,7 und 2,0 weisen auf eine hohe Reinheit hin. Bei den ITP-Patienten wurde im Durchschnitt eine Reinheit von $1,82 \pm 0,11$ gemessen, bei den Kontrollen lag sie mit $1,92 \pm 0,03$ immer noch im Normbereich. Somit wiesen die isolierten RNAs eine hohe Reinheit auf.

5.4.2.4 Reverse Transkriptase-PCR (cDNA-Synthese)

Total-RNA wurde von 56 ITP-Patienten und 18 Gesunden mittels M-MLV Reverse Transkriptase Assay in cDNA umgeschrieben. Alle Proben wurden normalisiert, indem pro Probe 2 µg Total-RNA in 28,25 µl Nuklease-freiem Wasser vorverdünnt wurden. Dazu wurden je Probe 1 µl dNTPs (10 mM) und 5 µl Hexamer-Primer (20

Material und Methoden

μM) zugegeben. Die Proben wurden dann für 5 min. bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden $15,75 \mu\text{l}$ eines RT-Mastermixes, bestehend aus $10 \mu\text{l}$ 5x Reaktion Puffers, $0,5 \mu\text{l}$ RiboLock (RNAse-Inhibitor ($40 \text{ U}/\mu\text{l}$)), $5 \mu\text{l}$ DTT ($0,1 \text{ M}$) und $0,25 \mu\text{l}$ Reverse Transkriptase, zugegeben. Die cDNA Synthese erfolgte dann im Thermocycler (iCycler, Biorad) zweistufig ($10 \text{ min. bei } 25^\circ\text{C}$ und $50 \text{ min. bei } 37^\circ\text{C}$). Nach einem Denaturierungsschritt ($15 \text{ min. bei } 70^\circ\text{C}$) wurden die Proben auf 4°C gekühlt.

5.4.2.5 Real Time PCR-basierte Quantifizierung von BAFF und APRIL

Es wurde je Target ein MasterMix bestand aus $1 \mu\text{l}$ PrimePCR Assay, $10 \mu\text{l}$ Platinum SYBR Green qPCR Supermix und $8,5 \mu\text{l}$ Nuklease-freies Wasser für die entsprechende Anzahl an Reaktionen angesetzt. Das Endvolumen betrug $20 \mu\text{l}$ pro Well. Es wurden dann $39 \mu\text{l}$ in einer Reihe vorgelegt, $1 \mu\text{l}$ cDNA zugegeben (entspricht 20 ng cDNA pro Reaktion) und dann mit Hilfe einer Multi-Channel Pipette je $20 \mu\text{l}$ in die Vertiefung der nächsten Spalte überführt. Somit ist gewährleistet, dass die Standardabweichung der Doppelbestimmung relativ gering ist. Das einzelne Zugeben von je $0,5 \mu\text{l}$ Template pro Well ist nicht empfehlenswert. Die qPCR erfolgte nach folgendem PCR Thermoprofil auf einem CFX96 Thermocycler (Biorad):

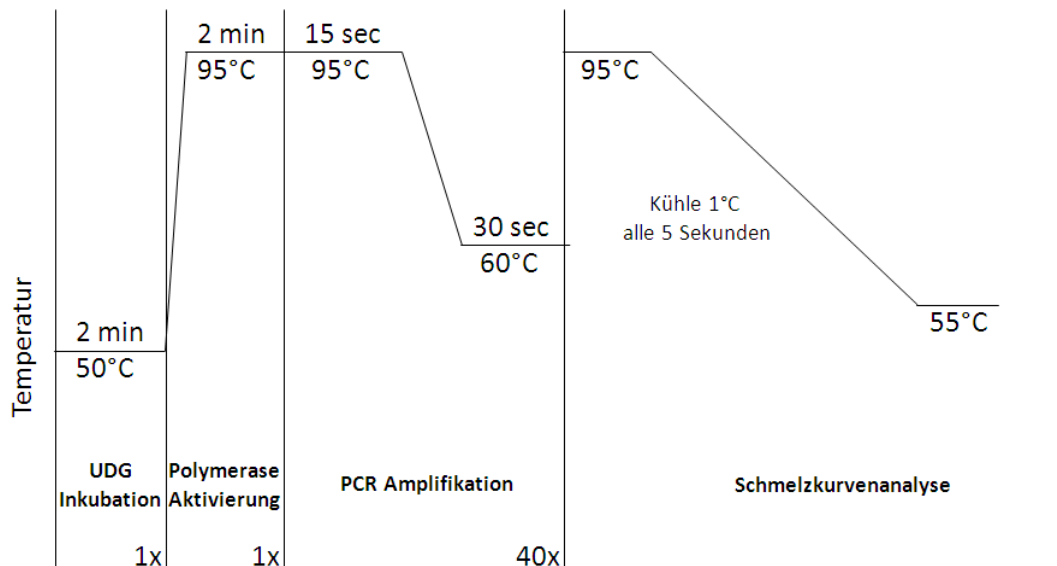


Abbildung 8: Thermoprofil der Genexpressionsstudie

Neben BAFF und APRIL wurde die Genexpression von β -Actin untersucht. β -Actin wird von allen eukaryotischen Zellen gleichstark exprimiert und dient als Referenzgen

Material und Methoden

Die Auswertung der Genexpressionsstudie erfolgte mit der Software CFX Manager™ (Biorad). Nach jedem Lauf erfolgten Schmelzkurvenanalysen zum Nachweis einer spezifischen Amplifikation. Darüber hinaus wurde eine Verdünnungsreihe zur Identifizierung der PCR-Effizienz mitgeführt (Abb. 9).

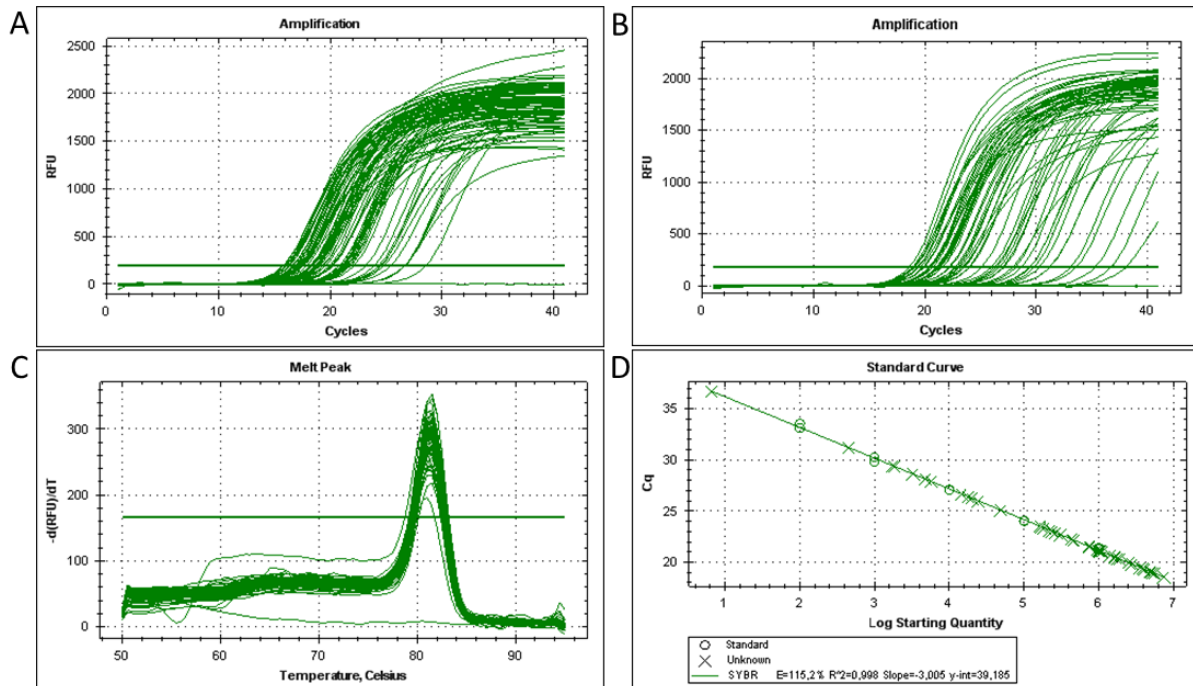


Abbildung 9: Übersicht zum qPCR Lauf am Beispiel von β -Actin.

A und **B** repräsentieren die Amplifikationskurven. **C** repräsentiert die delta-Ct Schmelzkurven der Amplifikationen. Da hier nur ein Peak zu sehen ist, war die Amplifikation spezifisch. **D** repräsentiert die PCR Effizienz. Eine PCR Effizienz von 100% ist optimal. Die PCR Effizienz von β -Actin lag bei 115,2%, die von APRIL bei 100,0% und die von BAFF bei 101,9%.

5.4.3 Durchflusszytometrische Untersuchungen

5.4.3.1 Isolierung der Thrombozyten für die Durchflusszytometrie

Es wurden zwei unterschiedliche Thrombozytenisolierungsverfahren angewandt.

Für die Überprüfung der **basalen Bindung von APRIL an Thrombozyten** wurden Blutproben im Rahmen der routinemäßigen Untersuchungen von jedem Patienten sowie Gesunden je 3 x 6 ml Citratblut (110 mM Natriumcitrat im Verhältnis 1:9) abgenommen. Nach einer 15 min. Inkubationszeit bei 37 °C wurden alle Proben für 25 min. bei 850 rpm (150 rcf) zentrifugiert um Plättchenreiches Plasma (PRP) zu

Material und Methoden

gewinnen. Dieses Plasma wurde in ein anderes Röhrchen überführt. Die Aktivierung der Thrombozyten und Kontaminationen mit Leukozyten und Erythrozyten wurden währenddessen möglichst verhindert, indem nur 9/10 des PRPs überführt wurden. Um die Bildung von Thrombozytenaggregaten zu verhindern wurde zu jedem Milliliter Plasma 250 µl vorgewärmtes ACDA Lösung zugegeben und für 10 min. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Thrombozyten in einem 50 ml Röhrchen nochmals für 5 min. bei 1800 rpm zentrifugiert. Schließlich erfolgte ein letzter Waschschrift mit 5 ml Waschpuffer (10 min. bei 1800 rpm (500 rcf)). Das Thrombozytenpellet wurde mit dem Suspensionspuffer resuspendiert. Nach der Bestimmung der Zellzahl am hämatologischen Automat (Sysmex) wurden die Plättchenzahl von 5×10^6 pro Ansatz eingestellt.

Zur Überprüfung der **Anbindung des rekombinanten APRIL Proteins** an Thrombozyten musste auf die Vermeidung der Voraktivierung besonders geachtet werden. ACDA Blut wurde von den Ambulanten Patienten sowie von den freiwilligen Gesunden Blutspendern mit dem Verhältnis (1,6 ml ACDA + 8,4 ml Vollblut) in Glaspolyröhrchen entnommen. Die Handhabung der Proben wurde innerhalb von vier Stunden nach der Blutentnahme gesichert. Sofort nach der Blutabnahme bis zur Durchführung der Analyse wurden die ACDA-Vollblutproben schräg bei 37°C gelagert. Danach wurden die Proben für 25 min. bei 800 U (120 rcf) ohne Bremse zentrifugiert. Das Thrombozytenreiche Plasma wurde milliliterweise und luftblasenfrei in vorgewärmte Polypropylenröhrchen überführt. Anschließend wurden 111 µl ACDA (zur Vermeidung der Thrombozytenaggregation) und 5 µl Apyrase (Hydrolyse von ATP und ADP zu AMP zur Vermeidung der Thrombozytenaktivierung) zu jedem 1 ml Plasma zugegeben und erneut für 7 Minuten bei 2000 U (520 rcf) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und die Thrombozytenpellets wurden zunächst in 1 ml Waschpuffer resuspendiert und dann mit 3 ml desselben Puffers aufgefüllt. Nach einer 15 min. Inkubationsphase bei 37 °C wurden die Proben erneut für 7 Minuten bei 37°C und 2000 U zentrifugiert gefolgt von einem weiteren Waschschrift mit 3 ml PBS/BSA 0,5%. Die letztendlich gebildeten Pellets wurden in 100 µl 0,5% PBS/BSA resuspendiert und in „Polsterten Round-Bottom“-Röhrchen pipettiert und für weitere experimentelle Schritte bereitgestellt.

Material und Methoden

5.4.3.2 Durchflusszytometrische Untersuchung der basalen Bindung von APRIL auf der Thrombozytenoberfläche

Bei jedem Patienten bzw. Gesunden wurden 2 Röhrchen angesetzt. Ein Röhrchen sollte mit monoklonalem anti-APRIL Antikörper, das zweite wurde ohne Antikörper (Negativkontrolle) mitgeführt. Zu 5×10^6 Thrombozyten wurden 10 μ l anti-APRIL (Sacha 2) monoklonaler Antikörper zugegeben und für 30 min. in einem CO₂-Inkubator bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Thrombozyten 2 Mal mit 1 ml PBS/BSA (PBS + 0,5% BSA) gewaschen und anschließend in 100 μ l PBS/BSA resuspendiert. 200 μ l FITC-konjugierte anti-Rat IgG Antikörper (10 μ g/mL, Alexis, Biochemicals) wurden dann den Ansätzen zugegeben und für 30 min. bei RT inkubiert. Schließlich wurden die Thrombozyten 2 Mal gewaschen. Nach dem letzten Waschvorgang wurden die Zellpellets in 300 μ l PBS resuspendiert und durchflusszytometrisch untersucht. Die Analyse der Expression von APRIL an der Oberfläche der Thrombozyten wurde am Durchflusszytometer FACS CANTO II (Becton Dickinson, Heidelberg) durchgeführt.

5.4.3.3 Durchflusszytometrische Untersuchung der Anbindung eines rekombinanten APRIL Proteins an Thrombozyten

Das hier verwendete Protokoll zur Untersuchung der Anbindung von MegaAPRIL an Zellen entspricht dem publizierten Verfahren von Hendriks et al 2005 [75]. Für jede Probe wurden 2 Röhrchen benötigt. Eins sollte mit APRIL inkubierten Thrombozyten enthalten, das zweite Röhrchen (Negativkontrolle) sollte ohne APRIL angesetzt werden. Pro Ansatz wurden 5×10^6 Thrombozyten in 100 μ l vom 0,5%igen PBS/BSA verwendet. Zu einem Röhrchen wurden 2 μ l (im Überschuss) MegaAPRIL (ALEXIS Biochemicals, Deutschland) mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml zugegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS/BSA 0,5% gewaschen (2000 U, RT für 7 Minuten, ohne Bremse), um freies APRIL aus dem Überstand zu entfernen. Die Thrombozytenpellets wurden in 100 μ l PBS/BSA 0,5% resuspendiert. Die Proben- und die Kontrollröhrchen wurden mit 50 μ l Anti-FLAG BioM2 (4 μ g/ml in TBS), für 30 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Waschschrift zweimal wiederholt. Nach dem Dekantieren

Material und Methoden

des Überstandes und der Resuspendierung des Thrombozytenpellets in 100 µl 0,5% PBS/BSA wurden alle Proben mit 40 µl (1mg/mL) Streptavidin-FITC (Sigma Aldrich, Deutschland), für 30 Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert. Erneut wurden die Thrombozyten zweimal gewaschen und dann mit 300 µl PBS/BSA 0,5% resuspendiert und unmittelbar durchflusszytometrisch mit dem Gerät FACScan analysiert.

5.4.3.4 Durchflusszytometrische Untersuchung zur Expression von BAFF-R, TACI und BCMA auf der Thrombozytenoberfläche.

Thrombozyten aus Thrombozytenkonzentrate von drei gesunden Spendern wurden auf die Expression der Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA durchflusszytometrisch untersucht. Etwa $2,5 \times 10^6$ Thrombozyten wurden mit je 2,5 µl Anti-BAFF-R (FITC), anti-TACI (PE) oder anti-BCMA (APC) für 30 min. bei RT in 0,1% PBS/BSA inkubiert. Anschließend wurde die immunologische Färbung durch die Zugabe von 500 µl PBS/BSA (0,1%) gestoppt. Die Proben wurden unmittelbar danach durchflusszytometrisch am Gerät FACS CANTO II untersucht. Als Negativkontrollen dienten FITC, PE und APC-konjugierte Isotypkontrollen.

5.4.3.5 Durchflusszytometrische Messungen

Die Messungen erfolgten entweder mit dem FACScan oder am FACSCanto II der Firma Becton Dickinson. Die Steuerung der Geräte erfolgte entweder mit CellQuest TM Pro oder dem FACS Diva Programm. Die Forward und Sideward Scatter wurden auf logarithmisch eingestellt, um die relativen kleinen Thrombozyten im FSC/SSC DotPlot zu visualisieren. Die Plättchenpopulation wurde gegattet und für die weiteren Messungen von den Leukozytenpopulationen sowie Zellfragmenten abgegrenzt. Es wurde 10,000 Ereignissen pro Messung aufgezeichnet. Die Ergebnisse wurden nach jeder Session exportiert.

5.4.3.6 FACS Auswertung mit FlowJo und Flowing Software

Das Vorgehen zur FACS Auswertung ist in Abbildung 10 dargestellt. Als erstes wurden die Ergebnisse im FSC/SSC DotPlot dargestellt und die

Material und Methoden

Thrombozytenpopulation gegattet. Im Anschluss wurden nur die thrombozytenspezifischen Fluoreszenzsignale im Histogramm angezeigt. Ein Diskriminator (Gate) wurde in einer Weise festgesetzt, sodass ca. 1% der Negativkontrollen positiv war. Jegliche Änderungen können somit exakt festgestellt werden. Dieses Prinzip ist identisch für die FlowJo Software (TreeStar, USA) und der Software „The Flowing Software“ (Version 2.4.1) der Universität für Biotechnologie Turku (Finnland), auch wenn sich die Handhabung der beiden Programme leicht unterscheidet. Die prozentualen Werte lassen sich tabellarisch nach Excel exportieren und somit leicht für eine statistische Auswertung in der GraphPad Prism Software integrieren.

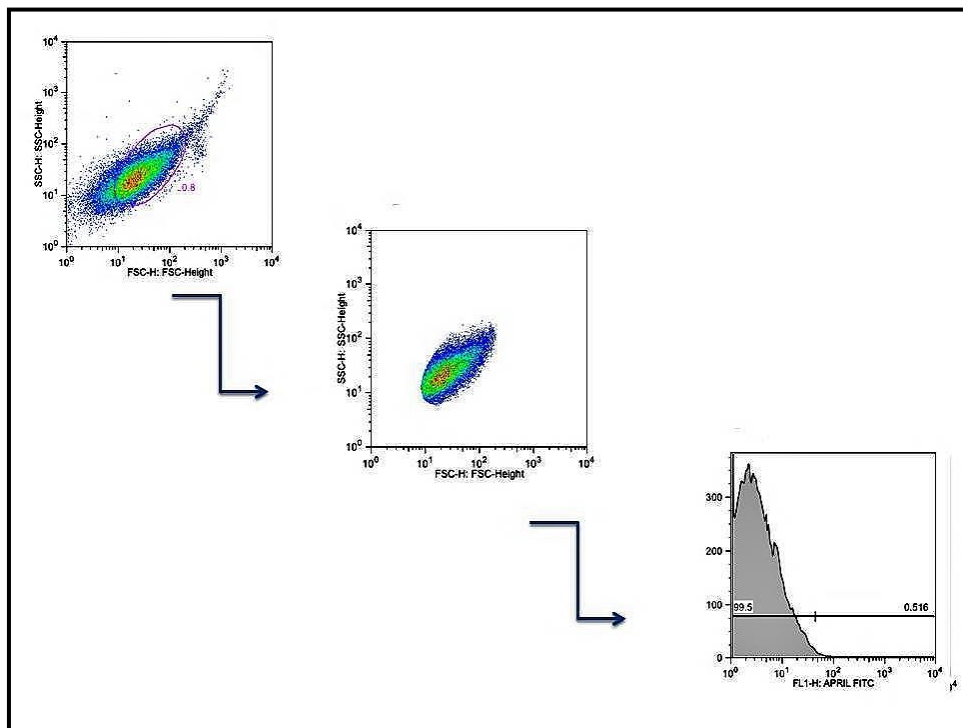


Abbildung 10: Übersicht der Gatingstrategie zur durchflusszytometrischen Analyse von Thrombozyten

5.4.4 Statistische Auswertungen

Die ermittelten Werte aus dem ELISA Suchtest, der Genexpressionsanalyse oder den Durchflusszytometrischen Messungen wurden für die statistische Auswertung zunächst in MS Excel exportiert. Diese Daten wurden dann je Fragestellung in die GraphPad Prism Software-Version 5.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) importiert. Da ITP-Patienten eine stark heterogene Gruppe darstellen und die untersuchten Parameter nicht einer Gaußschen Verteilungskurve entsprachen,

Material und Methoden

wurden nicht-parametrische Tests durchgeführt. Für den Vergleich zwischen zwei voneinander unabhängigen Stichproben wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet und für den gepaarten Vergleich kam der Wilcoxon matched T-Test zur Anwendung. Für den Vergleich zwischen 3 Stichproben oder mehr wurde der Kruskal-Wallis ANOVA Test genutzt. Bei Korrelationsberechnungen wurde der Spearman Korrelationstest für die Daten, die aus verteilungsfreien Gruppen stammten, bestimmt. Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Genauigkeit der statistischen Analysen wurde von den Fachleuten des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie an der Charité Campus Mitte geprüft und bestätigt.

Ergebnisse

6 Ergebnisse

6.1 Quantifizierung der APRIL-Serumkonzentrationen

6.1.1 Serumkonzentration von APRIL bei ITP-Patienten und Kontrollen

Die APRIL-Konzentrationen in den Seren der gesamten untersuchten Patienten lag bei einem Mittelwert von 13,76 ng/ml und einem Median von 8,525 ng/ml. Im Vergleich zu den Gesunden lag der Mittelwert bei 5,12 ng/ml und der Median bei 5,35 ng/ml. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte ermittelt werden ($p = 0,0057$) (Abb. 11).

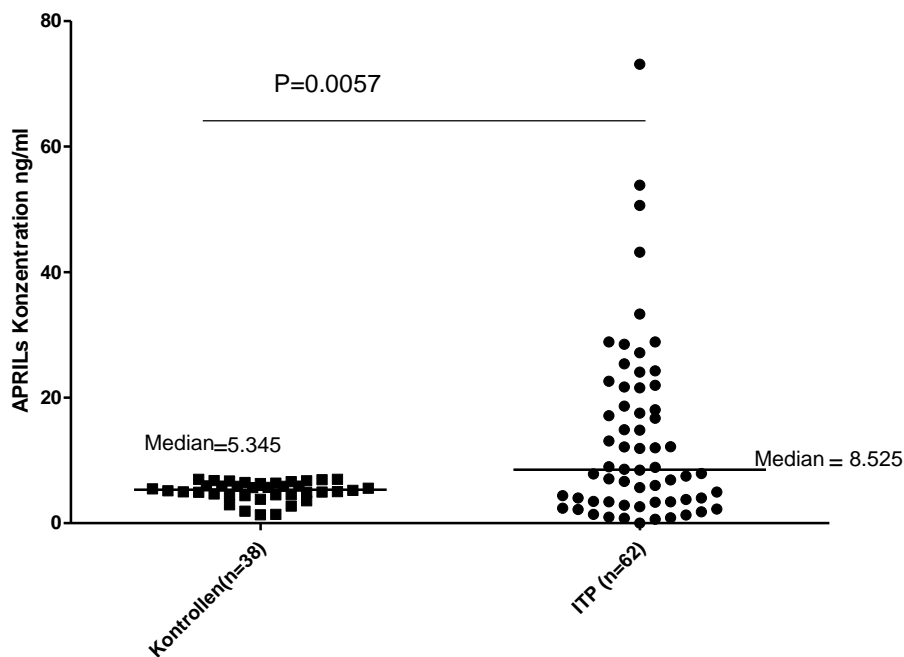


Abbildung 11: Vergleich der APRIL-Serumkonzentration aller ITP-Patienten mit den gesunden Kontrollen

Wie aus der Abbildung 11 zu erkennen ist, unterscheiden sich die ITP-Patienten hinsichtlich der APRIL-Konzentration relativ stark. Einige ITP-Patienten wiesen APRIL-Konzentrationen auf, die mit derjenigen der Kontrollgruppe vergleichbar sind, wobei ein anderer Teil der Patienten deutlich erhöhte APRIL-Konzentrationen zeigten. Dies könnte z.B. durch die Heterogenität der ITP selbst, durch die Vermischung von primärer und sekundärer ITP, durch unterschiedliche Krankheitsaktivitäten (aktiv, Remission) und/oder durch den Einfluss der immunsupprimierenden Therapie erklärt werden. Alle diese möglichen Einflussfaktoren werden nachfolgend gezielt untersucht.

Ergebnisse

6.1.2 Differenzierung zwischen Patienten mit primärer und sekundärer ITP im Vergleich zu Gesunden

Bei Patienten mit primärer ITP lag die Konzentration von APRIL zwischen 0,88 ng/ml und 73,12 ng/ml (Mittelwert von 15,86 ng/ml, Median von 10,52 ng/ml) und war deutlich höher als bei der Kontrollgruppe, dessen APRIL-Spiegel zwischen 1,340 ng/ml und 7,010 ng/ml (Mittelwert von 5,117 ng/ml und Median von 5,345 ng/ml) lag. Ein signifikanter Unterschied konnte zwischen primären ITP-Patienten und den Kontrollen festgestellt werden ($p = 0,0003$) (Abb. 12).

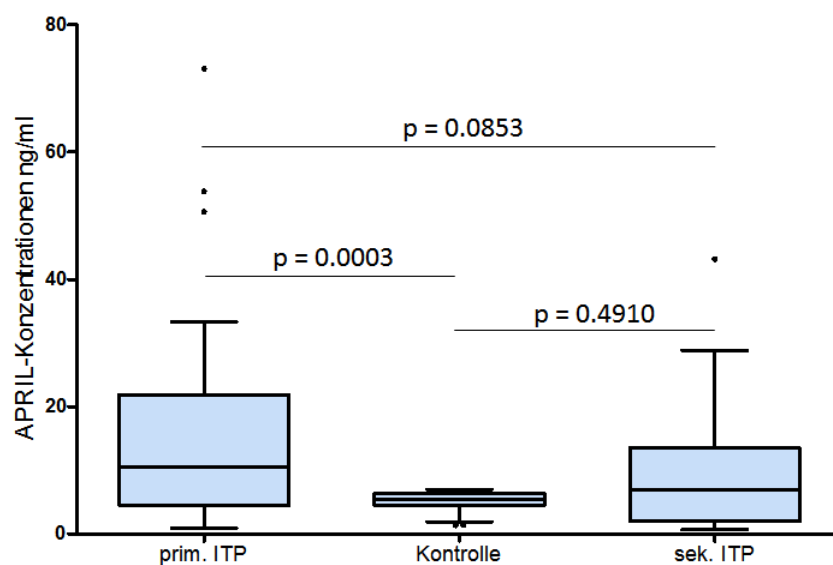


Abbildung 12: Differenzierung zwischen primären und sekundären ITP-Patienten
Angegeben wurden Mittelwerte und die Standardabweichungen.

Bei Patienten mit sekundärer ITP lag die Konzentration von APRIL zwischen 0,62 und 43,15 ng/ml (Mittelwert = 10,43 ng/ml, Median = 6,90 ng/ml). Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte keinen signifikanten Unterschied festgestellt werden ($p = 0,4910$). Der direkte Vergleich zwischen den APRIL-Konzentrationen zwischen primären und sekundären ITP-Patienten lieferte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,0853$). Folgende Tabelle fasst die Distribution der Konzentrationen von APRIL und deren Prävalenz der untersuchten Probanden zusammen.

Ergebnisse

Tabelle 7: Distribution der Konzentrationen von APRIL und deren Prävalenz der untersuchten Probanden

Gruppe	APRIL-Konzentration (ng/ml)			p - Wert
	0 – 10 ng/ml	10 – 20 ng/ml	> 20 ng/ml	
Kontrollen (n = 38)	n = 38 (100%)	-	-	-
Prim. ITP (n = 40)	n = 21 (52.5%)	n = 8 (20.00%)	n = 11 (27.5%)	p = 0.0003
Sek. ITP (n = 22)	n = 14 (63.63%)	n = 4 (18.18%)	n = 4 (18.18%)	p = 0.4910

Wie aus der Tabelle 7 zu entnehmen ist, wiesen 100% der Kontrollen eine APRIL-Konzentration zwischen 0 – 10 ng/mL auf. Knapp 63% der sekundären, aber nur ca. 50% der primären ITP-Patienten lagen in diesem Normalbereich. Somit wiesen 47,5% der primären ITP-Patienten, aber nur 31% der Patienten mit sekundärer ITP erhöhte APRIL-Serumkonzentration auf. Insgesamt zeigten 11 (27,5%) der primären ITP-Patienten aber nur 4 (18,18%) der sekundären ITP-Patienten stark erhöhte APRIL-Konzentrationen an (> 20 ng/ml).

Ergebnisse

6.1.3 Korrelation der APRIL-Konzentration mit der Thrombozytenzahl

Patienten wurden anhand ihrer Thrombozytenzahl in die drei Gruppen [$< 50 \times 10^3 / \mu\text{l}$], [$50 \times 10^3 - 100 \times 10^3 / \mu\text{l}$] und [$> 100 \times 10^3 / \mu\text{l}$] gegliedert (Abb. 13).

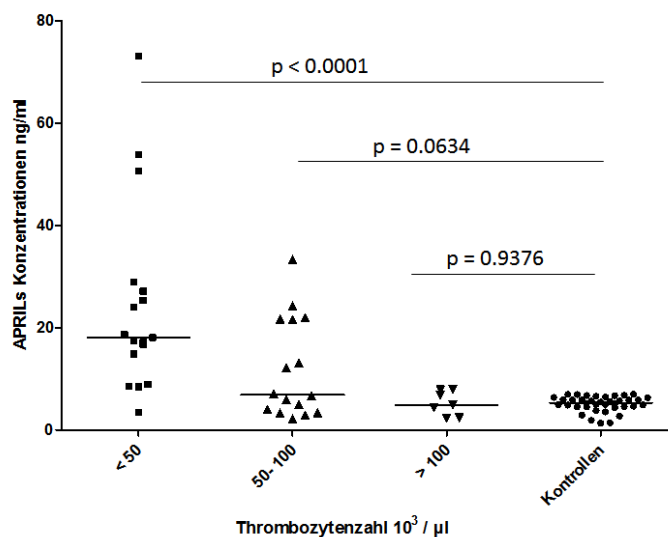


Abbildung 13: Zusammenhang zwischen den APRIL Serumspiegeln und den Thrombozytenzahlen
Angegeben wurden die Medianen.

Bei Patienten mit den niedrigsten Thrombozytenzahlen ($< 50 \times 10^3 / \mu\text{l}$) konnten die höchsten APRIL-Konzentrationen gemessen werden, wobei Patienten mit hohen Thrombozytenzahlen ($> 100 \times 10^3 / \mu\text{l}$) das geringste APRIL-Seumniveau aufwiesen. Dreizehn von 17 Patienten (76,47%) mit Thrombozytenzahlen $< 50,000 / \mu\text{l}$ zeigen eine Konzentration von APRIL $> 10 \text{ ng/ml}$. Der direkte Vergleich bestätigte einen statistisch signifikanten Unterschied (ANOVA $p < 0,0001$). Bei Patienten mit Thrombozytenzahl zwischen $50 - 100 \times 10^3 / \mu\text{l}$ hatten nur noch 7 von 16 Patienten (43,75%) eine erhöhte Konzentration von APRIL ($> 10 \text{ ng/ml}$) und ist nicht mehr statistisch signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe ($p = 0,0634$). Bei Patienten mit einer Thrombozytenzahl größer $100 \times 10^3 / \mu\text{l}$ gab es keinen Unterschied zu den Kontrollen ($p = 0,9376$).

Übereinstimmend dazu konnte mit Hilfe des Spearman-Korrelationstest eine starke negative Korrelation der APRIL-Konzentration mit der Thrombozytenzahl festgestellt werden (Spearman $R = -0,49$, $p = 0,0013$). (Abb. 14). Somit korrelierte die APRIL-Konzentration mit der Krankheitsaktivität.

Ergebnisse

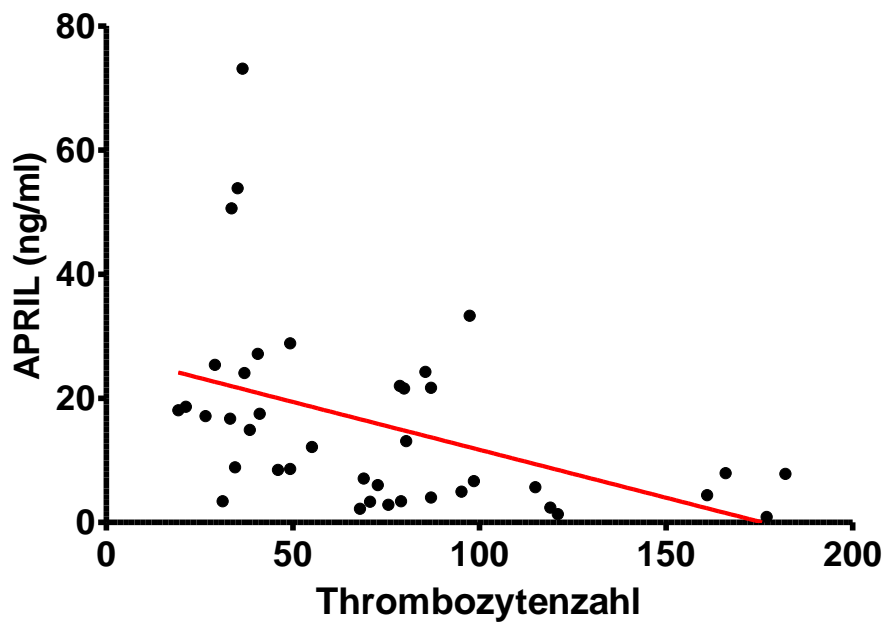


Abbildung 14: Korrelation der APRIL-Konzentrationen mit den Thrombozytenzahlen

Ergebnisse

6.1.4 Der Einfluss der Therapie auf die APRIL-Konzentration

Insgesamt wurden 25 der ITP-Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung mit Immunsuppressiva therapiert. Sechzehn Patienten erhielten vor bzw. während dem Untersuchungszeitpunkt keine spezifische Behandlung für die ITP. Obwohl der Median der behandelten Patienten (8,52 ng/ml) weit unter dem Median der unbehandelten Patienten (15,82 ng/ml) lag, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen festgestellt werden ($p = 0,3865$) (Abb. 15). Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Patienten im Vergleich zu den Gesunden konnte jedoch nachgewiesen werden ($p = 0,0106$ und $p = 0,0006$).

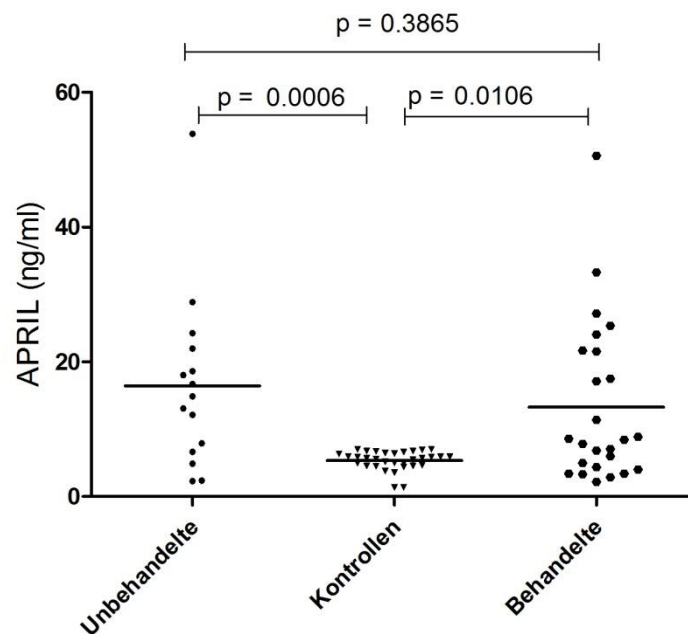


Abbildung 15: Einfluss der Therapie auf die APRIL Konzentrationen
Angegeben wurden die Medianen.

Unterteilt wurden die behandelten Patienten ($n = 25$) hinsichtlich ihrer Ansprechbarkeit auf die Therapie. Als Schwellenwert wurde eine Thrombozytenzahl von $>50 \times 10^3 / \mu\text{l}$ angenommen. Patienten die auf die Therapie ansprachen ($n = 15$) hatten signifikant niedrigere APRIL-Konzentrationen im Vergleich zu den Patienten ($n = 10$), deren Thrombozytenzahlen trotz der Behandlung unter $50 \times 10^3 / \mu\text{l}$ lagen ($p = 0,0198$) (Abb. 16). Dies deutet darauf hin, dass die Therapiewirksamkeit u.a. durch ihren Einfluss auf APRIL bedingt sein könnte.

Ergebnisse

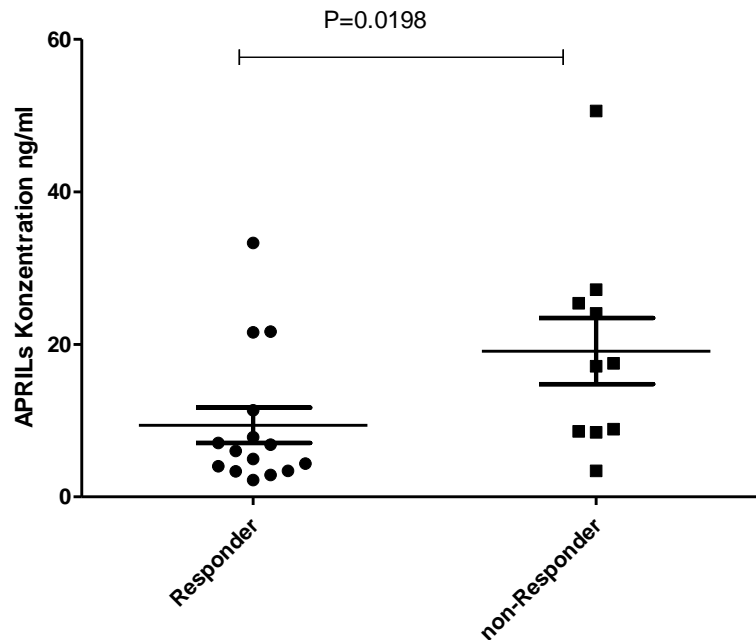


Abbildung 16: Zusammenhang der Therapiewirksamkeit mit dem APRIL Serumspiegel
Angegeben wurden die Mittelwerte mit den Standardabweichungen.

Prednisolon wurde neben Dexamethason und Azathioprin am häufigsten bei primären ITP-Patienten verabreicht. Knapp die Hälfte der Patienten, die mit Prednisolon behandelt wurden, bekamen zusätzlich Calcilac Kautabletten. Calcilac ist eine Kombination aus Calciumcarbonat und Colecalciferol (Vitamin D). Als interessanter Nebenbefund dieser Forschungsarbeit konnte herausgefunden werden, dass Patienten, die allein mit Prednisolon therapiert wurden, keine verminderten APRIL-Serumniveaus aufwiesen ($p = 0,4155$). Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte jedoch unter den Prednisolon-therapierten Patienten festgestellt werden, die zusätzlich Calcilac eingenommen haben ($p = 0,0482$) (Abb. 17).

Ergebnisse

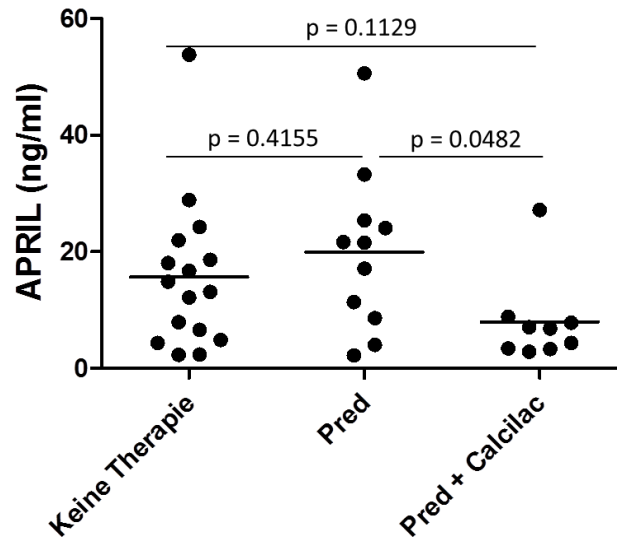


Abbildung 17: Differenzierung der Therapie bei primären ITP-Patienten
Angegeben wurden die Mediane.

Ergebnisse

6.1.5 Geschlechtsspezifische Unterschiede der APRIL-Konzentration

Da mehr Frauen als Männer von einer ITP betroffen sind, wurden die APRIL-Konzentrationen von weiblichen (n = 22) und männlichen (n = 16) ITP-Patienten miteinander verglichen. Dabei wurden nur primäre ITP-Patienten einbezogen. Wie aus der Abbildung 18 zu erkennen ist, wiesen weibliche ITP-Patienten im Mittel höhere APRIL-Konzentrationen auf als männliche ITP-Patienten (Mittel $17,79 \pm 3,11$ ng/mL vs. $9,15 \pm 1,56$ ng/mL). Da bei diesen Gruppen nicht von einer gleichen Varianz ausgegangen werden kann, wurde der ungepaarte T-Test mit einer Welch-Korrektur durchgeführt. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte auf diese Weise festgestellt werden ($p = 0,0189$).

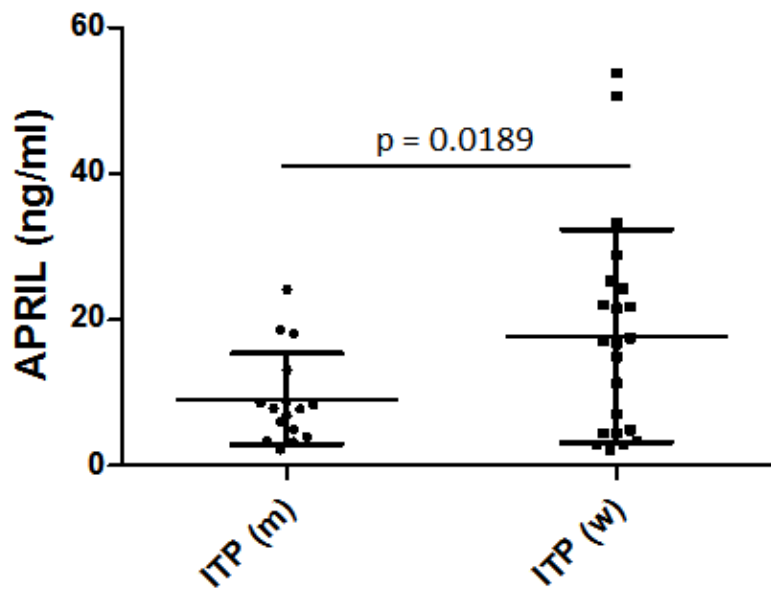


Abbildung 18: Differenzierung nach dem Geschlecht
Angegeben wurden Mittelwerte mit den Standardabweichungen.

Ergebnisse

6.2 Genexpressionen von BAFF und APRIL in PBMCs

Mit Hilfe der Echtzeit-PCR wurden die Genexpressionsprofile von BAFF und APRIL von 54 ITP-Patienten (36 mit aktiver ITP, 18 in Remission) und 18 Kontrollen untersucht. Durch die delta delta Ct-Methode wurden die relativen Expressionen der einzelnen Proben mit dem jeweiligen Expressionslevel des Housekeeping Gen (β -Actin) normalisiert, was einen besseren Vergleich der ITP-Patienten mit den Gesunden erlaubt.

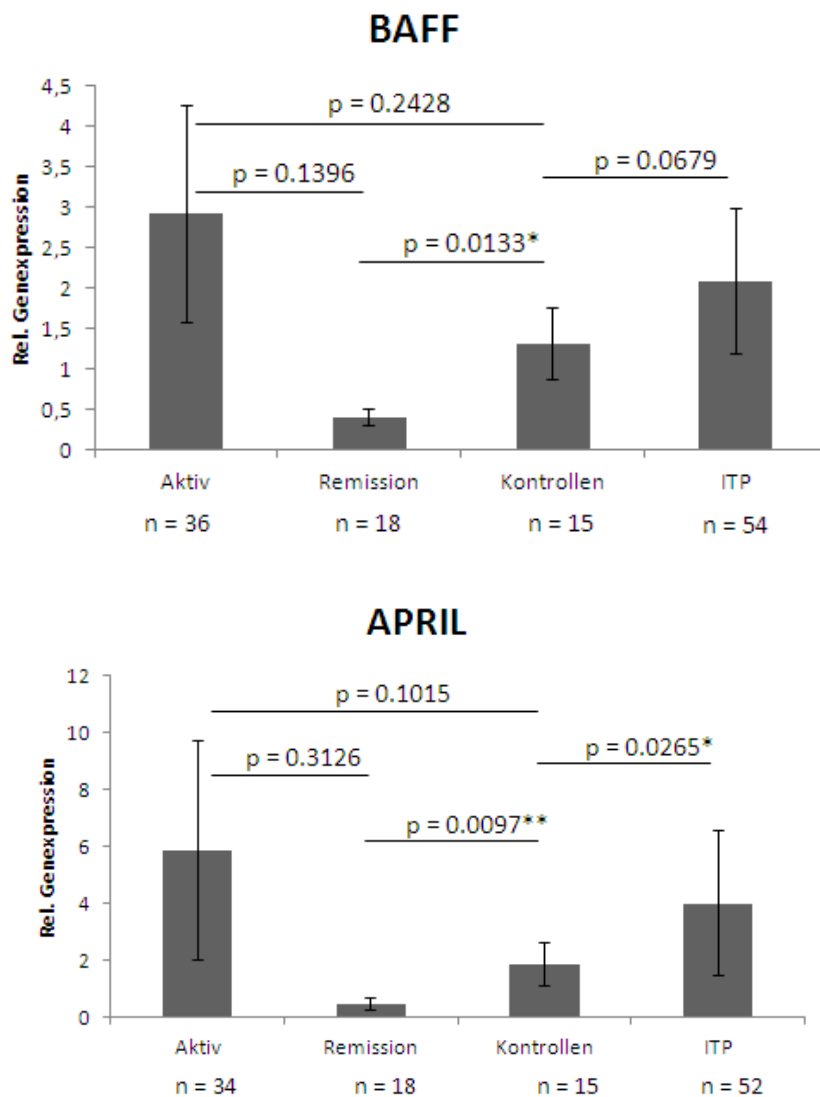


Abbildung 19: Vergleich der relativen Genexpressionen von BAFF und APRIL zwischen ITP-Patienten und Kontrollen.
Angabe wurden die Mittelwerte und den Standardabweichungen.

Ergebnisse

Wie aus der Abbildung 19 zu erkennen ist, konnte ein signifikanter Unterschied zwischen ITP-Patienten und Gesunden nur bei APRIL festgestellt werden ($p = 0,0265$). Eine Subkategorisierung der ITP-Patienten in aktive ITP und Remission ergab, dass sowie BAFF als auch APRIL bei Patienten in der Remission im Vergleich zu den Kontrollen deutlich runter-reguliert waren ($p = 0,0133$ und $p = 0,0097$). Patienten mit aktiver ITP eine zeigten höhere Genexpression beider Zytokine im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen konnte weder bei APRIL noch bei BAFF festgestellt werden. Eine schwache negative Korrelation der Genexpression mit der Thrombozytenzahl konnte nur bei BAFF festgestellt werden (Spearman $R = -0,2669$, $p = 0,0583$).

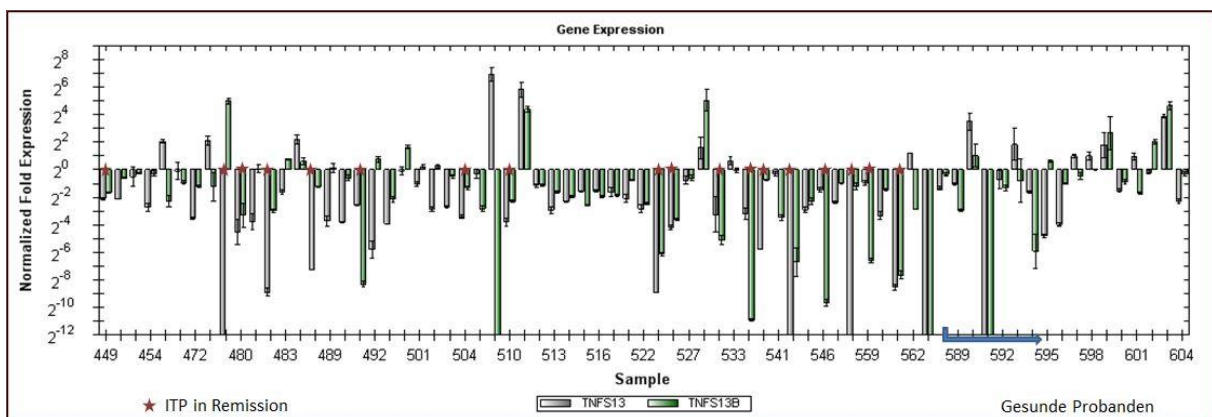


Abbildung 20: Relative Quantifizierung der Genexpressionen von BAFF (TNFS13B) und APRIL (TNFS13) nach der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode

Angegeben sind die Mittelwerte (MW) der relativen Genexpression von BAFF (grau) und APRIL (grün). Die Standardabweichung (SD) wurde als Fehlerbalken dargestellt. Proben mit den Identifizierungsnummern zwischen 449 und 586 sind ITP-Patienten. Proben mit den Identifizierungsnummern von 587 bis 604 sind Gesunde. Remissionsfälle der ITP wurden mit Sternchen bezeichnet. Interessant ist die Tatsache, dass die APRIL- und BAFF-Expression in der Regel gleichermaßen entweder hoch- oder runterreguliert sind, wobei z.T. auch eine reziproke Expression beobachtet werden konnte.

Wie aus der Abbildung 20 zu erkennen ist, lagen die BAFF- und APRIL-Genexpressionen in der Regel gemeinsam entweder hoch- oder runterreguliert vor. Besonders bei den Remissionsfällen der ITP waren beide Zytokine runterreguliert. Allerdings gab es vereinzelt Individuen, die eine reziproke Genexpression von BAFF und APRIL zeigten.

Ergebnisse

6.3 Durchflusszytometrische Analysen

6.3.1 Identifizierung der Thrombozytenpopulation

Immunphänotypisch sind die Thrombozyten mit der Positivität beider Oberflächemerkmale CD41 und CD61 gekennzeichnet. Nach Isolierung der Thrombozyten aus der Blutprobe, wurden sie mit monoklonalen Antikörpern CD41-PE, CD61-PerCP gefärbt. Dadurch lässt sich der Reinheitsgrad der Thrombozyten mittels FACS prüfen.

(Abb. 21).

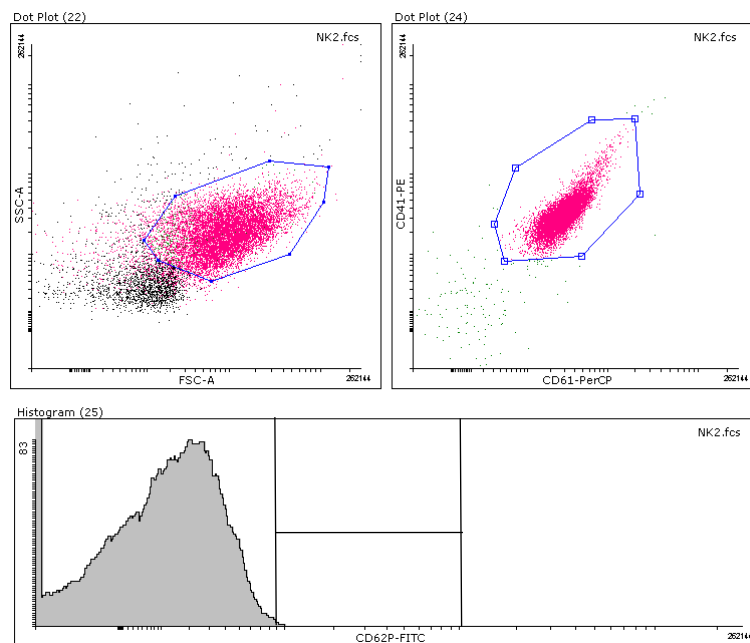


Abbildung 21: Exemplarische Darstellung CD41-PE, CD61-PerCP, IgG-FITC markierter Thrombozyten sowie deren Bestimmung der Voraktivierung mit Hilfe von CD62P.

Die Abbildung 21 zeigt einen Ansatz der Thrombozyten mit monoklonalem Antikörper gegen CD41-PE und CD61-PerCP sowie mit dem IgG-FITC Antikörper ohne Zugabe von CD62P-FITC an. Wie aus der Abbildung zu erkennen ist (oben links), konnte die Thrombozytenpopulation auf Grund von Größe und Granularität als eine Population von anderen Partikeln mit Hilfe eines Gates abgegrenzt werden. Als Nachweis, dass es sich dabei auch wirklich um Thrombozyten handelte, wurde diese Population auf die Thrombozyten-spezifischen Marker CD41 und CD61 überprüft (oben rechts). Das Histogramm stellt eine Negativkontrolle der CD62P-Expression dar (unten).

Ergebnisse

6.3.2 Bestimmung der spontanen Thrombozyten-Voraktivierung

Die Isolierungsverfahren der Thrombozyten mögen zu ihrer spontanen Stimulation führen, die durch die Expression vom Aktivierungsmarker CD62P (P-Selectin) auf der Thrombozytenoberfläche gekennzeichnet ist. Mit dem Ansatz von monoklonalem CD62P-FITC Antikörper und mit Hilfe der Durchflußzytometrie wurde die Voraktivierung der isolierten Thrombozyten bestimmt. (Abb. 22).

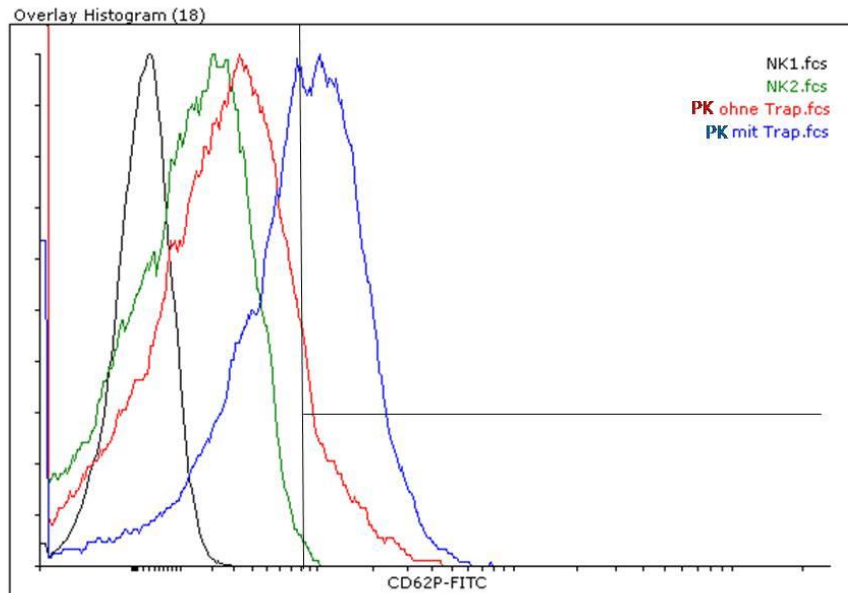


Abbildung 22: Exemplarische Darstellung zur Bestimmung der Expression des Aktivierungsmarkers CD62P im Overlay-Histogramm

Schwarze Linie: erste Negativkontrolle, grüne Linie: zweite Negativkontrolle, rote Linie: Positivkontrolle ohne Zugabe von TRAP-6, blaue Linie: Positivkontrolle mit Zugabe von TRAP-6.

In der Abbildung 22 wurden Histogramme verschiedener Ansätze als Overlay Histogramm dargestellt. Alle Ansätze waren mit CD41-PE und CD61-PerCP gefärbt. Die zweite Negativkontrolle (NK2) enthielt im Vergleich zur ersten Negativkontrolle (NK1) zusätzlich die FITC-konjugierte monoklonale Maus-IgG1 Antikörper (Isotypkontrolle), um eine unspezifische Anbindung der verwendeten Antikörper an humane Thrombozyten zu bestimmen. Das Gate wurde anhand dieses Ansatzes auf 1% gesetzt (grüne Linie). Bei der ersten Positivkontrolle (PK ohne TRAP-6) wurden die Thrombozyten mit Anti-CD62P-FITC Antikörper inkubiert. Dieser Ansatz (ohne TRAP-6) diente der Identifizierung der spontanen Thrombozyten-Voraktivierung nach dem Isolierungsprozess. Die spontane Voraktivierung betrug in diesem Beispiel

Ergebnisse

11.91% (rote Linie). Bei der zweiten Positivkontrolle (PK mit TRAP-6) wurden die Thrombozyten zusätzlich zu dem Anti-CD62P-FITC Antikörper mit TRAP-6 (engl. Thrombin receptor-activating peptide-6) behandelt. TRAP-6 bindet direkt an den Thrombin-Rezeptor Protease-Aktivierung-Rezeptor-1 und führt zur starken Thrombozytenaktivierung. Dieser Ansatz mit TRAP-6 sollte veranschaulichen, dass die Thrombozyten zum einen noch funktional aktiv waren und weiter aktiviert werden können. Der Aktivierungsgrad mit TRAP-6 behandelter Thrombozyten lag bei 59,10%.

6.3.3 Nachweis der basalen Bindung von APRIL auf der Thrombozytenoberfläche

Neun gesunde Probanden und Elf Patienten, davon acht mit aktiver Thrombozytopenie, wurden bei dieser Untersuchung eingeschlossen. Bei den ausgewählten Patienten konnte zu einem früheren Zeitpunkt mittels ELISA bereits eine erhöhte APRIL Serumkonzentration erwiesen werden. Sowie bei Patienten als auch bei Gesunden konnte eine basale Bindung von APRIL auf der Thrombozytenoberfläche nachgewiesen werden (Abb. 23 und Abb. 24).

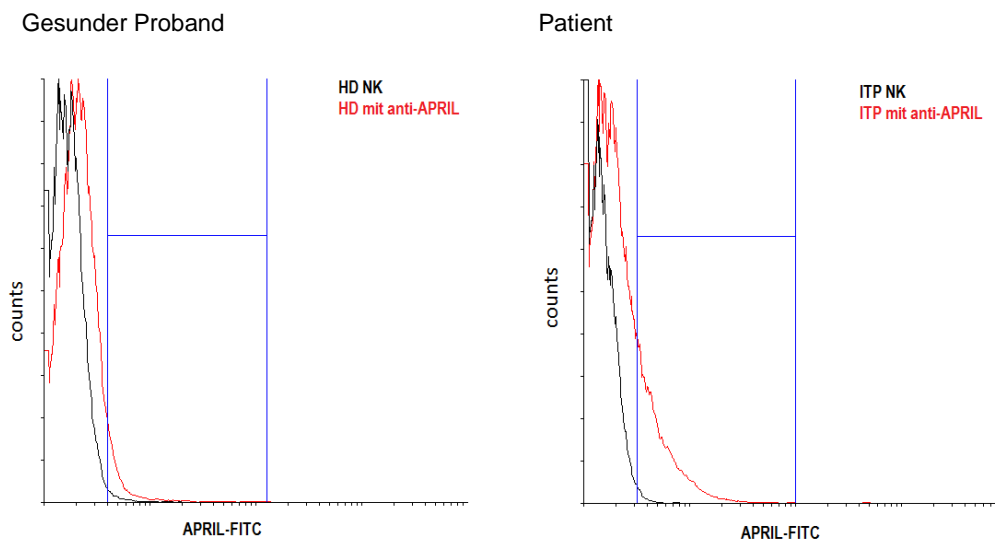


Abbildung 23: Exemplarische Darstellung der basalen Bindung von APRIL

Zunächst wurde bei Gesund- und Patienten die Thromozyten mit anti-APRIL Antikörper (Sacha 2) inkubiert. Danach wurden allen Ansätzen einschließlich der Negativkontrollen der FITC-konjugierter Ratte-IgG Antikörper zugegeben. Im Anschluss wurde die basale Bindung von APRIL mittels FACS analysiert. Linkes Histogramm stellt den Ansatz eines gesunden Probanden (engl. healthy Donor) dar. Rechtes Histogramm zeigt den Ansatz eines Patienten an. Die rote Linie stellt die Probe des Gesundes oder der Patienten dar. Die entsprechenden Negativkontrollen wurden als schwarze Linien angegeben.

Ergebnisse

Um die Daten zu normalisieren, wurden alle Kontrollen (Thrombozyten ohne Anti-APRIL) auf 1% gesetzt und über die bereits gebildeten Differenzen wurden die normalisierten %-Werte der APRIL basalen Anbindung berechnet. Der gepaarte, nicht-parametrischer Test (Wilcoxon matched T-Test) wurde angewendet, um die basale APRIL-Bindung (Thrombozyten ohne vs. mit anti-APRIL) der beiden Gruppen mit einander statistisch zu vergleichen. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte sowohl bei Patienten als auch bei Gesunden festgestellt werden ($p = 0,0020$ und $p = 0,078$). Kein statistisch signifikanter Unterschied der basalen APRIL-Bindung zwischen den Patienten und den Gesunden war zu finden. ($p = 0,0947$) (Abb. 24).

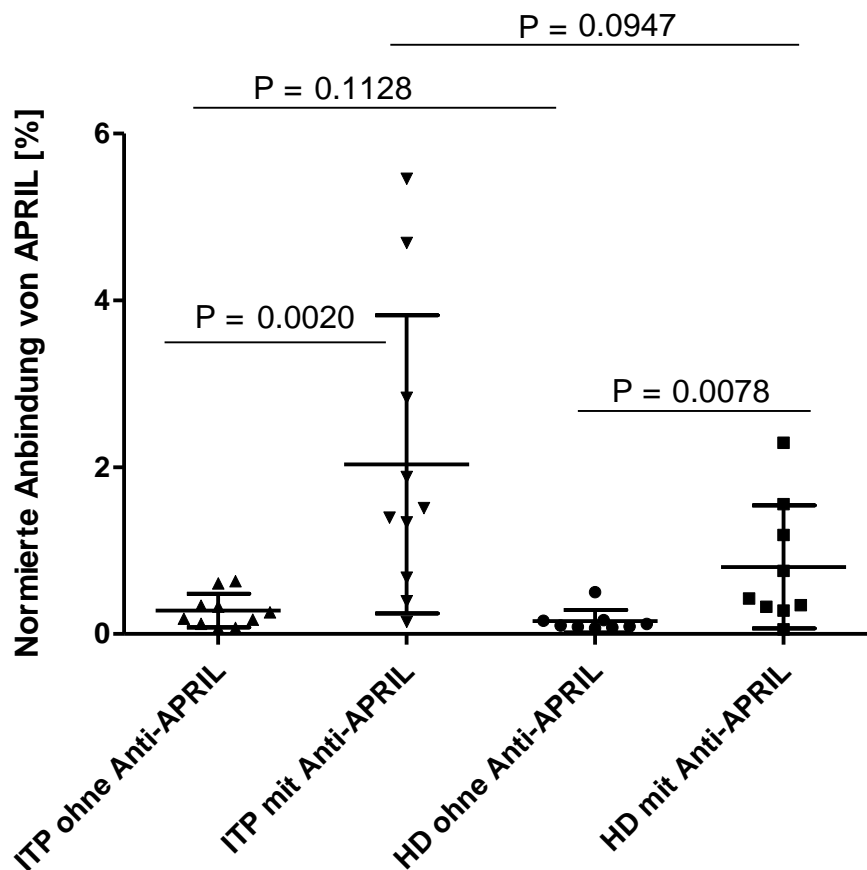


Abbildung 24: Normalisierte basale Bindung von APRIL an humane Thrombozyten

Sowohl bei den ITP-Patienten als auch bei den Gesunden (HD: healthy Donors) konnte eine basale APRIL-Anbindung an den Thrombozyten mit Hilfe der Anti-APRIL Antikörper nachgewiesen werden. Angegeben wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen.

Ergebnisse

6.3.4 Untersuchung der Expression der Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA auf der Thrombozytenoberfläche

Um auszuschließen, dass die klassischen Rezeptoren BAFF-R, TACI und BCMA auf der Oberfläche von Thrombozyten vorhanden sind, wurden Thrombozyten aus Thrombozytenkonzentraten (n = 3) verwendet. Wie im Overlay Histogramm zu erkennen ist, konnte keine Bindung der anti-Rezeptor Antikörper im Vergleich zu den entsprechenden Isotypekontrollen festgestellt werden (Abb. 25). Bei BAFF-R bindet die Isotypekontrolle stärker an Thrombozyten als die anti-BAFF-R FITC konjugierten Antikörper.

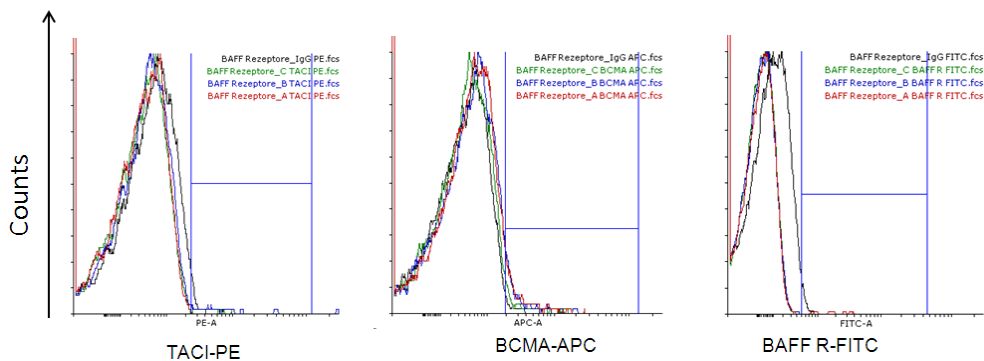


Abbildung 25: Fehlende Oberflächenexpression von BAFF-R, TACI und BCMA auf der Thrombozytenoberfläche

Ergebnisse

6.3.5 Bindung von rekombinanten APRIL an Thrombozyten

Die Bindung des rekombinanten APRIL an Thrombozyten war sowohl bei den Patienten als auch bei den gesunden Probanden nachweisbar. Die mit APRIL behandelten Thrombozyten zeigten ein deutlich stärkeres Fluoreszenzsignal im Vergleich zu den unbehandelten Thrombozyten (Abb. 26).

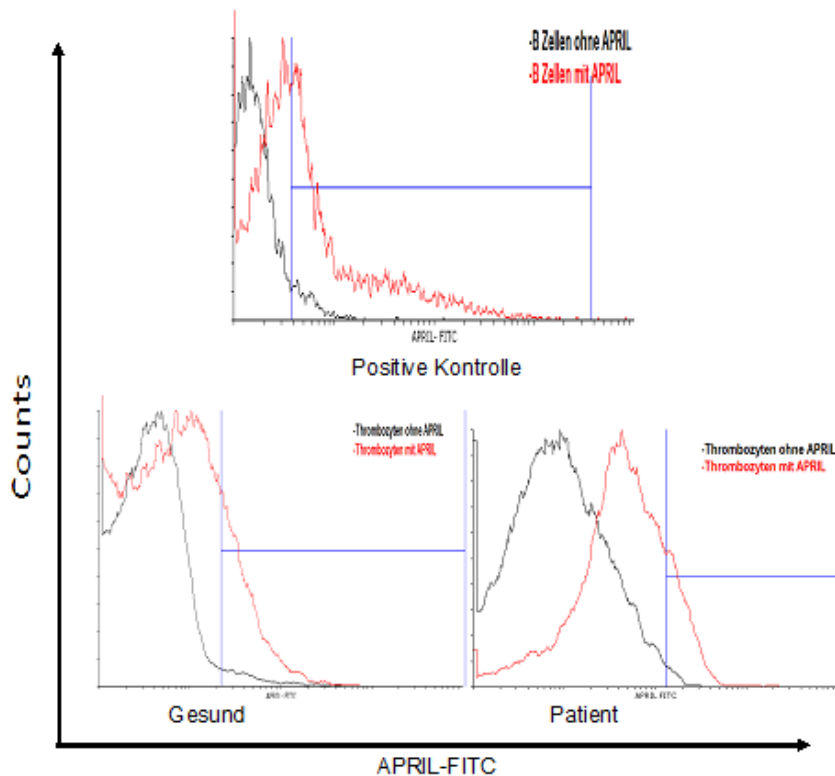


Abbildung 26: Exemplarische Darstellung von APRIL-Bindung an die Thrombozyten im Overlay-Histogramm.

Durchflusszytometrisch wurde nachgewiesen, dass rekombinanter APRIL sowie bei Gesunden als auch bei Patienten an Thrombozyten bindet. Als positive Kontrolle dienten B-Lymphozyten.

Der gepaarte nicht-parametrische Test wurde angewendet, um die APRIL-Bindung (Thrombozyten ohne vs. mit APRIL) der beiden Gruppen mit einander statistisch zu vergleichen. Ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$) konnte festgestellt werden; dieser deutet darauf hin, dass APRIL an Thrombozyten bindet (Abb. 27). Ein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Bindung von APRIL zwischen den Kontrollen und ITP-Patienten konnte nicht festgestellt werden ($p = 0,1986$).

Ergebnisse

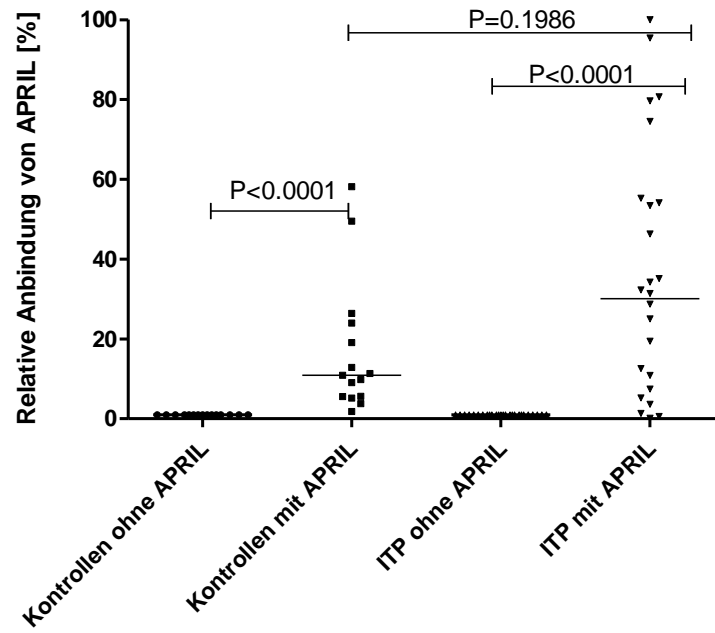


Abbildung 27: Normalisierte Bindung von APRIL an Thrombozyten.
Angegeben wurden die Mediane.

Diskussion

7 Diskussion

Eine funktionierende interzelluläre Kommunikation ist für die Aufrechterhaltung des Immunsystems von höchster Bedeutung [96]. Diese erfolgt primär durch Zytokine. Zytokine lassen sich in Interferone (INF), Interleukine (IL), Kolonie Stimulierende Faktoren (CSFs), Tumornekrosefaktoren (TNF), Chemokine und in Zytokinrezeptoren unterteilen. Sie werden von einer Vielzahl von Zellen gebildet und in die extrazelluläre Matrix entlassen. Eine Störung der interzellulären Kommunikation kann zu Autoimmunerkrankungen führen [97, 98]. Da sich autoreaktive B- und T-Zellen auch bei gesunden Individuen nachweisen lassen, besteht die Möglichkeit zur Reaktivität gegen körpereigene Strukturen in jedem normalen Individuum [26]. Offenbar wird dort jedoch die Immunreaktion gegen Autoantigene überwiegend durch periphere Toleranzmechanismen unterdrückt. Warum es bei ITP zum Verlust der Toleranz und somit zur Immunantwort gegen körpereigenen Strukturen kommt, ist bislang unbekannt. Man geht jedoch davon aus, dass die Toleranzmechanismen u.a. über Zytokine reguliert werden [27].

Der Zusammenhang von Zytokinen in der Immunantwort wurde bereits unter Punkt 3.2 in der Einleitung beschrieben. Zu erwähnen sei, dass Thrombozyten viele Zytokine in ihren α -Granula speichern, die nach Aktivierung z.B. durch die Anbindung von IgG Molekülen (Autoantikörpern) in die Zirkulation entlassen werden [29]. Zu diesen Zytokinen zählen u.a. solche, die bekanntermaßen Makrophagen anlocken (Chemotaxis) und aktivieren und somit die Phagozytose IgG-beladener Thrombozyten fördern [30, 31]. Zytokine können jedoch nicht ausschließlich mit einem destruktiven Effekt assoziiert werden, sondern fördern z.B. die Thrombozytenneubildung sowie die Megakaryopoese. Zu diesen Faktoren zählen z.B. IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, Stammzellofaktor (SCF), Thrombopoietin (TPO), M-CSF und GM-CSF, wobei diese Zytokine bei ITP-Patienten zum Teil dysreguliert vorliegen [31]. Somit spielen Zytokine eine wesentliche Rolle in der Pathophysiologie der ITP, da sie die Thrombozytenbildung sowie den Thrombozytenabbau beeinflussen können. Die Rolle der Zytokine bei der ITP wurde auf Grund der hohen Komplexität bislang jedoch nicht vollständig aufgeklärt. Daher werden im Rahmen der Grundlagenforschungen immer nur einzelne Zytokine betrachtet und in den Kontext

Diskussion

der Pathophysiologie der jeweiligen Erkrankungen gesetzt, so wie es im Rahmen dieser Doktorarbeit erfolgte.

Als erfolgreiches Beispiel können hier die Ergebnisse einer Vorarbeit genannt werden, wo gezeigt werden konnte, dass das Zytokin BAFF (B-Zell-Aktivierungsfaktor, TNF-LSF13B) im Serum von ITP-Patienten im Vergleich zu Gesunden erhöht ist [36]. Es ist bekannt, dass eine übermäßige BAFF-Sekretion mit dem Überleben autoreaktiver B-Zellen korreliert und ebenfalls T-Zellen aktiviert und deren Überleben sichert [99, 100]. Auf diese Weise können erhöhte BAFF-Serumlevel zu einer Immundysregulation führen. Daher wurden spezifische BAFF-Antagonisten wie Belimumab (Lymphostat-B), TACI-IG (Atacicept), BR3-FC und AMG 623 entwickelt, die bereits bei dem systemischen Lupus Erythematoses (SLE) und der Rheumatischen Arthritis (RA) in klinischen Studien (Phase II) untersucht werden [101]. Eine klinische Studie (Phase II) läuft derzeit auch mit ITP-Patienten. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit sowie den Nutzen der Grundlagenforschungen zu einzelnen Zytokinen bei der ITP. Es ist möglich, dass noch eine Vielzahl weiterer Zytokine wie BAFF existieren, die bei der ITP ebenfalls dysreguliert vorliegen. Auch wenn APRIL ca. 50% Homologie mit BAFF besitzt [51], unterscheiden sich diese beiden Liganden in deren biologischen Funktionen teilweise stark voneinander. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher zunächst die APRIL-Konzentrationen in den Seren von ITP-Patienten (40 mit primärer- und 22 mit sekundärer ITP) bestimmt und mit gesunden Individuen (n = 38) verglichen.

Wir konnten zeigen, dass die APRIL-Serumkonzentrationen bei ITP-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht waren ($p = 0,0057$) (Abb. 11). Erhöhte Konzentration von APRIL wurde bereits in einer Reihe von Autoimmunerkrankungen festgestellt, wie dem systemischen Lupus Erythematoses (SLE), der Multiplen Sklerose (MS) und der rheumatischen Arthritis (RA) [102-104]. Um den Einfluss anderer Erkrankungen zu überprüfen, die mit einer Thrombozytopenie einhergehen, wurden alle Patienten (n = 62) in primäre (n = 40) und sekundäre (n = 22) ITP-Patienten unterteilt. Insgesamt hatten 12 Patienten eine Thrombozytopenie durch Evans Syndrom, wobei die anderen 10 Patienten an anderen Autoimmunerkrankungen wie SLE, AIHA und RA litten (Tabelle 3). Es konnte gezeigt

Diskussion

werden, dass vor allem primäre ITP-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen deutlich höhere APRIL-Konzentrationen im Serum aufwiesen ($p = 0,0003$), wobei kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollen und Patienten mit sekundärer ITP festgestellt werden konnte ($p = 0,4910$).

Da es sich dabei jedoch auch um Patienten mit Autoimmunerkrankungen handelte, wäre hier ebenfalls ein Unterschied bei den Patienten mit sekundärer ITP zu den Kontrollen zu erwarten gewesen. Das im Rahmen dieser Arbeit kein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden konnte, könnte durch die starke Heterogenität dieser Gruppe (Evans Syndrom, SLE, RA, VITP, AIHA), oder durch die etwas geringere Anzahl an untersuchten Proben ($n = 22$) begründet sein. Patienten mit RA und SLE machten nur einen kleinen Teil von etwa 12% der sekundären ITP-Patienten aus. Bei den restlichen Patienten handelte es sich primär um Patienten mit Evans Syndrom. Im Gegensatz zu RA und SLE ist eine Assoziation zwischen APRIL Serumlevel und Evans Syndrom bisher unbekannt. Unter den untersuchten Patienten mit Evans Syndrom waren nur die Hälfte thrombozytopenisch. Der APRIL-Serumspiegel dieser Gruppe zeigte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Kontrollen ($p = 0,2539$) oder dem Rest der Patienten, die nur an Hämolyse litten ($p = 0,5887$). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass APRIL-Serumspiegel bei Patienten mit Evans Syndrom offensichtlich nicht erhöht sind. Bislang wurden die APRIL-Serumlevel bei Patienten mit Evans Syndrom nicht untersucht.

Um festzustellen, ob die APRIL-Serumkonzentrationen durch die konventionellen Immunsuppressiva wie Dexamethason, Azathioprin und Prednisolon vermindert werden, wurden primäre ITP-Patienten in zwei Gruppen aufgeteilt. Der Vergleich zwischen behandelten Patienten ($n = 25$) mit unbehandelten Patienten ($n = 15$) ergab, dass beide Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte APRIL-Konzentrationen aufwiesen ($p = 0,0106$ und $p = 0,0006$), wobei ein Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Patienten nicht festgestellt werden konnte ($p = 0,3865$). Daraus schlossen wir entgegen unserer Erwartung, dass Immunsuppressiva den APRIL-Serumlevel nicht zu mindern vermögen. Aus diesem Grund wurden die behandelten Patienten in Abhängigkeit ihrer Thrombozytenzahl in Responder ($n = 15$) und Non-Responder ($n = 10$) unterteilt

Diskussion

(Abb. 16). Dabei wurde eine Thrombozytenzahl von $50 \times 10^3/\mu\text{l}$ als Schwellenwert für einen Therapieerfolg festgelegt. Auf diese Weise konnten wir feststellen, dass die APRIL-Serumkonzentrationen bei den Respondern im Vergleich zu den Non-Respondern durch den Einfluss von Behandlung signifikant vermindert werden ($p = 0,0198$). Das deutet auf einen direkten Zusammenhang zwischen der APRIL-Serumkonzentration und dem Therapieerfolg hin.

Das Zytokine bei der Multi-Drug Resistenz eine Rolle spielen, wurde in der Literatur bereits beschrieben [105 - 107]. APRIL wurde in diesem Zusammenhang jedoch nur in einer Arbeit erwähnt, bei der APRIL als prädiktiver Marker vorgeschlagen wurde, um Patienten mit kolorektalen Adenokarzinom zu identifizieren, die nicht von einer Chemo-Radiotherapie mit dem Adjuvant 5-Fluorouracil (5FU) profitieren würden [108]. Die Befunde unserer Arbeit legen ebenfalls nahe, dass die APRIL-Serumkonzentration behandelter ITP-Patienten ebenfalls Aussagen zur Therapierefraktärität zulassen könnten. Dadurch würde die Bestimmung von APRIL in der Zukunft eventuell eine diagnostische Relevanz erlangen, um auf diese Weise eine uneffektive Therapie mit Immunsuppressiva schnell zu erkennen und zugunsten anderer Therapieoptionen abgesetzt bzw. ersetzt werden.

Es ist bekannt, dass Frauen häufiger an einer ITP erkranken als Männer [10, 109, 110]. Aus diesem Grund wurden die APRIL-Konzentrationen von weiblichen ITP-Patienten mit männlichen ITP-Patienten verglichen. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte festgestellt werden, wobei weibliche gegenüber männlichen ITP-Patienten statistisch signifikant erhöhte APRIL-Konzentrationen aufwiesen ($p = 0,0189$). Das Geschlecht wird mit Unterschieden im klinischen Bild, der Ethologie, dem Krankheitsverlauf und dem Ausgang bestimmter Autoimmunerkrankungen assoziiert [111]. Die Rolle des Geschlechts bei der Entstehung der organspezifischen Autoimmunität wurde von Nussinovich in einem Review zusammengefasst [112]. Es ist bekannt, dass Frauen eine stärkere zelluläre und humorale Immunreaktion im Vergleich zu Männern aufweisen [113] und das Geschlechtshormone zumindest anteilig mitverantwortlich sind, dass Frauen eine höhere Anfälligkeit haben, an Autoimmunerkrankungen zu erkranken [114]. So wurde bereits gezeigt, dass Geschlechtshormonen (z.B. Östrogen) immunmodulierende Eigenschaften haben

Diskussion

und die angeborene sowie adaptive Immunzellen [115, 116], die Antigenpräsentation [115, 116], die Zytokinsekretion [111, 115, 117], die Bildung von Autoantikörpern [111] beeinflussen und letztlich in der Lage sind, autoreaktive B-Zellen zu stimulieren sowie zum Verlust der Immuntoleranz beitragen. [111]. Geschlechtsspezifische Unterschiede spielen in der Pathophysiologie der ITP offensichtlich eine gewisse Rolle.

Die Rolle des oxidativen Stresses im Autoimmunszenario ist bislang nicht vollständig aufgeklärt. Unter physiologischen Bedingungen werden reaktive Sauerstoffspezien (reactive oxygen species (ROS)) sowie reaktive Stickstoffspezien (reactive nitrogen species (RNS)) durch den zellulären Metabolismus generiert. Ein Ungleichgewicht von Bildung und Neutralisation freier Radikale wird als oxidativer Stress bezeichnet. Freie Radikale können die Entzündungsantwort beeinflussen sowie den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren [5, 6]. Somit können freie Radikale und darüber hinaus ein erhöhter oxidativer Stress in die Immunregulation eingreifen. In der Tat konnten bereits erste Hinweise auf eine Involvierung eines oxidativen Stresses bei der ITP erhoben werden. Diese beinhalten die oxidative Dysregulation von Neutrophilen [118], vermehrte Lipidperoxidationen [119], oxidative-stress assoziierte Signalwege bei der chronischen pädiatrischen ITP [120], eine verminderte Stickstoffmonoxid (NO) Bioverfügbarkeit [121] sowie eine verminderte antioxidative Kapazität in Thrombozyten von ITP-Patienten [122]. In einer laufenden Studie konnte ein erhöhter systemischer oxidativer Stress mit Hilfe eines Schnelltests bei ITP-Patienten festgestellt werden (unpublizierte Daten).

Interessant jedoch ist die Tatsache, dass BAFF durch oxidativen Stress hochreguliert wird, und mit Hilfe von Antioxidantien vermindert werden kann [123, 124]. Dies erfolgt durch die redox-regulation von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und AP-1, wodurch Zytokine, Wachstumsfaktoren und andere Proteine der extrazellulären Matrix reguliert werden können [125-127]. Es wäre daher möglich, dass APRIL ebenfalls wie BAFF, redox-reguliert ist. Einen Hinweis darauf, konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit möglicherweise erbracht werden. Patienten, die simultan zu Prednisolon mit Calcilac, einem Vitamin D Präparat (antioxidant) behandelt wurden, wiesen auffällig niedrige APRIL-Konzentrationen auf. Aus diesem Grund wurden die mit

Diskussion

Prednisolon behandelten Patienten in die Gruppen mit Calcilac (n = 10) bzw. ohne Calcilac (n = 11) aufgespalten und miteinander verglichen. Calcilac behandelte Patienten wiesen signifikant geringere APRIL-Serumkonzentrationen auf (p = 0,0482). Es ist anzunehmen, dass das Vitamin D in diesem Präparat für die Minderung der APRIL-Konzentration im Serum verantwortlich sein könnte. Erst kürzlich konnte im Rahmen einer kleinen Case-Report Studie gezeigt werden, dass therapierefraktäre ITP-Patienten erfolgreich mit hochdosiertes Vitamin D behandelt werden konnte. Auch hier liegt ein Zusammenhang zwischen APRIL und Therapierefraktärität vor.

Eine Therapie zur Senkung der Radikalbildung könnte die APRIL-Konzentrationen im Serum senken und somit die APRIL-vermittelten Pathomechanismen entgegenwirken. Darunter zählen z.B. die Regulierung des Überlebens und der Differenzierung autoreaktiver B- und T-Zellen sowie autoantikörperproduzierender Plasmazellen, die verstärkte T-Zellantwort durch hoch-regulierung von Ko-Faktoren (CD40, CD80, CD86, MHC-II), die T-Zellpolarisation sowie der Klassenwechsel des Immunglobulins. Dies verdeutlicht die Bedeutung des oxidativen Stresses in den Pathomechanismen der ITP und zeigt, dass antioxidative Therapieansätze in der Tat eine Option darstellt, Autoimmundysregulationen, die u.a. durch APRIL vermittelt sind, zu begegnen.

Neben den Befunden, dass die Serumlevel von APRIL mit der Krankheitsaktivität korreliert und möglicherweise als prädiktiver Marker für die Therapierefraktärität von Glukokortikosteroiden dienen könnte, könnte der APRIL-Serumspiegel möglicherweise auch mit den klinischen Symptome wie z.B. der Blutungsneigung assoziiert sein. Bislang fehlen jedoch solche Untersuchungen. Da APRIL die Ausreifung der Megakaryozyten und darüber hinaus die Thrombozytenbildung fördert [59], wird der Verdacht nahegelegt, dass die Thrombozytopenie durch die gesteigerten APRIL-Expressionen möglicherweise kompensiert werden soll. Das jedoch die höchsten APRIL-Konzentrationen bei den Patienten mit den niedrigsten Thrombozytenzahlen gemessen wurden, deutet darauf hin, dass APRIL in dieser Funktion entweder uneffektiv ist, andere Mechanismen gegenwirken oder dass APRIL sogar direkt die Zerstörung der Thrombozyten induziert.

Diskussion

Als **Hauptbefund** dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die APRIL-Konzentrationen im Serum mit den Thrombozytenzahlen stark korrelieren (Spearman $R = -0,4907$, $p = 0,0013$) (Abb. 14). Dieser Befund bestätigt unseren Verdacht, dass APRIL an der Entstehung, der Progression und/oder der Aufrechterhaltung der Pathomechanismen der ITP beteiligt sein könnte. Da hier offensichtlich die Thrombozytenzahl die APRIL-Serumkonzentration am stärksten beeinflusst, sind die statistischen Auswertungen und Aussagen zu den Themen „Unterschied zwischen primärer und sekundärer ITP“, „Einfluss der Therapie“ sowie der „Einfluss des Geschlechts“ nur mit Vorsicht zu betrachten. Für die verschiedenen Vergleiche wurden immer wieder neue Gruppen gebildet, wobei die Thrombozytenzahlen nicht mitberücksichtigt wurden. Würden auf diese Weise Gruppen gebildet, die statistisch signifikant unterschiedliche Thrombozytenzahlen aufweisen, so kann damit gerechnet werden, dass sich auch die APRIL-Konzentrationen statistisch signifikant unterscheiden. Auch wenn die Aussagen aus diesen Untersuchungen verzerrt sein könnten, waren diese Vergleiche sinnvoll und notwendig.

Um zu untersuchen, ob die Proteinexpression mit der Genexpression von APRIL korreliert, wurden mit Hilfe der Echtzeit-PCR die mRNAs von APRIL, aber auch von BAFF, aus PBMCs quantifiziert. In der Literatur wurden bereits Genexpressionen von BAFF und APRIL beschrieben [128, 129]. Wie auch von Zhou et al 2009 berichtete, waren zwar die BAFF-Serumspiegel bei ITP signifikant erhöht, ein signifikanter Unterschied in der Genexpression von BAFF im Vergleich zu den Kontrollen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden [128]. Sie berichteten, dass die BAFF-mRNA zwar bei ITP erhöht sei, mit einem p-Wert von 0,068 jedoch nicht statistisch signifikant. Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Befunde bestätigt werden. Die BAFF-Genexpression bei ITP ist zwar erhöht, aber nicht statistisch signifikant ($p = 0,0679$). Darüber hinaus wurde von einer schwachen Korrelation von BAFF-mRNA mit der Thrombozytenzahl berichtet ($R = -0,242$, $p = 0,064$), die wir ebenfalls nachweisen konnten (Spearman $R = -0,2669$, $p = 0,0583$).

Dieselbe Arbeitsgruppe arbeitete zeitgleich an der Untersuchung von APRIL im Serum der ITP-Patienten [129]. Sie konnten ebenfalls erhöhte APRIL-Serumspiegel feststellen, die im Gegensatz zu BAFF mit der Thrombozytenzahl stark korreliert.

Diskussion

Außerdem konnten sie einen statistisch signifikanten Unterschied in der Genexpression der APRIL-mRNA zwischen aktiven ITP-Patienten zu Kontrollen feststellen. Obwohl die APRIL-Genexpression auch im Rahmen dieser Doktorarbeit bei Patienten mit aktiver ITP z.T. deutlich erhöht war, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen aktiver ITP und den Kontrollen festgestellt werden ($p = 0,1015$). Der Vergleich zwischen der Gesamtheit der ITP-Patienten hingegen ergab einen statistisch signifikanten Unterschied ($p = 0,0265$). Interessant ist, dass Patienten in Remission signifikant verminderte BAFF- und APRIL-Genexpressionen zeigten, als die Kontrollen ($p = 0,0133$ und $p = 0,0097$). Dies wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben.

Auch ist diese Genexpressionsanalyse die erste, bei der die mRNA-Level von BAFF und APRIL aus den identischen Proben untersucht wurden. Mit der Annahme, dass BAFF sowie APRIL möglicherweise synergisch agieren und daher gleichermaßen reguliert sein könnten, wäre eine gleiche Genexpression von BAFF und APRIL zu erwarten gewesen. Allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass BAFF und APRIL bei einigen Fällen auch reziprok exprimiert sind (Abb. 20).

Insgesamt deuten die Befunde der Genexpressionsanalyse darauf hin, dass die vermehrte BAFF- und APRIL- Proteinbildung nicht zwingend auf die Hochregulation der jeweiligen mRNA zurückzuführen, da posttranskriptionale Regulationsmechanismen auf Proteinebene existieren, die für die erhöhten BAFF- und APRIL-Serumkonzentrationen/Sekretion mitverantwortlich sein können. Zhou 2009 und Gu 2009 machten diesbezüglich keine Aussagen in ihren Veröffentlichungen. Bekannt ist, dass Furin für die Aktivierung und/oder Freisetzung von BAFF und APRIL verantwortlich ist. Eine Dysregulation von Furin könnte möglicherweise die erhöhten BAFF- und APRIL-Serumlevel bei gleichzeitig unveränderten Genexpressionen erklären. Furin ist z.B. bei Lungenkrebs (Non-Small Cell Lung Cancer) überexprimiert [130]. Eine Dysregulation von Furin konnte ebenfalls in Immunzellen bei fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden, die mit signifikant erhöhten BAFF- und APRIL-Level assoziiert sind [131]. Eine differenzielle Gen- oder Proteinexpression von Furin wurde bei ITP bislang jedoch nicht untersucht. Sollte sich der Verdacht bestätigen, dass die

Diskussion

erhöhten BAFF- und APRIL-Serumspiegel bei der ITP durch eine Dysregulation von Furin verursacht werden, könnten Medikamente zur Inhibierung von Furin eine neue therapeutische Option darstellen.

Die genauen Mechanismen, die zur erhöhten APRIL-Serumkonzentrationen führen, sind bislang nicht vollständig bekannt. Es wird vermutet, dass Monozyten für die Erhöhung der Serumkonzentration von APRIL verantwortlich sein könnten [129]. Diese Annahme wird auch durch eine andere Studie an Patienten mit MS gestützt, bei der gezeigt werden konnte, dass Monozyten deutlich mehr APRIL-mRNA exprimieren als T-Zellen [132]. CD16⁺ Monozyten spielen bei der Regulierung bestimmter T-Zellsubpopulationen eine wichtige Rolle und triggern die T-Helferzellendifferenzierung [133]. Es konnte ebenfalls veranschaulicht werden, dass Monozyten, aber auch Makrophagen und Dendritische Zellen, vermehrt APRIL sekretieren, wenn sie durch INF-gamma oder CD40L stimuliert werden [56, 134]. Die ITP gilt als eine Type-1 polarisierte Autoimmunerkrankung, wobei CD4⁺ T-Zellen vermehrt INF- γ und CD40L exprimieren und sekretieren [135]. Somit liegt der Schluss nahe, dass die APRIL-Überexpression von Monozyten durch die verstärkte Stimulation von INF- γ induziert wird. Eine Therapie mit anti-INF- γ wäre demnach eine vielversprechende, therapeutische Strategie. Skurkovich verdeutlichte bereits durch eine Vielzahl an Übersichtsartikeln den therapeutischen Nutzen von anti-INF- γ Antikörpern vor allem bei den Th1-vermittelten Autoimmunerkrankungen [136-138]. Hinter dem hier aufgeführten Hintergrund könnte eine anti-INF-gamma Therapie ebenfalls eine vielversprechende Strategie für ITP-Patienten darstellen.

Die Tatsache, dass die APRIL-Serumkonzentrationen mit den Thrombozytenzahlen stark korrelieren, legt den Verdacht nahe, dass die Thrombozyten selbst den Grad freier APRIL Liganden in der Peripherie durch Absorption regulieren könnten. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie die basale (physiologische) APRIL Oberflächenbeladung der Thrombozyten untersucht. Eine in-silico Recherche zur Klärung der Frage, ob die klassischen BAFF Rezeptoren (BAFF-R, TACI und BCMA) auf der Oberfläche von Thrombozyten präsentiert werden, lieferten Hinweise darauf, dass dem nicht so sei. Die Datenbank „The Platelet Web“ (<http://plateletweb.bioapps.biozentrum.uni->

Diskussion

wuerzburg.de/plateletweb.php) beinhaltet Transkriptom- sowie Proteomdaten. Keines der klassischen Rezeptoren wurde dort bei Thrombozyten nachgewiesen. Um dennoch den sicheren Beweis zu erbringen, wurden Thrombozyten mit Fluoreszenzmarkierten anti-BAFF-R, anti-TACI und anti-BCMA inkubiert. Wie aus der Abbildung 25 zu erkennen ist, werden diese Rezeptoren wie zu erwarten war, nicht auf der Oberfläche von Thrombozyten exprimiert. Eine Anbindung von APRIL müsste demnach durch einen anderen Rezeptor bzw. Oberflächenmolekül erfolgen. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, könnte APRIL unter Umständen über Heparansulfat Proteoglykane an Thrombozyten binden.

APRIL konnte in der Tat auf der Oberfläche von Thrombozyten sowie bei ITP-Patienten als auch bei den Gesunden nachgewiesen werden (Abb. 23). Die APRIL Beladung der Thrombozyten von ITP-Patienten war zwar im Mittel höher im Vergleich zu denen der Gesunden, jedoch statistisch nicht signifikant ($p = 0,0947$) (Abb. 24). Das kein statistisch signifikanter Unterschied berechnet werden konnte, könnte an der geringen Anzahl an untersuchten Proben liegen. Dennoch scheinen Thrombozyten von ITP-Patienten stärker mit APRIL beladen zu sein. Dies kann durch die erhöhten APRIL-Serumkonzentrationen sowie durch die verminderte Anzahl an Thrombozyten bei den gleichen Serumspiegeln bei ITP-Patienten erklärt werden. Um zu untersuchen, ob die erhöhte APRIL Beladung der Thrombozyten eventuell durch die hoch-regulierung bestimmter Rezeptoren bedingt ist, wurden im nächsten Schritt die Thrombozyten von ITP-Patienten und Gesunden mit rekombinantem APRIL beladen. Das rekombinante Protein ist mit einer FLAG Sequenz ausgestattet. Diese erlaubt den direkten Nachweis der Anbindung des rekombinanten APRIL Proteins auf der Oberfläche der Thrombozyten. Während eine basale Beladung der Thrombozyten mit APRIL bei ca. 10% lag, wurde bei der Anbindung des rekombinanten APRILs bis zu 90% erreicht. Dies ist auf eine verhältnismäßig hohe (nicht-physiologische) Konzentration des rekombinanten APRIL zurückzuführen. Ein statistisch signifikanter Unterschied der Beladung der Thrombozyten von ITP-Patienten und Gesunden bestand jedoch nicht ($p = 0,1986$) (Abb. 27). So konnte im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass APRIL generell an Thrombozyten bindet und dass die physiologische Oberflächenbeladung von APRIL auf den Thrombozyten von ITP-Patienten im

Diskussion

Vergleich zu den gesunden Kontrollen erhöht ist. Welche Funktion bzw. Signaltransduktion die APRIL Anbindung in Thrombozyten auslöst bleibt zunächst unklar, sollten in zukünftigen Forschungen untersucht werden.

Das APRIL an Heparansulfat Proteoglykane (HSPG) bindet, konnte bereits gezeigt werden [75]. Das HSPG Syndekan-4 wurde bereits auf der Thrombozytenoberfläche nachgewiesen [91], sodass wir primär davon ausgehen, dass die APRIL Anbindung über Syndekan-4 erfolgt. Bislang wurden die Signaltransduktionen, die durch die Interaktion von APRIL mit Syndekan-4 bei Thrombozyten induziert werden, nicht untersucht. Daher kann hier nur auf die Literatur verwiesen werden, die den Down Stream Pathway von Syndekan-4 durch die Anbindung anderer Liganden und an anderen Zellen untersucht haben. Chen und Lau (2010) berichteten über die Synergie zwischen zwei eigentlich unabhängigen Protein Familie; den CCN matrizellulären Proteinen und den Tumornekrosefaktoren (TNF) [139]. Dabei binden CCN Proteine (CCN 1) an Integrin und an Syndekan-4 gleichzeitig und lösen somit in Fibroblasten eine Apoptose-aktivierende Signaltransduktion aus. Diese erfolgt durch eine dramatische Generierung von freien Radikalen (ROS), vor allem durch die Aktivierung der 5-Lipoxygenase (5-LOX). Hohe ROS-Level verstärken und erhalten die Aktivierung der c-Jun NH₂-terminalen Proteinkinase (JNK), welches den pro-Survival Faktor c-FLIP degradiert. Somit wird z.B. die über NF-κB anti-apoptotische Wirkung von TNF-α blockiert, seine Apoptose induzierende Signaltransduktion bleibt jedoch durch die Aktivierung der Caspasen erhalten. Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch für APRIL denkbar (siehe Abbildung 28).

Diskussion

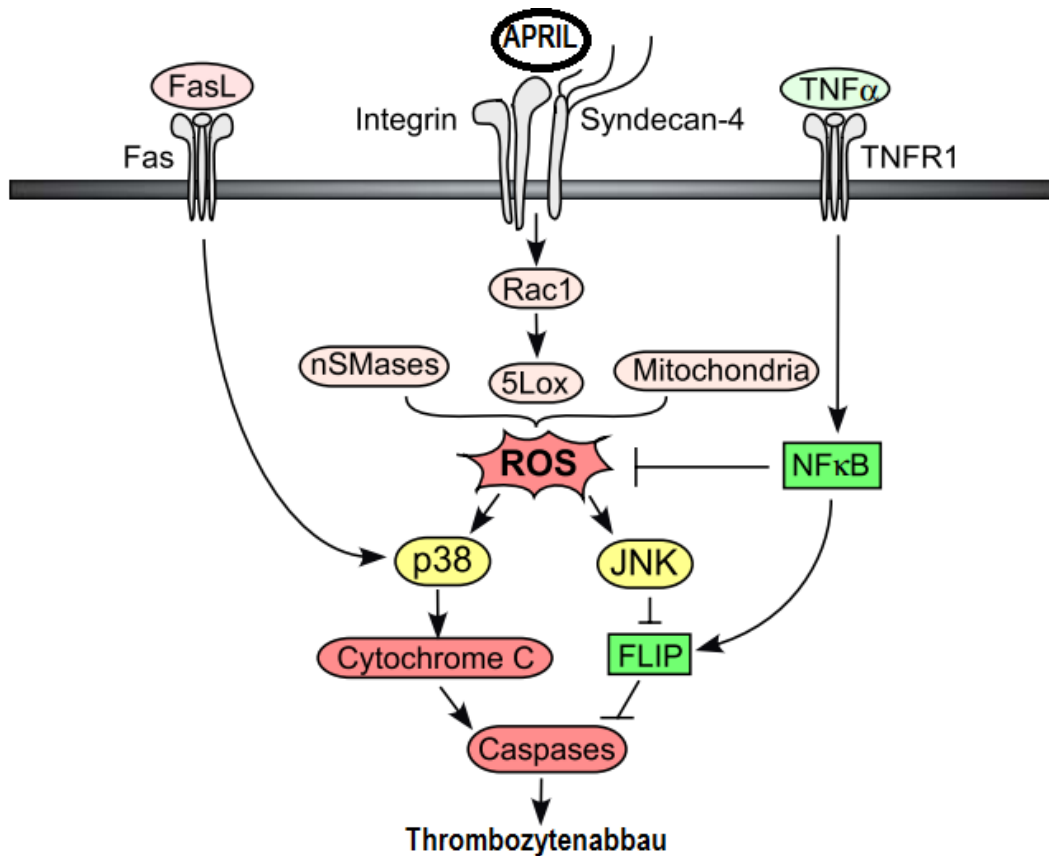


Abbildung 28: Möglicher Signaltransduktionsweg nach Anbindung von APRIL an Integrin und Syndecan-4
 Modifiziert nach Chen und Lau (2010) [139].

Alle Faktoren dieses Pathways sind in Thrombozyten enthalten. Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) wurde z.B. mit der Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten assoziiert und wird u.a. über mTOR und S6K1 (ribosomalen Protein S6 Kinase 1) reguliert [140]. Es ist bekannt, dass Thrombozyten über Mitochondrien sowie über 5-Lipooxygenase (5-LOX) verfügen, die die primäre zelluläre Lokalisation für die Bildung freier Radikale darstellen. Auch hier besteht ein Zusammenhang zwischen Thrombozytenaktivierung und Aggregation. In einer Arbeit konnte gewiesen werden, dass die Inhibierung der 5-LOX durch die Stimulation mit Thrombin und einem Tromboxan-Mimetikum zu einem Anstieg des intrazellulären Calciumlevels mit gleichzeitiger Abnahme der Thrombozytenaggregation einhergeht [141]. Die Mitogen-aktivierenden Protein Kinasen (p38 und JNK) wurden ebenfalls in Thrombozyten nachgewiesen und deren Aktivierung durch Thrombin und Fibrinogen ist ebenfalls mit der Thrombozytenaggregation assoziiert [142, 143]. Somit sind alle Faktoren des Downstreams von Syndecan-4 auch in Thrombozyten enthalten und

Diskussion

spielen nachweislich entscheidende Rollen in der Thrombozytenphysiologie. Es ist bekannt, dass TNF- α die Überlebenszeit der Thrombozyten verkürzt und darüber hinaus zu Thrombozytopenien führt [144]. Es konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor TNFR 1 bei Thrombozyten hauptverantwortlich für die TNF- α vermittelte Aktivierung der Apoptose ist [144]. Es ist also möglich, dass APRIL in Thrombozyten dieselbe oder eine ähnliche Signaltransduktion auslöst, wie CCN bei Fibroblasten. In diesem Zusammenhang würde APRIL nicht die Apoptose direkt induzieren, sondern nur begünstigen. Erhöhte Konzentrationen von TNF- α wurden bei ITP bereits beschrieben [35]. Dieser Mechanismus würde erklären, warum Patienten mit den höchsten APRIL-Konzentrationen im Serum die geringsten Thrombozytenzahlen aufwiesen. In Zukunft sollten also nicht nur die APRIL-Konzentration, sondern auch die Konzentration von TNF- α in Betracht gezogen werden. Allerdings fehlen bislang solche Untersuchungen, bei denen die Serumkonzentrationen von APRIL und TNF- α simultan gemessen werden und mit der Thrombozytopenie korreliert werden.

8 Zusammenfassung und Zukunftsausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass APRIL, ähnlich wie BAFF, bei ITP-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen z.T. deutlich im Serum erhöht ist ($p = 0,0057$). Die Aufteilung der ITP-Patienten in Patienten mit primärer und sekundärer ITP ergab, dass APRIL vor allem bei Patienten mit primärer ITP im Vergleich zu den Kontrollen erhöht ist ($p = 0,0003$), wobei kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen sekundären ITP-Patienten und Kontrollen festgestellt werden konnte ($p = 0,4910$). Der Vergleich behandelter Patienten mit den unbehandelten Patienten zeigte zuerst keinen Unterschied in der APRIL-Serumkonzentration. Wurden die behandelten Patienten jedoch in Abhängigkeit ihrer Thrombozytenzahl in die Gruppen „Responder“ und „Non-Responder“ aufgeteilt, so konnte festgestellt werden, dass Patienten, die auf die Behandlung ansprachen, verminderte APRIL-Konzentrationen aufwiesen. Daher wäre es möglich, dass APRIL als prädiktiver Marker zur Identifizierung therapierefraktärer Patienten eingesetzt werden könnte, um den Therapieerfolg mit Immunsuppressiva möglichst schnell zu erkennen und ggf. die Steroidtherapie zugunsten anderer Therapieoptionen zu verlassen. Als interessanter Nebenbefund wurde festgestellt, dass Patienten, die neben Prednisolone mit Vit. D behandelt wurden, deutlich geringe APRIL Werte aufwiesen als unbehandelte Patienten oder Patienten, die allein mit Prednisolon behandelt wurden. Dies wurde auf die antioxidative Wirkung des Vitamins D zurückgeführt. Das deutet drauf hin, dass nicht nur BAFF, sondern auch APRIL möglicherweise redox-reguliert sein könnte und das eine gezielte antioxidative Therapie die BAFF und APRIL vermittelten Autoimmundysregulationen entgegenwirken könnte. Als Hauptbefund dieser Doktorarbeit konnte jedoch eine starke negative Korrelation der APRIL-Serumkonzentration mit der Krankheitsaktivität festgestellt werden (Spearman $R = -0,4624$, $p = 0,0027$).

Eine Korrelation von APRIL mRNA mit den Thrombozytenzahlen konnte nicht festgestellt werden. Auch wenn die ITP-Patienten statistisch signifikant höhere APRIL mRNA Expressionen im Vergleich zu den Kontrollen zeigten ($p = 0,0265$), so gab es keinen statistisch signifikanten Unterschied wenn Patienten mit aktiver ITP mit den Kontrollen verglichen wurden ($p = 0,1015$). Interessant ist, dass die BAFF und

Zusammenfassung und Zukunftsausblick

APRIL mRNA bei Patienten in Remission signifikant vermindert sind ($p = 0,0133$ und $p = 0,0097$). Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass APRIL in der Lage ist, an Thrombozyten anzubinden. Da sich die klassischen Rezeptoren (TACI und BCMA) nicht auf der Oberfläche von Thrombozyten nachweisen ließen, wurde diese Anbindung auf die Interaktion mit dem Oberflächenproteoglykan Syndekan-4 zurückgeführt. Wir konnten zeigen, dass die physiologische APRIL Beladung der Thrombozyten bei ITP-Patienten im Vergleich zu den Gesunden erhöht ist, was durch die erhöhten APRIL Serumlevel und/oder der verminderten Anzahl an Thrombozyten bei normalen APRIL-Konzentrationen erklärt werden könnte. Die Anbindung mit einem rekombinanten APRIL-FLAG Protein ergab, dass kein Unterschied in der Beladungskapazität der Thrombozyten von ITP-Patienten im Vergleich zu den Kontrollen besteht ($p = 0,1986$). Bei Fibroblasten wurde bereits gezeigt, dass eine Anbindung an Syndekan-4 die Apoptose durch TNF- α begünstigt. Wir postulieren, dass derselbe oder ein ähnlicher Mechanismus durch die Anbindung von APRIL an Thrombozyten über Syndekan-4 zumindest bei einem Teil der ITP-Patienten die Thrombozytopenie verursacht. Dies muss jedoch in zukünftigen Arbeiten bewiesen werden.

Zusammenfassung und Zukunftsausblick

Zukunftsaussicht: Es ist ein bekanntes Phänomen, dass die Klärung einer Fragestellung die Generierung weiterer Fragen zur Folge hat. In zukünftigen Forschungsarbeiten sollten daher folgende Fragestellungen weiter untersucht werden, die den Rahmen dieser Arbeit sprengen würden.

Um letztlich die APRIL-Anbindung über Hepransulfate weiter zu charakterisieren und zu verifizieren, sollten Thrombozyten mit Heparin bzw. mit Heparitinase behandelt werden, wodurch die APRIL-Anbindung inhibiert werden sollte. Des Weiteren werden hohe APRIL-Serumlevel mit der TH1-Polarisation ($CD4^+/INF-\gamma^+$) assoziiert, wobei niedrige APRIL-Konzentrationen mit einer TH2-Polarisation einhergehen. Mit Hilfe eines in vitro Assays FAST (fast Immunoassay) kann die T-Zellantwort auf bestimmte Faktoren in relativ kurzer Zeit überprüft werden. In Zukunft sollte also diese Hypothese, dass hohe APRIL-Konzentration eine TH1-Polarisation vermittelt, mit diesem Test überprüft werden. In diesem Zusammenhang sollte eventuell auch untersucht werden, ob Monozyten von ITP-Patienten tatsächlich mehr APRIL Proteine exprimieren, wie in der Literatur postuliert wird. Um Signaltransduktion zu untersuchen, die durch die Anbindung von APRIL an Thrombozyten erfolgt, stehen im Prinzip zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Der klassische Weg besteht darin, spezifisch den Phosphorylierungsstatus bestimmter intrazellulärer Mediatoren mit Hilfe von WesternBlots und spezifischer Antikörpern zu überprüfen. Die Phosphorylierung von Rac1, PKC-alpha, mTOR und die Phosphorylierung von AKT (an der Stelle Serin473) wären interessante Faktoren für diese Fragestellung. Sollte jedoch die Anbindung von APRIL ähnlich wie CCN 1 die Bildung intrazellulärer freier Radikale zur Folge haben, kann dies relativ einfach mit Hilfe der Durchflusszytometrie und durch die Anwendung der semipermeablen Substanz 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2-DCFH-DA) überprüft werden. Diese Substanz wird intrazellulär durch Esterasen gebunden und fluoresziert im FITC Kanal durch die Interaktion mit reaktiven Sauerstoffspezien. Da APRIL die Apoptoseinduktion über die Interaktion von TNF-a und TNFR 1 begünstigt, sollten zukünftig die neben APRIL auch die Konzentration von TNF- α quantifiziert und auf eine mögliche Korrelation mit der Krankheitsaktivität überprüft werden.

9 Literaturverzeichnis

1. Rodeghiero, F., et al., *Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group*. Blood, 2009. **113**(11): p. 2386-93.
2. Stasi, R. and A.C. Newland, *ITP: a historical perspective*. Br J Haematol, 2011. **153**(4): p. 437-50.
3. Harrington, W.J., et al., *Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura*. 1951. J Lab Clin Med, 1990. **115**(5): p. 636-45.
4. George, J.N., *Management of patients with refractory immune thrombocytopenic purpura*. J Thromb Haemost, 2006. **4**(8): p. 1664-72.
5. Cines, D.B., et al., *The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity*. Blood, 2009. **113**(26): p. 6511-21.
6. Ballem, P.J., et al., *Mechanisms of thrombocytopenia in chronic autoimmune thrombocytopenic purpura. Evidence of both impaired platelet production and increased platelet clearance*. J Clin Invest, 1987. **80**(1): p. 33-40.
7. Siegel, R.S., et al., *Platelet survival and turnover: important factors in predicting response to splenectomy in immune thrombocytopenic purpura*. Am J Hematol, 1989. **30**(4): p. 206-12.
8. Cines, D.B. and V.S. Blanchette, *Immune thrombocytopenic purpura*. N Engl J Med, 2002. **346**(13): p. 995-1008.
9. Stasi, R., et al., *Idiopathic thrombocytopenic purpura: current concepts in pathophysiology and management*. Thromb Haemost, 2008. **99**(1): p. 4-13.
10. Frederiksen, H. and K. Schmidt, *The incidence of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults increases with age*. Blood, 1999. **94**(3): p. 909-13.
11. Neylon, A.J., et al., *Clinically significant newly presenting autoimmune thrombocytopenic purpura in adults: a prospective study of a population-based cohort of 245 patients*. Br J Haematol, 2003. **122**(6): p. 966-74.
12. Provan, D., et al., *International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia*. Blood, 2010. **115**(2): p. 168-86.
13. George, J.N., et al., *Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology*. Blood, 1996. **88**(1): p. 3-40.
14. Force, B.C.f.S.i.H.G.H.T., *Guidelines for the investigation and management of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults, children and in pregnancy*. Br J Haematol, 2003. **120**(4): p. 574-96.
15. Matzdorff, A., et al., *[Diagnosis and therapy of autoimmune thrombocytopenia. Recommendations of a joint Expert Group of DGHO, DGTI, DTH]*. Onkologie, 2010. **33 Suppl 3**: p. 2-20.
16. Stasi, R., et al., *Long-term observation of 208 adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura*. Am J Med, 1995. **98**(5): p. 436-42.
17. Salama, A., et al., *Massive platelet transfusion is a rapidly effective emergency treatment in patients with refractory autoimmune thrombocytopenia*. Thromb Haemost, 2008. **100**(5): p. 762-5.

Literaturverzeichnis

18. Bellucci, S., et al., *Low doses v conventional doses of corticoids in immune thrombocytopenic purpura (ITP): results of a randomized clinical trial in 160 children, 223 adults*. Blood, 1988. **71**(4): p. 1165-9.
19. Berchtold, P. and R. McMillan, *Therapy of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura in adults*. Blood, 1989. **74**(7): p. 2309-17.
20. Salama, A., *Current treatment options for primary immune thrombocytopenia*. Expert Rev Hematol, 2011. **4**(1): p. 107-18.
21. Dubbeld, P., H.F. Hillen, and H.C. Schouten, *Interferon treatment of refractory idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP)*. Eur J Haematol, 1994. **52**(4): p. 233-5.
22. Sekreta, C.M. and D.E. Baker, *Interferon alfa therapy in adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura*. Ann Pharmacother, 1996. **30**(10): p. 1176-9.
23. Donato, H., et al., *Alpha-interferon therapy induces improvement of platelet counts in children with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura*. J Pediatr Hematol Oncol, 2001. **23**(9): p. 598-603.
24. Deng, C., et al., *[Clinical study on interferon treatment of chronic idiopathic thrombocytopenic purpura]*. Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2000. **31**(3): p. 392-5.
25. Karasawa, T., et al., *[Case of chronic type C hepatitis complicated with idiopathic thrombocytopenic purpura that was successfully treated by interferon therapy]*. Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi, 2009. **106**(3): p. 405-10.
26. Bockenstedt, L.K., R.J. Gee, and M.J. Mamula, *Self-peptides in the initiation of lupus autoimmunity*. J Immunol, 1995. **154**(7): p. 3516-24.
27. Ferrara, J.L., *Cytokines and the regulation of tolerance*. J Clin Invest, 2000. **105**(8): p. 1043-4.
28. Semple, J.W., et al., *Differences in serum cytokine levels in acute and chronic autoimmune thrombocytopenic purpura: relationship to platelet phenotype and antiplatelet T-cell reactivity*. Blood, 1996. **87**(10): p. 4245-54.
29. Semple, J.W., J.E. Italiano, Jr., and J. Freedman, *Platelets and the immune continuum*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(4): p. 264-74.
30. Power, C.A., et al., *Chemokine and chemokine receptor mRNA expression in human platelets*. Cytokine, 1995. **7**(6): p. 479-82.
31. Andersson, J., *Cytokines in idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP)*. Acta Paediatr Suppl, 1998. **424**: p. 61-4.
32. Castro, C. and M. Gourley, *Diagnostic testing and interpretation of tests for autoimmunity*. J Allergy Clin Immunol, 2010. **125**(2 Suppl 2): p. S238-47.
33. Wada, H., et al., *[Elevated plasma interleukin-6 in patient with idiopathic thrombocytopenic purpura]*. Rinsho Ketsueki, 1991. **32**(7): p. 773-6.
34. Kosar, A., et al., *Circulating thrombopoietin and interleukin-6 in newly diagnosed autoimmune versus aplastic thrombocytopenia*. Haematologica, 1998. **83**(11): p. 1055-6.
35. Liu, L.M., et al., *[Change of Th22 cells in peripheral blood of patients with primary immune thrombocytopenia and clinical implication]*. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2012. **28**(12): p. 1314-6.
36. Emmerich, F., et al., *High-level serum B-cell activating factor and promoter polymorphisms in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura*. Br J Haematol, 2007. **136**(2): p. 309-14.

Literaturverzeichnis

37. Schneider, P., et al., *BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth*. Journal of Experimental Medicine, 1999. **189**(11): p. 1747-1756.
38. He, B., et al., *Lymphoma B cells evade apoptosis through the TNF family members BAFF/BLyS and APRIL*. J Immunol, 2004. **172**(5): p. 3268-79.
39. Pers, J.O., et al., *BAFF overexpression is associated with autoantibody production in autoimmune diseases*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1050**: p. 34-9.
40. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3666-70.
41. Smith, C.A., T. Farrah, and R.G. Goodwin, *The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death*. Cell, 1994. **76**(6): p. 959-62.
42. Baud, V. and M. Karin, *Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(9): p. 372-7.
43. Aggarwal, B.B., *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 745-56.
44. Hehlhans, T. and K. Pfeffer, *The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games*. Immunology, 2005. **115**(1): p. 1-20.
45. Bodmer, J.L., P. Schneider, and J. Tschopp, *The molecular architecture of the TNF superfamily*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(1): p. 19-26.
46. Naismith, J.H. and S.R. Sprang, *Modularity in the TNF-receptor family*. Trends Biochem Sci, 1998. **23**(2): p. 74-9.
47. Dempsey, P.W., et al., *The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(3-4): p. 193-209.
48. Scapini, P., et al., *G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional BLyS*. Journal of Experimental Medicine, 2003. **197**(3): p. 297-302.
49. Yan, M., et al., *Identification of a receptor for BLyS demonstrates a crucial role in humoral immunity*. Nat Immunol, 2000. **1**(1): p. 37-41.
50. Mackay, F. and S.G. Tangye, *The role of the BAFF/APRIL system in B cell homeostasis and lymphoid cancers*. Curr Opin Pharmacol, 2004. **4**(4): p. 347-54.
51. Hahne, M., et al., *APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth*. Journal of Experimental Medicine, 1998. **188**(6): p. 1185-90.
52. Lopez-Fraga, M., et al., *Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase*. EMBO Rep, 2001. **2**(10): p. 945-51.
53. Cerutti, A., et al., *Ongoing in vivo immunoglobulin class switch DNA recombination in chronic lymphocytic leukemia B cells*. Journal of Immunology, 2002. **169**(11): p. 6594-603.
54. He, B., et al., *EBV-encoded latent membrane protein 1 cooperates with BAFF/BLyS and APRIL to induce T cell-independent Ig heavy chain class switching*. Journal of Immunology, 2003. **171**(10): p. 5215-24.
55. Dillon, S.R., et al., *An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets*. Nature Reviews Drug Discovery, 2006. **5**(3): p. 235-246.
56. Litinskiy, M.B., et al., *DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL*. Nat Immunol, 2002. **3**(9): p. 822-9.

Literaturverzeichnis

57. Craxton, A., et al., *Macrophage- and dendritic cell--dependent regulation of human B-cell proliferation requires the TNF family ligand BAFF*. *Blood*, 2003. **101**(11): p. 4464-71.
58. Kimberley, F.C., M. Hahne, and J.P. Medema, "*APRIL hath put a spring of youth in everything*": *Relevance of APRIL for survival*. *Journal of Cellular Physiology*, 2009. **218**(1): p. 1-8.
59. Bonci, D., et al., *Potential role of APRIL as autocrine growth factor for megakaryocytopoiesis*. *Blood*, 2004. **104**(10): p. 3169-72.
60. Thompson, J.S., et al., *BAFF binds to the tumor necrosis factor receptor-like molecule B cell maturation antigen and is important for maintaining the peripheral B cell population*. *Journal of Experimental Medicine*, 2000. **192**(1): p. 129-35.
61. Yu, G., et al., *APRIL and TALL-1 and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity*. *Nat Immunol*, 2000. **1**(3): p. 252-6.
62. Wu, Y., et al., *Tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily member TACI is a high affinity receptor for TNF family members APRIL and BlyS*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(45): p. 35478-85.
63. Marsters, S.A., et al., *Interaction of the TNF homologues BlyS and APRIL with the TNF receptor homologues BCMA and TACI*. *Curr Biol*, 2000. **10**(13): p. 785-8.
64. Bossen, C. and P. Schneider, *BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling*. *Semin Immunol*, 2006. **18**(5): p. 263-75.
65. Hatzoglou, A., et al., *TNF receptor family member BCMA (B cell maturation) associates with TNF receptor-associated factor (TRAF) 1, TRAF2, and TRAF3 and activates NF-kappa B, elk-1, c-Jun N-terminal kinase, and p38 mitogen-activated protein kinase*. *Journal of Immunology*, 2000. **165**(3): p. 1322-30.
66. Xia, X.Z., et al., *TACI is a TRAF-interacting receptor for TALL-1, a tumor necrosis factor family member involved in B cell regulation*. *Journal of Experimental Medicine*, 2000. **192**(1): p. 137-43.
67. von Bülow, G.-U. and R.J. Bram, *NF-AT Activation Induced by a CAML-Interacting Member of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily*. *Science*, 1997. **278**(5335): p. 138-141.
68. Kimberley, F.C., M. Hahne, and J.P. Medema, "*APRIL hath put a spring of youth in everything*": *Relevance of APRIL for survival*. *J Cell Physiol*, 2009. **218**(1): p. 1-8.
69. Varfolomeev, E., et al., *APRIL-deficient mice have normal immune system development*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(3): p. 997-1006.
70. Castigli, E., et al., *Impaired IgA class switching in APRIL-deficient mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(11): p. 3903-8.
71. Castigli, E., et al., *TACI and BAFF-R mediate isotype switching in B cells*. *Journal of Experimental Medicine*, 2005. **201**(1): p. 35-9.
72. Hardenberg, G., et al., *Thymus-independent class switch recombination is affected by APRIL*. *Immunol Cell Biol*, 2008. **86**(6): p. 530-4.
73. Stein, J.V., et al., *APRIL modulates B and T cell immunity*. *J Clin Invest*, 2002. **109**(12): p. 1587-98.
74. Rennert, P., et al., *A soluble form of B cell maturation antigen, a receptor for the tumor necrosis factor family member APRIL, inhibits tumor cell growth*. *Journal of Experimental Medicine*, 2000. **192**(11): p. 1677-84.

Literaturverzeichnis

75. Hendriks, J., et al., *Heparan sulfate proteoglycan binding promotes APRIL-induced tumor cell proliferation*. Cell Death Differ, 2005. **12**(6): p. 637-48.
76. Ingold, K., et al., *Identification of proteoglycans as the APRIL-specific binding partners*, The Rockefeller University Press.
77. Bernfield, M., et al., *Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans*. Annu Rev Biochem, 1999. **68**: p. 729-77.
78. Sasisekharan, R., et al., *Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(7): p. 521-8.
79. Sanderson, R.D. and M. Borset, *Syndecan-1 in B lymphoid malignancies*. Ann Hematol, 2002. **81**(3): p. 125-35.
80. Timar, J., et al., *Proteoglycans and tumor progression: Janus-faced molecules with contradictory functions in cancer*. Semin Cancer Biol, 2002. **12**(3): p. 173-86.
81. Kjellen, L. and U. Lindahl, *Proteoglycans: structures and interactions*. Annu Rev Biochem, 1991. **60**: p. 443-75.
82. Bernfield, M., et al., *Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans*. Annu Rev Cell Biol, 1992. **8**: p. 365-93.
83. Turnbull, J.E., et al., *Identification of the basic fibroblast growth factor binding sequence in fibroblast heparan sulfate*. J Biol Chem, 1992. **267**(15): p. 10337-41.
84. Schmidt, A., K. Yoshida, and E. Buddecke, *The antiproliferative activity of arterial heparan sulfate resides in domains enriched with 2-O-sulfated uronic acid residues*. J Biol Chem, 1992. **267**(27): p. 19242-7.
85. Mali, M., et al., *Sequence of human syndecan indicates a novel gene family of integral membrane proteoglycans*. J Biol Chem, 1990. **265**(12): p. 6884-9.
86. Marynen, P., et al., *Partial primary structure of the 48- and 90-kilodalton core proteins of cell surface-associated heparan sulfate proteoglycans of lung fibroblasts. Prediction of an integral membrane domain and evidence for multiple distinct core proteins at the cell surface of human lung fibroblasts*. J Biol Chem, 1989. **264**(12): p. 7017-24.
87. Carey, D.J., et al., *Molecular cloning and characterization of N-syndecan, a novel transmembrane heparan sulfate proteoglycan*. J Cell Biol, 1992. **117**(1): p. 191-201.
88. Kojima, T., N.W. Shworak, and R.D. Rosenberg, *Molecular cloning and expression of two distinct cDNA-encoding heparan sulfate proteoglycan core proteins from a rat endothelial cell line*. J Biol Chem, 1992. **267**(7): p. 4870-7.
89. Woods, A. and J.R. Couchman, *Syndecan-4 and focal adhesion function*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(5): p. 578-83.
90. Simons, M. and A. Horowitz, *Syndecan-4-mediated signalling*. Cell Signal, 2001. **13**(12): p. 855-62.
91. Choi, S., et al., *Transmembrane domain-induced oligomerization is crucial for the functions of syndecan-2 and syndecan-4*. J Biol Chem, 2005. **280**(52): p. 42573-9.
92. Carey, D.J., *Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors*. Biochem J, 1997. **327** (Pt 1): p. 1-16.
93. Rapraeger, A.C. and V.L. Ott, *Molecular interactions of the syndecan core proteins*. Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(5): p. 620-8.

Literaturverzeichnis

94. Kaneider, N.C., et al., *Expression and function of syndecan-4 in human platelets*. *Thrombosis and Haemostasis*, 2005. **93**(6): p. 1120-1127.
95. Varki, A., *Six blind men and the elephant--the many faces of heparan sulfate*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(2): p. 543-5.
96. Thery, C., M. Ostrowski, and E. Segura, *Membrane vesicles as conveyors of immune responses*. *Nat Rev Immunol*, 2009. **9**(8): p. 581-593.
97. Feldmann, M., et al., *Evaluation of the role of cytokines in autoimmune disease: the importance of TNF alpha in rheumatoid arthritis*. *Prog Growth Factor Res*, 1992. **4**(3): p. 247-55.
98. Volpe, R., *The role of cytokines in the development of autoimmune thyroid disease*. *Thyroid*, 1993. **3**(3): p. 177-8.
99. Mackay, F. and J.L. Browning, *BAFF: a fundamental survival factor for B cells*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(7): p. 465-75.
100. Mackay, F. and H. Leung, *The role of the BAFF/APRIL system on T cell function*. *Semin Immunol*, 2006. **18**(5): p. 284-9.
101. Dillon, S.R., et al., *An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets*. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. **5**(3): p. 235-46.
102. Morel, J., et al., *Serum levels of tumour necrosis factor family members a proliferation-inducing ligand (APRIL) and B lymphocyte stimulator (BLyS) are inversely correlated in systemic lupus erythematosus*. *Ann Rheum Dis*, 2009. **68**(6): p. 997-1002.
103. Dillon, S.R., et al., *BLyS/APRIL heterotrimers activate human B cells, are elevated in SLE and RA patient sera, and are neutralized by atacicept*. *Arthritis and Rheumatism*, 2008. **58**(9): p. S448-S449.
104. Koyama, T., et al., *Raised serum APRIL levels in patients with systemic lupus erythematosus*. *Ann Rheum Dis*, 2005. **64**(7): p. 1065-7.
105. Ho, E.A. and M. Piquette-Miller, *Regulation of multidrug resistance by pro-inflammatory cytokines*. *Curr Cancer Drug Targets*, 2006. **6**(4): p. 295-311.
106. Lee, G. and M. Piquette-Miller, *Cytokines alter the expression and activity of the multidrug resistance transporters in human hepatoma cell lines; analysis using RT-PCR and cDNA microarrays*. *J Pharm Sci*, 2003. **92**(11): p. 2152-63.
107. Liu, L., et al., *[Effects of cytokines on multidrug-resistance in K562/A02 cells]*. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 1997. **18**(12): p. 646-8.
108. Petty, R.D., et al., *APRIL is a novel clinical chemo-resistance biomarker in colorectal adenocarcinoma identified by gene expression profiling*. *BMC Cancer*, 2009. **9**: p. 434.
109. Schoonen, W.M., et al., *Epidemiology of immune thrombocytopenic purpura in the General Practice Research Database*. *Br J Haematol*, 2009. **145**(2): p. 235-44.
110. Segal, J.B. and N.R. Powe, *Prevalence of immune thrombocytopenia: analyses of administrative data*. *J Thromb Haemost*, 2006. **4**(11): p. 2377-83.
111. Ortona, E., et al., *Redox state, cell death and autoimmune diseases: a gender perspective*. *Autoimmun Rev*, 2008. **7**(7): p. 579-84.
112. Nussinovitch, U. and Y. Shoenfeld, *The role of gender and organ specific autoimmunity*. *Autoimmun Rev*, 2012. **11**(6-7): p. A377-85.
113. Invernizzi, P., et al., *Female predominance and X chromosome defects in autoimmune diseases*. *J Autoimmun*, 2009. **33**(1): p. 12-6.

Literaturverzeichnis

114. Di Comite, G., et al., *Conversation galante: how the immune and the neuroendocrine systems talk to each other*. *Autoimmun Rev*, 2007. **7**(1): p. 23-9.
115. Lleo, A., et al., *Is autoimmunity a matter of sex?* *Autoimmun Rev*, 2008. **7**(8): p. 626-30.
116. Rubtsov, A.V., et al., *Genetic and hormonal factors in female-biased autoimmunity*. *Autoimmun Rev*, 2010. **9**(7): p. 494-8.
117. Fairweather, D. and N.R. Rose, *Women and autoimmune diseases*. *Emerg Infect Dis*, 2004. **10**(11): p. 2005-11.
118. Ohno, Y., T. Kanoh, and H. Uchino, *Idiopathic thrombocytopenic purpura with defective oxidative metabolism of neutrophils*. *Nippon Ketsueki Gakkai Zasshi*, 1984. **47**(6): p. 1257-64.
119. Polat, G., et al., *Levels of malondialdehyde, glutathione and ascorbic acid in idiopathic thrombocytopenic purpura*. *East Afr Med J*, 2002. **79**(8): p. 446-9.
120. Zhang, B., et al., *The role of vanin-1 and oxidative stress-related pathways in distinguishing acute and chronic pediatric ITP*. *Blood*, 2011.
121. Thachil, J., *Nitric oxide in immune thrombocytopenic purpura*. *Hematology*, 2009. **14**(1): p. 59-62.
122. Kamhieh-Milz, J., et al., *Reduced antioxidant capacities in platelets from patients with autoimmune thrombocytopenia purpura (ITP)*. *Platelets*, 2012. **23**(3): p. 184-94.
123. Moon, E.Y., et al., *Reactive oxygen species augment B-cell-activating factor expression*. *Free Radic Biol Med*, 2006. **40**(12): p. 2103-11.
124. Tada, F., et al., *B cell activating factor in obesity is regulated by oxidative stress in adipocytes*. *J Clin Biochem Nutr*, 2013. **52**(2): p. 120-7.
125. Meyer, M., R. Schreck, and P.A. Baeuerle, *H₂O₂ and antioxidants have opposite effects on activation of NF-kappa B and AP-1 in intact cells: AP-1 as secondary antioxidant-responsive factor*. *EMBO J*, 1993. **12**(5): p. 2005-15.
126. Schreck, R., P. Rieber, and P.A. Baeuerle, *Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1*. *EMBO J*, 1991. **10**(8): p. 2247-58.
127. Kim, S.J., et al., *Autoinduction of transforming growth factor beta 1 is mediated by the AP-1 complex*. *Mol Cell Biol*, 1990. **10**(4): p. 1492-7.
128. Zhou, Z., et al., *BAFF and BAFF-R of peripheral blood and spleen mononuclear cells in idiopathic thrombocytopenic purpura*. *Autoimmunity*, 2009. **42**(2): p. 112-9.
129. Gu, D., et al., *Raised expression of APRIL in Chinese patients with immune thrombocytopenia and its clinical implications*. *Autoimmunity*, 2009. **42**(8): p. 692-8.
130. Brant, K.A. and G.D. Leikauf, *Dysregulation of FURIN by prostaglandin-endoperoxide synthase 2 in lung epithelial NCI-H292 cells*. *Mol Carcinog*, 2012.
131. Turpeinen, H., et al., *Proprotein convertases in human atherosclerotic plaques: the overexpression of FURIN and its substrate cytokines BAFF and APRIL*. *Atherosclerosis*, 2011. **219**(2): p. 799-806.
132. Thangarajh, M., et al., *Increased levels of APRIL (a proliferation-inducing ligand) mRNA in multiple sclerosis*. *J Neuroimmunol*, 2005. **167**(1-2): p. 210-4.

Literaturverzeichnis

133. Zhong, H., et al., *CD16+ monocytes control T-cell subset development in immune thrombocytopenia*. Blood, 2012. **120**(16): p. 3326-35.
134. Nardelli, B., et al., *Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells*. Blood, 2001. **97**(1): p. 198-204.
135. Ogawara, H., et al., *High Th1/Th2 ratio in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura*. Eur J Haematol, 2003. **71**(4): p. 283-8.
136. Skurkovich, B. and S. Skurkovich, *Anti-interferon-gamma antibodies in the treatment of autoimmune diseases*. Curr Opin Mol Ther, 2003. **5**(1): p. 52-7.
137. Skurkovich, S. and B. Skurkovich, *Anticytokine therapy, especially anti-interferon-gamma, as a pathogenetic treatment in TH-1 autoimmune diseases*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1051**: p. 684-700.
138. Skurkovich, S., B. Skurkovich, and J. Kelly, *Anticytokine therapy, particularly anti-IFN-gamma, in Th1-mediated autoimmune diseases*. Expert Rev Clin Immunol, 2005. **1**(1): p. 11-25.
139. Chen, C.C. and L.F. Lau, *Deadly liaisons: fatal attraction between CCN matrix proteins and the tumor necrosis factor family of cytokines*. J Cell Commun Signal, 2010. **4**(1): p. 63-9.
140. Aslan, J.E., et al., *S6K1 and mTOR regulate Rac1-driven platelet activation and aggregation*. Blood, 2011. **118**(11): p. 3129-36.
141. Nyby, M.D., et al., *Platelet lipoxygenase inhibitors attenuate thrombin- and thromboxane mimetic-induced intracellular calcium mobilization and platelet aggregation*. J Pharmacol Exp Ther, 1996. **278**(2): p. 503-9.
142. Bugaud, F., et al., *Regulation of c-jun-NH2 terminal kinase and extracellular-signal regulated kinase in human platelets*. Blood, 1999. **94**(11): p. 3800-5.
143. Kuliopulos, A., R. Mohanlal, and L. Covic, *Effect of selective inhibition of the p38 MAP kinase pathway on platelet aggregation*. Thromb Haemost, 2004. **92**(6): p. 1387-93.
144. Piguet, P.F., C. Vesin, and C. Da Kan, *Activation of platelet caspases by TNF and its consequences for kinetics*. Cytokine, 2002. **18**(4): p. 222-30.

Eidesstattliche Versicherung

10 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Nuha Ghosoun, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Die Konzentration des Zytokins APRIL (A proliferation-inducing ligand) korreliert positiv mit der Krankheitsaktivität der primären Autoimmunthrombozytopenie, selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

11 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Lebenslauf

Danksagung

12 Danksagung

Mein hauptsächlicher Dank geht an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Salama für die Überlassung des Themas sowie die Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit. Außerdem danke ich ihm für die vielen fachlichen Anregungen in unseren Besprechungen und Diskussionen sowie generell für meine damit verbundene wissenschaftliche Förderung.

Des Weiteren möchte ich Herrn Dr. Julian Kamhieh-Milz für die große experimentelle Unterstützung besonders im Bereich RT-PCR und die Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit sowie für seine konstruktiven Hinweise bedanken.

Die Möglichkeit praktisch jederzeit mit ihm über die auftretenden Probleme zu diskutieren war stets außerordentlich bereichernd und hilfreich.

Bei meinen Freundinnen Dr. Magda Abdul-Sattar und Dr. med. Natalie Wahrlich bedanke ich mich für ihre Mühen bei der Korrektur dieser Arbeit.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir moralische Unterstützung schenkte.