

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Neue Aspekte zur Pathophysiologie der
Autoimmunthrombozytopenie (AITP)“

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Julian Kamhieh-Milz

aus Berlin

Datum der Promotion: 11.12.2015

Inhaltsverzeichnis

1.1 Abstrakt.....	3
1.2 Abstract.....	4
2. Einleitung.....	5
3. Material und Methoden.....	7
3.1 Proben (Biobank).....	7
3.2 Untersuchungen des oxidativen Stresses.....	7
3.2.1 Untersuchung des systemischen OS (FORT und FORD).....	7
3.2.2 Untersuchung des intrazellulären, thrombozytären Redox-Status.....	7
3.2.3 Bestimmung der Enzymaktivität antioxidativer Enzyme (GPX, GR, SOD)..	8
3.3 Identifizierung von Autoantigenen (Luminex und AMIDA).....	8
3.4 Serum Protein Profiling.....	8
3.4.1 Messung der BAFF Serumspiegel.....	8
3.4.2 Identifizierung von BAFF-Promotor Polymorphismen.....	9
3.4.3 Antikörper-basiertes Mikroarray	9
3.5 Bioinformatische- und statistische Auswertung.....	9
4. Ergebnisse.....	11
4.1 Untersuchungen zum oxidativen Stress.....	11
4.1.1 Untersuchung des systemischen oxidativen Stresses.....	11
4.1.2 Untersuchung des thrombozytären Redox-Zustandes.....	12
4.2 Identifizierung neuer Autoantigene.....	13
4.2.1 Identifizierung neuer Autoantigene mit Hilfe des MS-AMIDA Verfahrens....	14
4.2.2 Identifizierung neuer Autoantigene mit Hilfe des Luminex-Verfahrens.....	15
4.3 Serum Protein Profiling.....	15
4.3.1 BAFF Serumspiegel.....	15
4.3.2 Antikörper-basiertes Mikroarray (Secretomics).....	16
5. Diskussion.....	18
6. Referenzen.....	23
Eidesstattliche Versicherung.....	25
Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen.....	26
Lebenslauf.....	27
Vollständige Publikationsliste.....	33
Anlagen (Abstracts).....	34
Danksagung.....	61

1.1 Abstrakt

Die Immuntrombozytopenie (ITP) gilt als „einfachstes Modell“ einer Autoimmunerkrankung. Dennoch sind die Pathomechanismen nicht vollständig aufgeklärt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten mögliche Einflüsse eines oxidativen Stresses (OS) in der Pathophysiologie der ITP untersucht werden. Der systemische OS sowie die systemische antioxidative Kapazität (AOC) wurden mit Hilfe von Schnelltests (FORT und FORD, Caligari, Italien) untersucht. Die Untersuchung des intrazellulären, thrombozytären Redoxstatus erfolgte durchflusszytometrisch. Zwei komplementäre Proteomics Verfahren wurden angewandt um neue Autoantigene zu identifizieren. Der B-Zell Aktivierungsfaktor (BAFF) im Serum wurde kolorimetrisch bestimmt. Darüber hinaus wurde die Expression von 750 sekretierten Faktoren mit Hilfe eines Antikörper-basierenden Mikroarrays untersucht. Ein systemischer OS konnte bei weiblichen Patienten festgestellt werden ($p = 0.0027$). Ferner konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten von ITP Patienten signifikant mehr freie Radikale bilden ($p < 0.0001$) und gleichzeitig eine stark verminderte AOC aufweisen ($p < 0.0001$). Es konnten nur vereinzelt neue Autoantigene identifiziert werden. Eine signifikant erhöhte Konzentration von BAFF wurde primär bei Patienten mit aktiver ITP festgestellt ($p < 0.0001$). Sechzig weitere Faktoren im Serum sind zwischen ITP Patienten und Kontrollen signifikant differenziell exprimiert (adj. $p < 0.05$). Insgesamt zeigte sich, dass der oxidative Stress integrativer Bestandteil der Pathophysiologie der ITP sein könnte und pleiotrope Effekte hat. Der Einfluss des OS konnte sowohl systemisch sowie in Thrombozyten nachgewiesen werden. Es konnten jedoch keine neuen Autoantigene identifiziert werden, die die derzeitige Diagnostik der ITP verbessern könnten. Die erhöhten BAFF-Serumspiegel könnten möglicherweise erklären, warum es bei der ITP zum Verlust der Toleranz kommt. Basierend auf Biomarkerprofilen konnte ein Softwarealgorithmus entwickelt werden, der eine Sensitivität von 83.33% und eine Spezifität von 100% aufweist, was über dem des derzeitigen diagnostischen Goldstandards liegt (anti-GPIIb/IIIa Autoantikörper: Sensitivität 49 - 66%, Spezifität 78 - 93%). In Zukunft können mit Hilfe von Biomarkerprofilen nicht nur spezifisch Krankheiten diagnostiziert werden, sondern auch der Krankheitsstatus festgestellt, der Therapieerfolg überwacht und die Entwicklung neuer Therapiestrategien vorangetrieben werden.

1.2 Abstract

Immune thrombocytopenia (ITP) serves as a model of an autoimmune disease. However, the triggering event in the adult ITP remains often illusive, and the pathomechanisms have not yet been completely identified. In this study, the potential influence of oxidative stress (OS) on the pathophysiology of ITP was investigated. Systemic OS and antioxidant capacity (AOC) were analysed via rapid assays (FORT, FORD, Caligari Italy). Furthermore, the intracellular redox state of vital platelets was characterized by flow cytometry. Two complementary proteomic approaches were applied to identify potential new autoantibodies. The serum concentration of B-cell activating factor (BAFF) was determined colourmetrically. Additionally, the expression of 750 secreted factors was investigated via antibody-mediated microarrays. A systemic OS was primarily identified in female patients with ITP ($P = 0.0027$). Platelets from ITP patients were found to significantly generate more free radicals ($P < 0.0001$) and suffer from decreased AOC ($P < 0.0001$). New autoantigens were identified only sporadically. Active patients were found to have elevated serum BAFF levels ($P < 0.0001$) compared with controls. Additionally, 60 significantly differentially expressed factors were identified via antibody-microarray profiling (adj. $P < 0.05$). In summary, OS appears to play a pivotal role in the pathophysiology of ITP and may have pleiotropic effects. The effect of OS was found on both a systemic and platelet-specific level. However, new autoantibodies, that may improve current diagnostics, were not identified. Elevated BAFF serum levels were found that may explain the loss of immune tolerance in ITP. Based on the biomarker profiles obtained by antibody-microarray screening, a classificatory was generated that demonstrated a sensitivity of 83.33% and a specificity of 100% that is superior to the current diagnostic gold standard (anti-glycoprotein IIb/IIIa autoantibodies; sensitivity, 49–66% and specificity, 78–93%). In the future, biomarker profiling may not only result in the diagnosis of certain diseases, but may also allow the identification of the current disease state, the monitoring of treatment efficiency, and the development of new therapeutic strategies.

2. Einleitung

Die idiopathische Thrombozytopenie Purpura (ITP), auch Autoimmunthrombozytopenie Purpura (AITP) genannt, ist eine erworbene Autoimmunerkrankung, die durch einen beschleunigten Thrombozytenabbau und eine Blutungsneigung charakterisiert ist. Die erste detaillierte Beschreibung wurde von dem Deutschen Arzt Paul Gottlieb Werlhof im Jahr 1735 veröffentlicht [1]. Das klinische Bild der ITP ist extrem variabel [2]. Die Betroffenen können ohne zusätzliche Blutungsrisiken asymptomatisch bleiben, und je nach Thrombozytenzahlen in der Zirkulation mit milder, mäßiger oder massiver Blutungsneigung symptomatisch werden. Die Inzidenz liegt bei 1:15.000 und die Erkrankung kommt bei allen Menschen und in jeder Altersstufe vor. Die Diagnose der ITP ist bisher nur über eine Ausschlussdiagnostik möglich. Eine kausale Behandlung dieser Erkrankung ist bislang nicht möglich und nicht alle Patienten reagieren auf die derzeitigen Therapieinterventionen [2].

Im Jahr 1950 postulierten Harrington and Hollingsworth, dass "Blutfaktoren", heute als Autoantikörper bekannt, möglicherweise für den Thrombozytenabbau verantwortlich seien. In einem lebensgefährlichen Selbstexperiment injizierte sich Harrington Patientenserum, um seine Hypothese zu beweisen [3]. Die Thrombozytenzahlen sanken innerhalb weniger Stunden ab und stiegen binnen von 5 Tagen wieder an. Seit dem wird der primäre Pathomechanismus der ITP damit erklärt, dass Thrombozyten opsoniert und durch Makrophagen des des retikulo-endothelialen System phagozytiert werden. Anti-thrombozytäre Autoantikörper gegen GPIIb/IIIa and GPIb/XI sind das diagnostische Kennzeichen der ITP [4], obwohl nur bei ca. 60% der Patienten Antikörper nachweisbar sind [5]. Anti-thrombozytäre Autoantikörper werden derzeit nur mit einer Sensitivität von 49 – 66% und einer Spezifität von 78 – 93% detektiert [6]. Einige Patienten haben offenbar keine nachweisbaren Autoantikörper [7]. Die Frage, warum diese Patienten eine isolierte Thrombozytopenie entwickeln ist bisher nicht geklärt. So können möglicherweise andere Faktoren hier eine Rolle spielen.

Die Ursachen, die zur Bildung von Autoimmunerkrankungen führen sind bislang nicht vollständig aufgeklärt. Eine relativ neue Theorie ist die mögliche Einwirkung eines oxidativen Stresses [8]. Der ungarische Endokrinologe Hans Seyle war der Erste, der den Begriff des "Stresses" in der Medizin einführte [9]. Er entdeckte, dass bestimmte Stimuli wie Hitze, Lärm, toxische Substanzen und emotionale/psychologische Faktoren

dieselben Reaktionen auslösen. Er nannte diese Beobachtung „Generelles Anpassungssyndrom (engl. „General adaptation syndrome“) und wurde später von ihm selbst in “Stressantwort” umbenannt [9]. Es ist nicht auszuschließen, dass bestimmte Umweltfaktoren ebenfalls einen Einfluss auf die Pathomechanismen der ITP haben könnten.

Ziel dieser Dissertation war es, neue mögliche Pathomechanismen der ITP zu untersuchen. Als erstes wurde ein möglicher Einfluss eines oxidativen Stresses sowie systemisch als auch auf Thrombozytenebene untersucht. Oxidative Schäden an Biomolekülen können zu Proteinmodifikationen führen und die Apoptose von Thrombozyten induzieren, wie bereits in Thrombozyten von Patienten mit dem Kawasaki Syndrom beschrieben wurde [10,11]. Ein oxidativer Stress kann jedoch auch über die Bildung von Neo-Antigenen und kryptischen Epitopen die Bildung von Autoantikörpern induzieren [12-14]. Dies konnte bereits bei einigen Autoimmunerkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis, dem Systemischen Lupus Erythromatose, dem Typ 1 Diabetes mellitus und der amyotrophen Lateralsklerose gezeigt werden [13,14]. Verfahren zur Identifizierung neuer Autoantikörper fehlen jedoch bislang bei der ITP. Aus diesem Grund sollten mit Hilfe zweier komplementärer Proteomicsverfahren (MS-AMIDA und Luminex) neue Autoantigene identifiziert werden.

Es ist bislang nicht vollständig aufgeklärt, warum es bei der ITP zum Verlust der Toleranz kommt. Autoreaktive T-Zellen gegen GPIIb/IIIa sind z.T. auch in gesunden Individuen nachweisbar [15]. Das deutet darauf hin, dass die Immunreaktionen gegen Autoantigene primär durch periphere Toleranzmechanismen unterdrückt werden. So ist bekannt, dass z.B. erhöhte BAFF-Serumkonzentrationen das Überleben autoreaktiver B-Zellen ermöglichen können [16]. Aus diesem Grund sollte erstmals die BAFF-Serumkonzentration bei ITP Patienten untersucht werden. Darüber hinaus sollen die Expression von 750 sekretierten Faktoren (z.B. Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren), die für die Immunregulation relevant sind, durch die Anwendung eines nicht-kommerziellen Antikörper-basierten Mikroarrays untersucht werden. Die Erkenntnisse dieser Arbeit sollten zum Verständnis der Pathomechanismen der ITP beitragen, sowie die Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Strategien ermöglichen.

3. Material und Methoden

3.1 Proben (Biobank)

Die Patienten wurden nach den jeweils aktuellen Richtlinien der Amerikanischen Gesellschaft für Hämatologie zur Diagnose einer ITP diagnostiziert [17,18]. Patienten wurden entsprechend der Thrombozytenzahl in aktive ITP ($< 80.000 / \mu\text{l}$), in ITP in stabiler Teilremission ($80.000 - 100.000 / \mu\text{l}$) und Patienten in Remission ($> 100.000 / \mu\text{l}$) stratifiziert. Es wurde eine Biodatenbank mit über 730 Einträgen erstellt, wobei davon 462 Einträge ITP Patienten repräsentieren. Diese beinhalten neben der aktuellen Thrombozytenzahl u.a. die Präsenz von Autoantikörpern, die aktuelle Therapie, Informationen zur Splenektomie sowie weitere relevante klinische Daten. Von den Proben wurden Serum, EDTA-Plasma, RNA aus Peripheren Mononuklearen Zellen (PBMCs) sowie DNA isoliert und archiviert. Blutspender stellen eine rel. gut charakterisierte und rel. gesunde Kontrollgruppe dar. Ein Votum von der Ethikkommission der Charité wurde eingeholt (EA2-130/09).

3.2 Untersuchungen des oxidativen Stresses

3.2.1 Untersuchung des systemischen OS (FORT und FORD)

Die Untersuchung des systemischen oxidativen Stresses wurde mit Hilfe des *Free Oxygen Radicals Test* (FORT) und des *Free Oxygen Radicals Defence* (FORD) Schnelltests (Callegari, Italien) durchgeführt. Dabei wurde eine definierte Menge an Kapillarblut entnommen ($20 \mu\text{l}$ für den FORT Assay, $50 \mu\text{l}$ für den FORD Assay). Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Alle Studienteilnehmer füllten einen Fragebogen der Firma Callegari aus.

3.2.2 Untersuchung des intrazellulären, thrombozytären Redox-Status

Die intrazelluläre Bildung reaktiver Sauerstoffspezien (engl. reactive oxygen species, ROS) sowie die antioxidative Kapazität (AOC) von Thrombozyten wurde mit Hilfe des Reagenz (5-(-6)-Dichloromethyl-2',7'-Dichlorohydro-fluorescein Diacetat) ($\text{H}_2\text{DCFH-DA}$) untersucht. Dabei handelt es sich um eine zellpermeable, nicht-fluoreszierende Substanz, die intrazellulär durch Esterasen zu einem nicht-permeablen Derivat umgewandelt wird [19]. Durch den Einfluss von freien Sauerstoffradikalen wird dieser zu einem fluoreszierenden Substrat derivatisiert, welches ein detektierbares Signal für die Durchflusszytometrie abgibt. Die antioxidative Kapazität wurde mit Hilfe desselben Verfahrens untersucht. Dazu wurden $300 \text{ nM H}_2\text{O}_2$ zugegeben und direkt, nach 30 min.,

nach 60 min. und nach 90 min. die Fluoreszenz gemessen. Thrombozyten verfügen über antioxidative Enzyme (Katalase und Glutathionperoxidase), die das überschüssige H₂O₂ neutralisieren können. Lag bei einer Testperson eine verminderte antioxidative Kapazität vor, so entstehen stärkere und länger anhaltende Fluoreszenzsignale im Vergleich zu gesunden Thrombozyten. Die jeweils ermittelten Mean Fluorescence Intensities (MFI) Werte wurden in das Verhältnis des Mittelwertes von mindestens drei mitgeführten Kontrollen gesetzt.

3.2.3 Bestimmung der Enzymaktivität antioxidativer Enzyme (GPX, GR, SOD)

Die Enzymaktivitäten der Serum Glutathionperoxidase (GPx), der Glutathion Reduktase (GR) und der Superoxid Dismutase (SOD) erfolgten kolorimetrisch mit Hilfe kommerzieller Kits (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Dabei wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen.

3.3 Identifizierung von Autoantigenen (Luminex und AMIDA)

Die Identifizierung neuer Autoantigene erfolgte mittels zweier komplementärer Verfahren. Luminex wurde in Kooperation mit der Protagen AG (Dortmund) durchgeführt. Die Durchführung und Auswertung erfolgte nach den Standardprotokollen (SOPs) der Firma Protagen. Es wurden 40 ITP Proben mit 40 gesunden Kontrollproben auf 4100 mögliche Autoantigene untersucht. Das MS-AMIDA Verfahren erfolgte in 4 Schritten: 1. Thrombozytenisolation (hochrein) mit Optiprep aus Thrombozytenkonzentraten, 2. Antikörperisolation aus Serum (Patienten sowie 100 gesunde Kontrollen), 3. Immunoprecipitation und 4. Orbitrap-MS basierte Proteinidentifikation. Die Auswertung der MS-Spektren erfolgt mit der Software PEAKS 6.0 (Bioinformatics Solutions Inc BSI, Waterloo, Canada). Die Validierung einiger potenzieller Autoantigene erfolgte mit Hilfe von DotBlots. Die genaue Durchführung beider Verfahren ist der Anlage 4 zu entnehmen (vorläufiges AMIDA Manuskript).

3.4 Serum Protein Profiling

3.4.1 Messung der BAFF Serumspiegel

Der B-Zellen Aktivierungsfaktor (BAFF) wurde mit einem spezifischen Enzyme Linked Immunosorbence Assay (ELISA) der Firma R&D Systems (Minneapolis, USA) quantifiziert. Dabei wurde nach den Vorgaben des Herstellers vorgegangen.

3.4.2 Identifizierung von BAFF-Promotor Polymorphismen

Genomische DNA wurde aus frischen EDTA Vollblutproben mit Hilfe eines automatisierten Systems (Genovision, Vienna, Austria) isoliert. Der BAFF-Promotor wurde mit bereits publizierten Primern amplifiziert. 5´ CAC AGG TCC ACC AAG TCA ACA ACA GA-3´ und 5´-ATC ACT ACT TGA ACT TTG AAG GTT GG-3´ [20]. Die PCR Konditionen waren wie folgt: Initiale Denaturierung für 90s bei 95°C gefolgt 30 Zyklen mit 40s bei 95°C, 40s bei 55°C und 60s bei 72°C. Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt (Invisorb Spin PCRapid Kit, Invitex, Berlin Buch). Die Sequenzierung erfolgte mit dem hauseigenen Sequencer (3130, Applied Biosystems). Die Sequenzdaten wurden mit den humanen Genomen verglichen (NCBI Blast).

3.4.3 Antikörper-basiertes Mikroarray

In Kooperation mit dem Deutschen Krebsforschungszentrum der Universität Heidelberg, Institut für Funktionelle Genomanalyse, wurde ein Proteinprofiling aus Serum von ca. 750 ausgewählten Proteinen durchgeführt. Das Profiling erfolgte dabei mit sog. Antikörper Mikroarrays. Es wurden 46 ITP Patienten sowie 34 Kontrollen untersucht. Die Antikörperarrays wurden nach den SOPs der Arbeitsgruppe des DKFZ hergestellt und für diese Studie bereitgestellt. Für das Serum Protein Profiling wurden 50 µl Serum benötigt und die Proteinkonzentration auf 2 mg/ml eingestellt. Zunächst wurde ein Referenz-Pool bestehend aus allen Proben hergestellt. Die Proteine des Serums wurden dabei über NHS-Ester (ThermoScientific, Pierce Protein Research Products, Rockford, USA) mit den Fluoreszenzfarbstoffen DY-549 (für die individuellen Proben) und mit DY-649 für die Referenzprobe (Dyomics, Jena, Deutschland) gefärbt. Die Konjugation erfolgte für 2 Stunden bei 4°C im Dunkeln mit einem 0.1M Carbonat Puffer (pH 8.5) und einem Dye/Protein Verhältnis von 30:1 mol. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden im Dunkeln durchgeführt. Die Mikroarray Chips wurden 4 Mal für 5 Minuten mit PBST gewaschen. Anschließend wurden die Träger für 2 Stunden mit 5% Trockenmilch geblockt. Insgesamt wurden 75 µg der gefärbten Proteine in 5 mL Trockenmilch (5%ig) verdünnt und über Nacht (ca. 16 Stunden) bei 4°C mit den Arrays inkubiert. Die Arrays werden 4 Mal für 5 Minuten mit PBST gewaschen, mit deionisiertem Wasser gespült und einem Inkubator bei 37°C getrocknet. Die Bilderfassung erfolgte mit einem ScanArray-4000XL Scanner (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). Die Signale der Spots wurden mit der GenePix Pro 6.0 Software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) ausgelesen.

3.5 Bioinformatische- und statistische Auswertung

Statistische Auswertungen erfolgten mit SPSS Version 19 (IBM, Armonk, NY, USA) sowie mit Prism Version 5 und 6 (GraphPad Software, San Diego CA, USA). Populationen wurden zunächst auf Normalverteilung geprüft. In der Regel wurde jedoch der nicht-parametrische Mann-Whitney U Test für Gruppenvergleiche angewendet. Korrelationsberechnungen erfolgen i.d.R. nach Spearman. P-Werte kleiner als 0.05 wurden als statistisch signifikant angenommen. Die Mikroarray Daten wurden von Dr. Omid Khorramshahi (Arbeitsgruppenmitglied des Promovenden) ausgewertet. Die Auswertung erfolgte dabei mit Hilfe des limma package von R/Bioconductor. Die p-Werte wurden mittels der sehr konservativen Benjamini-Hochberg Korrektur für multiples testen adjustiert. Weitere Auswertungen erfolgten mit Standard-R-Befehlen.

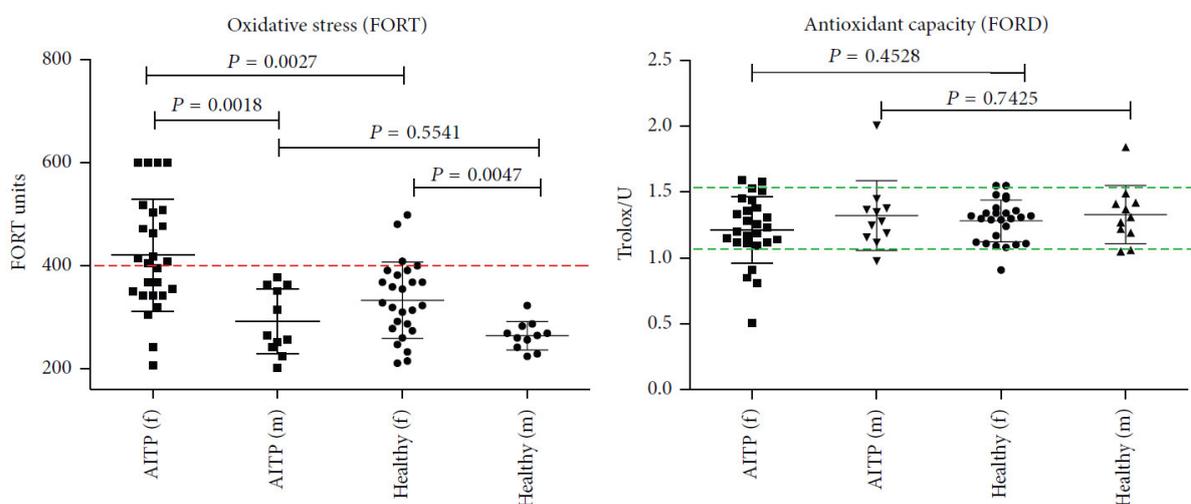
4. Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zum oxidativen Stress

4.1.1 Untersuchung des systemischen oxidativen Stresses

Es wurden 37 ITP Patienten sowie 37 Kontrollen, welche hinsichtlich des Alters, des Geschlechts und des Body Maß Index (BMI) gematcht wurden, mit Hilfe des FORT und FORD Schnelltestes untersucht (Anlage 1). FORT Units > 400 werden als starker oxidativer Stress gewertet. Der Normalbereich der antioxidativen Kapazität ist in der Abbildung dargestellt.

Abbildung 1: FORT und FORD Ergebnisse

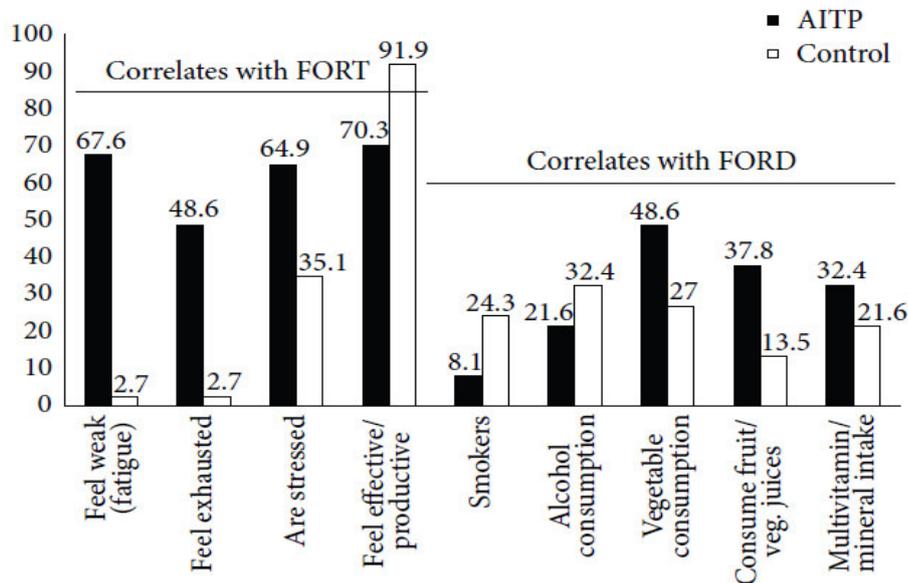


Es wurden 37 (11 männliche und 26 weibliche) ITP Patienten und entsprechende Kontrollen auf OS (links) und auf die AOC (rechts) hin untersucht. Ein geschlechtsspezifischer Unterschied konnte bereits bei den Kontrollen festgestellt werden ($p = 0.0047$). Dabei wiesen jedoch nur 2 von 26 (7.7%) der weiblichen Kontrollen einen starken oxidativen Stress auf. Bei den weiblichen Patienten wiesen hingegen ca. 50% der Patienten einen starken oxidativen Stress auf. Bis auf wenige Ausnahmen wiesen alle untersuchten Probanden eine AOC im Normbereich auf (Abbildung aus [21]).

Wie aus Abb. 1 hervorgeht, konnte ein starker oxidativer Stress primär bei weiblichen ITP Patienten beobachtet werden. Die Antioxidative Kapazität war hingegen im Wesentlichen im Normalbereich. Aus der Auswertung des Fragebogens ging hervor, dass 67,6% der Patienten sich schwach fühlen (med. chronischen Fatigue Syndrom), mehr Patienten als Kontrollen gestresst sind und sich weniger Produktiv fühlen, was gut zu den gemessenen FORT Ergebnissen passt. Es konnte auch ermittelt werden, dass ITP Patienten

Radikalbildner durch den Konsum von Zigarettenrauch und Alkohol eher meiden und sich allg. bewusster ernähren (Abb. 2).

Abbildung 2: Auswertung des Oxidativen Stress Fragebogens (Callegari)

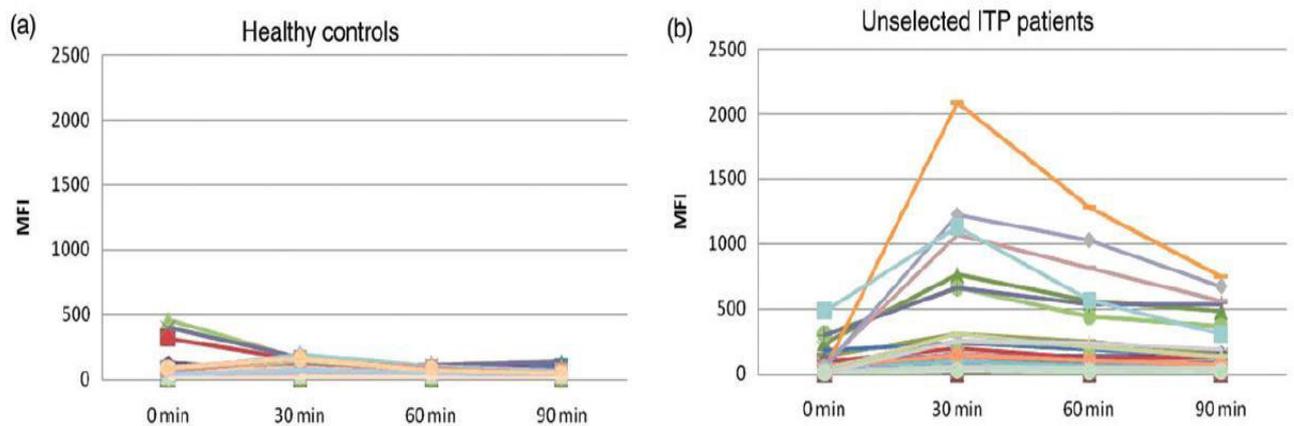


Alle Studienteilnehmer füllten einen OS-Fragebogen aus, wobei die stärksten Unterschiede in den Antworten zwischen ITP Patienten und Kontrollen hier zusammengefasst sind. Insgesamt fühlten sich ca. 2/3 der Patienten schwach (fatigue), mehr als die Hälfte fühlen sich ausgelaugt und gestresst, was mit dem gemessenen erhöhten OS bei ITP passt. Obwohl eine verminderte AOC erwartet wurde, konnte diese nicht nachgewiesen werden. So stellte sich heraus, dass sich ITP Patienten im Vergleich zu den Kontrollen gesünder ernähren, was die AOC möglicherweise kompensiert haben könnte (Abbildung aus [21]).

4.1.2 Untersuchung des thrombozytären Redox-Zustandes

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden 36 Patienten sowie 44 Kontrollen auf die thrombozytäre Bildung freier Radikale sowie deren Fähigkeit, freie Radikale zu neutralisieren (antioxidative Kapazität) untersucht (Anlage 2). Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Bildung freier Radikale festgestellt werden. Das Profiling wurde jedoch auch nach der Veröffentlichung weiter fortgeführt. So konnte im Vergleich von 105 Patienten gegen 69 Kontrollen in der Tat eine signifikant erhöhte Radikalbildung festgestellt werden ($p < 0.0001$). Thrombozyten einiger ITP Patienten sind nicht fähig, innerhalb von 90 Minuten 300 nM exogenes Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu neutralisieren, was auf eine verminderte antioxidative Kapazität hinweist. Diese ist durch die langanhaltenden Fluoreszenzsignale charakterisiert ist (Abb. 3).

Abbildung 3: Kinetik zur Neutralisierung exogenem Wasserstoffperoxid (H₂O₂)



Der thrombozytäre Redoxstatus von 44 Kontrollen sowie 36 ITP Patienten wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Es wurde festgestellt, dass Thrombozyten einiger ITP Patienten eine z.T. sehr stark verminderte AOC aufweisen. So waren die Thrombozyten aller Kontrollen in der Lage, 300 mM exogenen H₂O₂ innerhalb von 30 min. zu neutralisieren, während die von Thrombozyten einiger ITP Patienten selbst nach 90 min. nicht alles an zugeführten H₂O₂ neutralisieren konnten (Abbildung aus [22]).

Die verminderte antioxidative Kapazität wurde vor allem bei Patienten mit aktiver ITP beobachtet. Behandelte ITP Patienten wiesen eine weniger verminderte AOC auf. Ein Unterschied zwischen ITP Patienten mit bzw. ohne Autoantikörper konnte hingegen nicht festgestellt werden. Es wurden auch die Enzymaktivitäten des extrazellulären, antioxidativen Enzymsystems untersucht. Wasserstoffperoxide können durch die Katalase und durch die Glutathionperoxidase (GPx) zu Wasser neutralisiert werden. Bei ITP Patienten konnte im Vergleich zu den Kontrollen nur bei GPx eine signifikant erhöhte Enzymaktivität festgestellt werden. ($p < 0.0001$). Das Verhältnis der Enzymaktivität zwischen der GPx und der Glutathionreduktase ergab, dass bei ITP Patienten mehr reduziertes Glutathion verbraucht als zurückgewonnen wird (7.01 ± 1.66 vs. 3.99 ± 1.34).

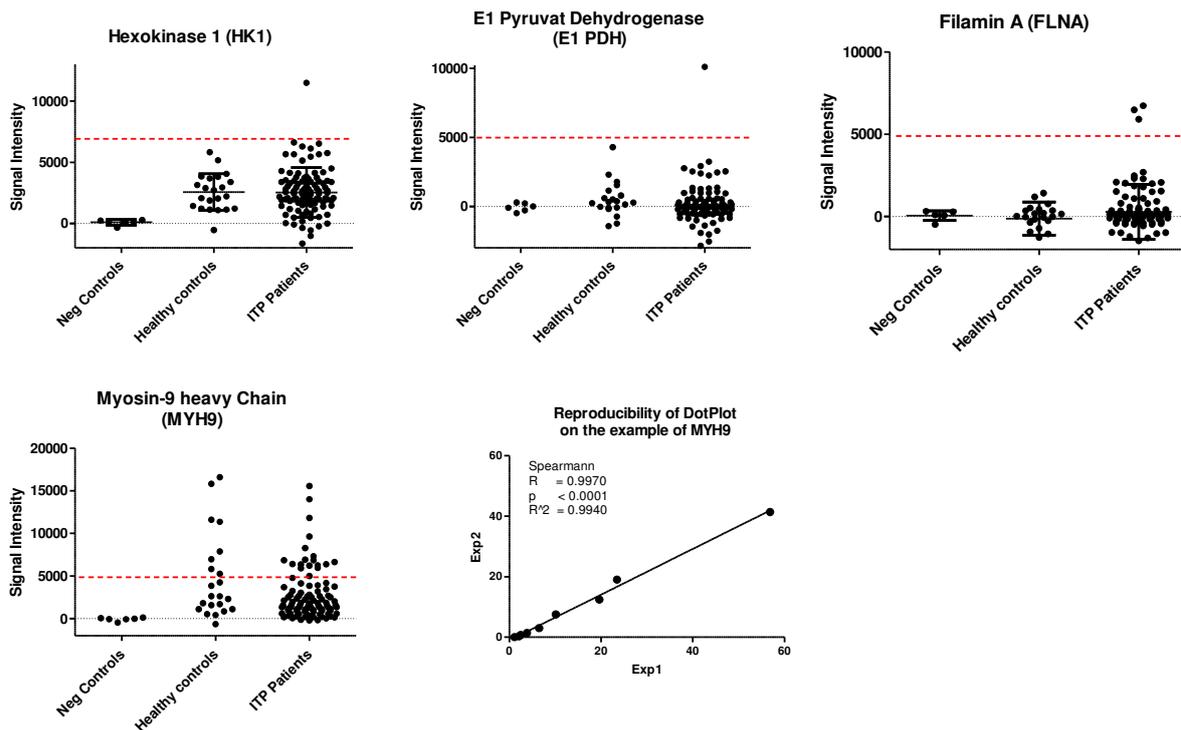
4.2 Identifizierung neuer Autoantigene

Es wurden zwei Ansätze zur Identifizierung neuer Autoantigene verwendet (MS-AMIDA sowie Luminex). Das Manuskript wurde bereits ausformuliert, muss jedoch noch von den Ko-Autoren gegengelesen werden (Separate Anlage).

4.2.1 Identifizierung neuer Autoantigene mit Hilfe des MS-AMIDA Verfahrens

Mit MS-AMIDA in Kombination der *label-free quantification* konnten 16 neue potenzielle Autoantigene identifiziert. Die Validierung der Hexokinase 1, E1-Pyruvat Dehydrogenase, Filamin-A und MYH9 mit DotPlot zeigte hingegen, dass diese Proteine nur bei einzelnen Individuen nachweisbar sind (Abb. 4).

Abbildung 4: DotPlot Validierung von HK1, E1 PDH und FLNA (MS-AMIDA)



Es wurden 115 Patientenproben, 22 Kontrollen, sowie 6 Negativkontrollen auf anti-HK1, anti-E1-PDH und anti-FLNA Autoantikörper untersucht. Ein Patient wies anti-HK1 AAK, ein anderer anti-E1-PDH, und zwei Patienten wiesen anti-FLNA AAK auf. Anti-MYH9 Antikörper konnten in beiden Gruppen festgestellt werden. Ferner konnte eine sehr hohe Reproduzierbarkeit des DotPlot Assays nachgewiesen werden (Abbildung bislang nicht publiziert).

Generell zeigten diese Befunde, dass das von uns entwickelte MS-AMIDA Verfahren zwar die Identifizierung neuer Autoantikörper ermöglicht, die ITP Patienten jedoch ein stark heterogenes Patientenkollektiv darstellen, sodass robuste Biomarker nicht identifiziert werden konnten. MYH9 diente dabei als Kontrolle, anhand die Reproduzierbarkeit zweier unabhängiger Experimente demonstriert werden konnte (Spearman R = 0.9970, R² = 0.9940, p < 0.0001).

4.2.2 Identifizierung neuer Autoantigene mit Hilfe des Luminex-Verfahrens

Mit dem Luminex-basierten Verfahren konnten 22 potenzielle neue Autoantigene identifiziert werden, wobei die Sensitivität und Spezifität bei diesen Autoantigenen mit dem derzeitigen diagnostischen Goldstandard (anti-GPIIb/IIIa Autoantikörper) vergleichbar waren. Interessant war der Nebenbefund, dass ca. 50% der potenziellen Autoantigene nicht von Thrombozyten exprimiert werden.

4.3 Serum Protein Profiling

4.3.1 BAFF Serumspiegel

Die Quantifizierung der BAFF-Serumkonzentration ergab, dass BAFF vor allem bei unbehandelte Patienten mit aktiver Krankheitsphase erhöht ist (Median: 1620 pg/mL vs. 977 pg/ml, $p < 0.001$) (Abb. 5). Patienten in Remission wiesen hingegen keinen sign. Unterschied auf. Die BAFF-Serumkonzentration der Patienten, welche mit Glukokortikosteroiden behandelt wurden, wiesen signifikant geringe BAFF-Level auf, als die Kontrollgruppe ($p < 0.01$).

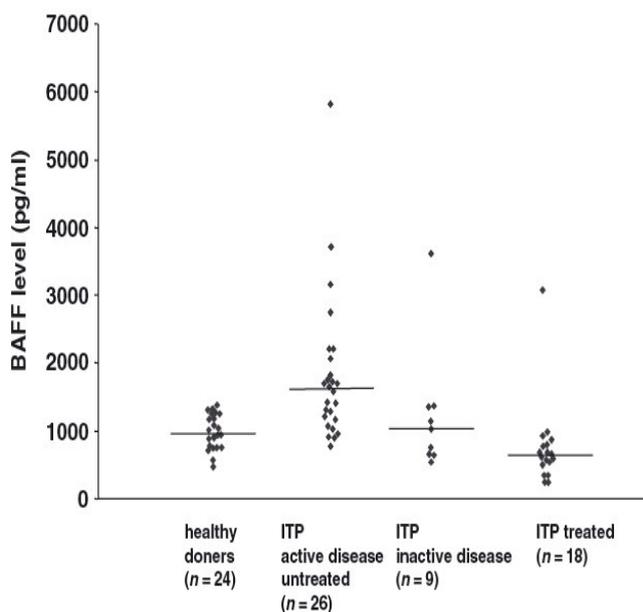


Abbildung 5: BAFF-Serumspiegel

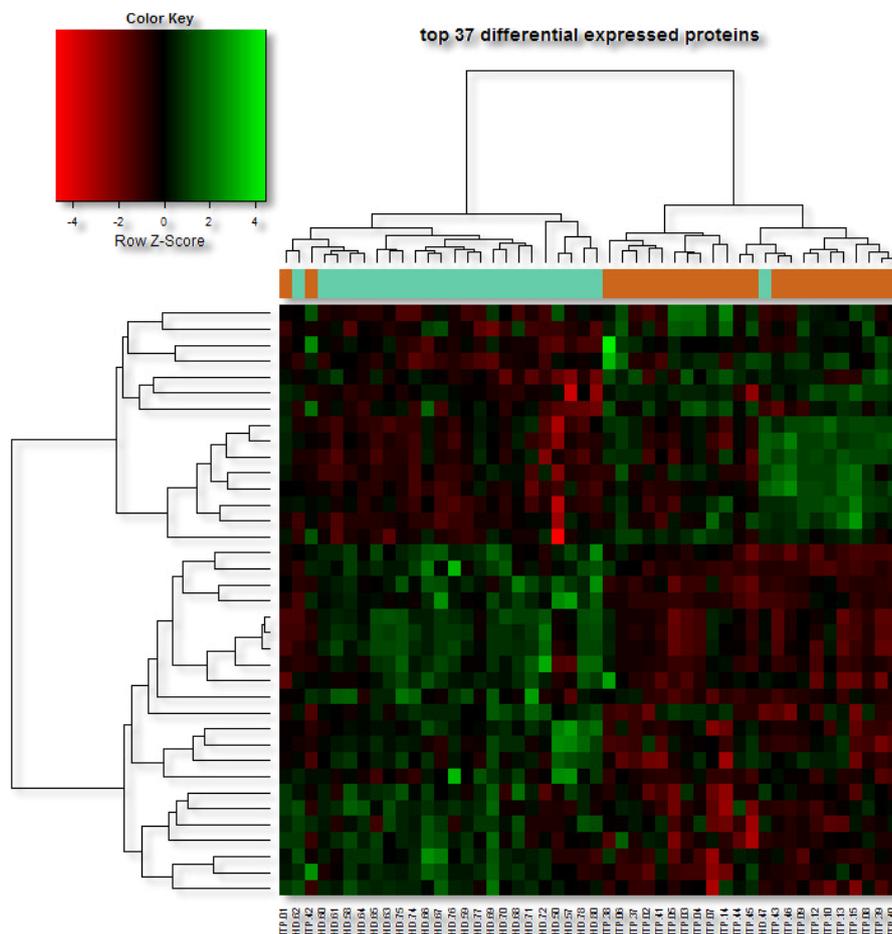
Die BAFF Konzentration von 24 Kontrollen, 26 unbehandelten Patienten mit aktiver ITP, 9 Patienten in Remission und 18 behandelten Patienten wurden quantifiziert. Die Balken repräsentieren die Mediane der BAFF-Konzentrationen. Ein signifikanter Unterschied konnte bei unbehandelten Patienten im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden ($p < 0.0001$). Behandelte Patienten wiesen geringe BAFF-Level auf ($p < 0.01$; Abbildung aus [23]).

Darüber hinaus wurden bei 17 Patienten Polymorphismen im BAFF-Promotor festgestellt. Der Polymorphismus (-871 T/C) wurde in 11 Patienten festgestellt. Dabei waren fünf homozygot (-871 T/T) und sechs heterozygot (-871 T/C).

4.3.2 Antikörper-basiertes Mikroarray (Secretomics)

Die Ergebnisse des globalen Serum Protein Profilings wurden ebenfalls bislang nicht publiziert. Es wurden 46 Patienten sowie 34 Kontrollen auf die Zytokinexpressionen von 750 Faktoren untersucht. Die Qualitätskontrolle ergab jedoch, dass einige Chips nicht auswertbar waren. Final konnten daher nur 24 Patienten (8 mit aktiver ITP) gegen 24 Kontrollen verglichen werden. Insgesamt konnten 60 Faktoren identifiziert werden, die zwischen ITP Patienten und den Kontrollen signifikant differenziell exprimiert vorlagen (adj. $p < 0.05$). Die nachfolgende Abbildung zeigt die 37 am stärksten differenziell exprimierten Proteine (adj. $p < 0.025$).

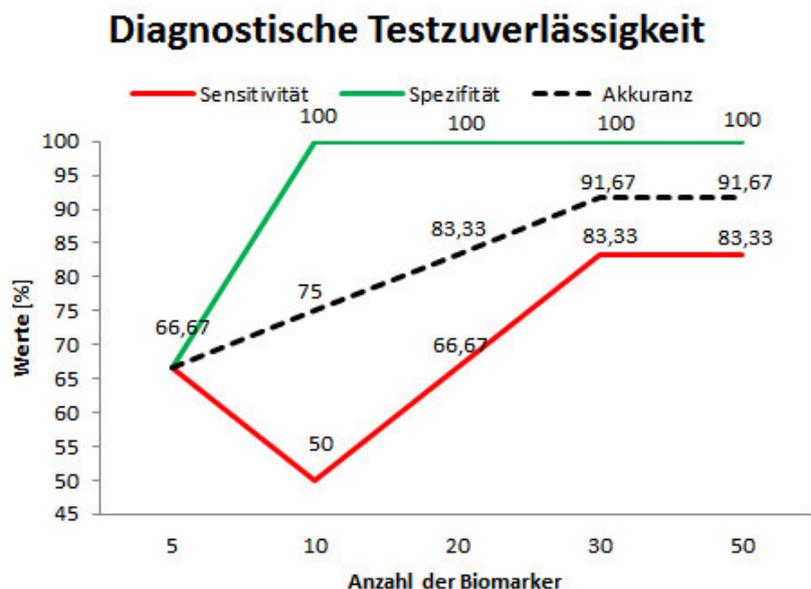
Abbildung 6: HeatMap der Top 37 differenziell exprimierten Proteinen ($p < 0.025$)



Dargestellt ist die graphische Darstellung der 37 am stärksten differenziell exprimierten Proteine. Rot stellen dabei bei ITP verminderte Proteine dar, grün markierte Felder stellen erhöhte Proteinkonzentrationen dar. Das Dendrogramm (hierarchische Clusteranalyse) über der HeatMap weist bereits eine relativ gute Separierung beider Gruppen auf (Abbildung bislang nicht publiziert).

Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe des „machine learnings“ (binäre Klassifikation) versucht, die Zytokinprofile der Patienten und Kontrollen für die Diagnostik zu nutzen. Dabei wurden die Proteinprofile von wenigen Testdatensätzen genutzt, um zwischen ITP Patienten und Kontrollen zu unterscheiden (Lernphase). Im nächsten Schritt wurden dann für den Klassifikator unbekannte Profile zugeführt, die er dann selbst in „ITP“ oder „Gesund“ klassifizieren musste. Wie aus Abb. 7 hervorgeht, stieg die Akkuranz des diagnostischen Algorithmuses in Abhängigkeit der Anzahl der Biomarker kontinuierlich bis auf 91.67%. Mit einer Anzahl von 10 Biomarkern konnte bereits eine Spezifität von 100% erreicht werden. Dabei lag jedoch die Sensitivität nur bei 50%. Diese konnte weiter auf 83.33% gesteigert werden, wenn z.B. 30 Biomarker in das Kalkül einbezogen wurden. Eine weitere Erhöhung der Anzahl an Biomarkern zeigte jedoch keine weitere Verbesserung der Sensitivität.

Abbildung 7: Testzuverlässigkeit des Klassifikators



Es wurde ein Klassifikator in R geschrieben, der die unterschiedlichen Proteinkonzentrationen zwischen der ITP Patienten ($n = 24$) und der der Kontrollen ($n = 24$) verwendet, um über diese Unterschiede eine Diagnose der ITP zu ermöglichen. In Abhängigkeit der Anzahl an verwendeten Biomarkern kann eine Sensitivität von bis zu 83.33% erreicht werden, bei einer Spezifität von 100% (Akkuranz = 91.67%). Maßgeblich notwendig für den Algorithmus sind die Expressionen von: Metallopeptidase Inhibitor 2 (TIMP2), BCL2-associated X Protein (BAX), Runt-related Transcription factor 3 (RUNX3), Dickkopf WNT Signaling pathways Inhibitor 2 (DKK2) und Proliferation Cell Nuclear Antigen (PCNA).

5. Diskussion

Als systemischer Einflussfaktor wurde ein möglicher Einfluss eines oxidativen Stresses bei ITP Patienten untersucht. Wir konnten zeigen, dass Frauen mit ITP sehr starke Stresswerte (FORT Units) aufweisen. Diese liegen signifikant über den Werten der weiblichen Kontrollen ($p = 0.0027$). Männliche Patienten wiesen hingegen keine erhöhten Gesamtperoxidkonzentrationen auf ($p = 0.0018$). Diese Befunde deuten möglicherweise auf geschlechts-spezifische Unterschiede hin. Es ist bekannt, dass Frauen häufiger als Männer an ITP erkranken [24,25]. Darüber hinaus ist bekannt, dass das Geschlecht mit Unterschieden in der klinischen Präsentation, der Ätiologie, des Verlaufs und des Ausgangs verschiedener Autoimmunerkrankungen assoziiert ist [26]. Eine signifikant verminderte systemische AOC konnte hingegen nicht festgestellt werden. ITP Patienten meiden eher Radikalbildner wie Zigarettenrauch oder Alkohol, konsumieren dafür jedoch Antioxidanzien, was die erwartete verminderte AOC möglicherweise kompensiert haben könnte. Circa 2/3 der ITP Patienten gaben an sich schwach zu fühlen, was eines der Hauptsymptome der ITP darstellt (chronisches Fatigue Syndrom). Ein chronisches Fatigue Syndrom ist bei Individuen mit erhöhtem oxidativen Stress nachweisbar [27], sodass hier ein kausaler Zusammenhang bestehen könnte.

Doch welche Auswirkungen kann ein erhöhter systemischer oxidativer Stress haben?

Erstens: Freie Radikale induzieren möglicherweise direkt die Apoptose der Thrombozyten und reduzieren so die Überlebenszeit in der Peripherie. **Zweitens:** Freie Radikale generieren Neoantigene und kryptische Epitope, welche die Bildung von Autoantikörpern (inkl. Epitope Spreading) fördern. **Drittens:** Freie Radikale regulieren redox-abhängige Zytokine, die Einfluss auf die Immuntoleranz nehmen könnten. Alle drei Aspekte wurden im Rahmen dieser Forschungsarbeit untersucht.

Um zu überprüfen, ob der oxidative Stress einen direkten Einfluss hat, wurde der Redox Status vitaler Thrombozyten mittels der Durchflusszytometrie untersucht. Die Messungen wurden auch nach der Veröffentlichung weiter fortgesetzt. So zeigt die Auswertung von 105 Patientenproben und 69 Kontrollen, dass Thrombozyten von ITP Patienten signifikant mehr freie Radikale bilden ($p < 0.0001$), signifikant über eine verminderte antioxidative Kapazität verfügen ($p < 0.0001$) und dass eine starke Korrelation zwischen beiden Parametern besteht (Spearman $R = 0.5561$, $p < 0.0001$). Geschlechtsspezifische Unterschiede waren auf thrombozytärer Ebene jedoch kaum nachweisbar, obwohl auch hier weibliche ITP Patienten eine gewisse Prädominanz zeigten. Die Analyse der

Enzymaktivitäten ergab, dass mehr reduzierte Glutathion (GSH) durch die Glutathionperoxidase oxidiert (GSSG) wird als durch die Glutathionreduktase zurückgewonnen werden kann. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen einer Studie überein, die mit Hilfe einer Genexpressionsstudie an pädiatrischen ITP Patienten oxidative Stress-vermittelte Signalwege vor allem bei akuter und chronischer ITP festgestellt haben, die ebenfalls einen erhöhten GSH/GSSG Ratio aufweisen [28].

Pro-apoptotische Faktoren sind auch in den kernlosen Thrombozyten enthalten und können die reguläre Lebensdauer von 10 Tagen drastische reduzieren [29,30]. Der intrazelluläre oxidative Stress in den Thrombozyten der ITP Patienten könnte daher möglicherweise über einen beschleunigten Zelltod für die Thrombozytopenie verantwortlich sein. So sind Superoxid Anionen und Wasserstoffperoxide bekannte Faktoren, die eine Apoptose induzieren können [10,11]. Ferner wurde gezeigt, dass Glukokortikosteroide (Dexamethason) die Bildung freier Radikale in Thrombozyten inhibieren [31]. So kann neben einer allgemeinen Immunsuppression der Therapieerfolg eventuell auch durch die verminderte Bildung freier Radikale vermittelt sein.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein oxidativer Stress bereits in den Megakaryozyten vorliegt, der den Redox-Zustand der Thrombozyten erklären könnte. Para-apoptotische Zeichen wurden bereits bei Megakaryozyten von ITP Patienten beschrieben, und könnten möglicherweise auf einen erhöhten oxidativen Stress zurückgeführt werden [32]. Auch ist dadurch eine verminderte Thrombozytenbildung möglich, was sich unter chronischen Bedingungen klinisch als Thrombozytopenie manifestiert.

Die bisherige Diagnose der ITP ist nur durch eine Ausschlussdiagnostik möglich. Als „Goldstandard“ hat sich in der Diagnostik der Nachweis anti-thrombozytärer Autoantikörper (vor allem anti-GPIIb/IIIa und anti-Ib/IX) etabliert. Dabei können Autoantikörper in der Regel nur bei ca. der Hälfte der Patienten nachgewiesen werden [33]. Darüber hinaus sind nicht bei allen Patienten Autoantikörper nachweisbar. Die Sensitivität liegt dabei bei 49 – 66%, die Spezifität bei 78 – 93% [6]. Freie Radikale schädigen alle Arten von Biomolekülen. So können post-translationale Proteinmodifikationen induziert werden, die die Bildung von Autoantigenen begünstigen [8,12]. Bei SLE wurde bereits gezeigt, dass der oxidative Stress das Epitope Spreading ermöglicht [34]. Das könnte auch bei der ITP zutreffen. Daher wurde mit Hilfe zweier

komplementärer Verfahren zum ersten Mal versucht, weitere Autoantigene bei der ITP zu identifizieren.

Es wurden mit MS-AMIDA 16 potenzielle Autoantigene identifiziert. Die Validierung mit Hilfe von DotBlots zeigte jedoch, dass sich diese Antigene nicht als gute Biomarker einer ITP eignen. So konnte z.B. die Hexikonase 1 und E1 Pyruvat-Dehydrogenase nur bei zwei Patienten identifiziert werden. Diese Autoantikörper sind jedoch bei Patienten mit primärer billiären Leberzirrhose (PBL) nachweisbar, sodass hier der Verdacht naheliegt, dass sie durch Sekundärerkrankungen bedingt sein können. In der Tat wurde bereits bei einer Patientin auch eine PBL nachgewiesen. Interessant war jedoch der Nachweis von anti-Filamin Autoantikörpern bei zwei unterschiedlichen Patienten. Anti-Filamin Autoantikörper wurden bereits mit einer Thrombozytopenie assoziiert [35]. Von einem Patienten wurden zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten Serumproben untersucht. Die Antikörper waren lediglich vor- und erst 9 Monate nach der Behandlung mit intravenösen Immunglobulinen (IvlgG) nachweisbar, nicht jedoch innerhalb von 3 bis 6 Monaten nach der IvlgG Gabe. Die genauen Wirkmechanismen von IvlgG sind bislang nicht vollständig aufgeklärt, allerdings werden Neutralisierungen, eine beschleunigte Säuberung und die Prävention vor FC-gamma-Rezeptor Bindungen von Autoantikörpern vermutet [36]. Unser Befund deutet darauf hin, dass IvlgG möglicherweise eine vorübergehenden Depletion von Autoantikörpern verursachen könnte.

Mit Hilfe des Luminexverfahren konnten 22 Autoantigene identifiziert werden, die eine vergleichbare Sensitivität und Spezifität mit dem bestehenden Goldstandard (anti-GPIIb/IIIa) aufwiesen. Luminex ist ein Profilingverfahren mit simultaner Validierung, sodass eine zusätzliche Validierung der Ergebnisse nicht notwendig ist. Interessant war der Befund, dass ca. 50% der mit Luminex identifizierten, potenziellen Autoantigene von Thrombozyten gar nicht exprimiert werden. Dies konnte mit Hilfe einer Thrombozyten-spezifischen Datenbank der Universität Würzburg (Platelet Web) herausgefunden werden [37]. Bei Luminex werden jedoch rekombinant hergestellte Proteine verwendet. Dadurch ist eine sub-optimale Proteinkonformation gegeben, welche falsch-positive sowie falsch-negative Identifizierungen von potenziellen Autoantigenen ermöglichen können. Darüber hinaus ist die diagnostische Aussagekraft von Biomarkern mit einer Sensitivität von ca. 50% und einer Spezifität von ca. 80 – 90% fragwürdig, sodass hier nicht von einer Verbesserung der Diagnostik gesprochen werden kann. Allgemein deuten

die Befunde darauf hin, dass Autoantikörper keine geeigneten Biomarker für die Diagnose der ITP darstellen.

Die dritte Möglichkeit, wie ein oxidativer Stress in die Pathomechanismen der ITP eingreifen könnte ist über die Regulation der Gen- und Proteinexpression. Eine erhöhte Expression von BAFF ermöglicht das Überleben auto-reaktive B-Zellen und trägt so zur Entwicklung einer Autoimmunität bei [16]. Wir konnten zum ersten Mal zeigen, dass die BAFF-Serumspiegel bei Patienten mit aktiver ITP erhöht sind. Dies wurde inzwischen von anderen Arbeitsgruppen bestätigt und als therapeutisches Target vorgeschlagen [38,39]. So wurden bereits mehrere Präparate wie Belimumab (HGS, GSK), BR3-FC (Biogen Idec, Genetech), Atacicept (ZymoGenetics, Merck Serono) und AMG 623 (Amgen, Anthera Pharmaceuticals) entwickelt und in klinischen Studien evaluiert. Interessant jedoch ist die Tatsache, dass BAFF durch oxidativen Stress hochreguliert wird, und mit Hilfe von Antioxidanzien vermindert werden kann [40,41]. Eventuell kann eine gezielte Diät bzw. eine Veränderung des Lebensstils ebenfalls einen positiven Effekt bei der Behandlung der ITP haben.

Neben BAFF ist es sehr wahrscheinlich, dass noch eine Vielzahl weiterer Faktoren existieren, die bei der ITP dysreguliert vorliegen. Um einen möglichst globalen Überblick über eine Vielzahl von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren zu erhalten, wurde ein Antikörper-basiertes Mikroarrayverfahren angewendet, mit dem 750 Faktoren gleichzeitig untersucht werden können. Insgesamt konnten 60 Faktoren identifiziert werden, die statistisch signifikant differenziell zwischen ITP Patienten und Kontrollen exprimiert sind (adj. $p < 0.05$).

Bioinformatisch konnte festgestellt werden, dass vor allem die Transkriptionsfaktoren NF κ B, P53 und AP1 für die Regulation der dysregulierten Faktoren verantwortlich sind (Daten nicht gezeigt). Dabei handelt es sich um bekanntermaßen redox-sensitive Transkriptionsfaktoren [42], was zumindest indirekt ein möglicher Hinweis auf die Involvierung eines oxidativen Stress sein könnte.

Darüber hinaus war es möglich eine diagnostische Softwarelösung zu entwickeln, welche die Proteinmuster verwenden kann um zwischen ITP Patienten und gesunden Kontrollen zu unterscheiden. Wir konnten auf diese Weise eine Spezifität von 100 % sowie eine Sensitivität von 83.33% erreichen, wenn 30 Faktoren in dem Kalkül verwendet werden. Dies ist im Vergleich zum derzeitigen diagnostischen Goldstandard (anti-GPIIb/IIIa,

Sensitivität 49 – 66% und Spezifität von 78 – 93%) eine deutliche Verbesserung. Problematisch war jedoch, dass einige Chips aus der Studie ausgeschlossen werden mussten, sodass letztlich nur noch 8 Patientenproben mit aktiver ITP integriert werden konnten. Daher sind weitere Analysen zukünftig notwendig, um den Algorithmus zu optimieren.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein systemischer sowie ein thrombozytärer oxidativer Stress bei der Mehrheit der ITP Patienten nachgewiesen werden. Ob der oxidative Stress die Ursache oder nur eine Folge der zugrundeliegenden Pathomechanismen darstellt, kann nicht differenziert werden. Es ist jedoch allgemein akzeptiert, dass sich ein chronischer oxidativer Stress negativ auf einen Organismus auswirkt. Die Reduzierung des oxidativen Stresses ist daher sinnvoll. Antioxidative Therapien z.B. mit hochdosiertem Vitamin C zeigten nicht immer den gewünschten Effekt [43], aber antioxidative Therapien für die ITP zu evaluieren sind immer wieder Gegenstand aktueller Forschungsbemühungen [44]. Vielleicht sollten auch Therapiestrategien entwickelt werden, die die Bildung freier Radikale reduzieren statt lediglich zu versuchen, bereits gebildete freie Radikale zu neutralisieren. Auf diese Weise kann eventuell der oxidativ-vermittelten Immunmodulierung entgegengewirkt und eine balancierte interzelluläre Kommunikation von Immunzellen wieder hergestellt werden. Antikörper-basierte Mikroarrays gewinnen zunehmend an Bedeutung. In Zukunft können Biomarkerprofile nicht nur spezifisch Krankheiten diagnostizieren, sondern auch den Krankheitsstatus feststellen, den Therapieerfolg überwachen und zur Entwicklung neuer Therapiestrategien beitragen. Derzeit arbeiten viele Firmen daran, kostengünstige, multiparametrische Verfahren für eine personalisierte Medizin zu entwickeln. Da die ITP eine komplexe-, multifaktorielle Erkrankung darstellt [5], würden vor allem ITP Patienten von solchen Entwicklungen in der Zukunft profitieren.

6. Referenzen

1. Stasi R, Newland AC (2011) ITP: a historical perspective. *Br J Haematol* 153: 437-450.
2. Salama A (2011) Current treatment options for primary immune thrombocytopenia. *Expert Rev Hematol* 4: 107-118.
3. Harrington WJ, Minnich V, Hollingsworth JW, Moore CV (1951) Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. *J Lab Clin Med* 38: 1-10.
4. Cines DB, Bussel JB, Liebman HA, Luning Prak ET (2009) The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity. *Blood* 113: 6511-6521.
5. Stasi R, Evangelista ML, Stipa E, Buccisano F, Venditti A, et al. (2008) Idiopathic thrombocytopenic purpura: current concepts in pathophysiology and management. *Thromb Haemost* 99: 4-13.
6. McMillan R (2003) Antiplatelet antibodies in chronic adult immune thrombocytopenic purpura: assays and epitopes. *J Pediatr Hematol Oncol* 25 Suppl 1: S57-61.
7. Johnsen J (2012) Pathogenesis in immune thrombocytopenia: new insights. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012: 306-312.
8. Kannan S (2006) Free radical theory of autoimmunity. *Theor Biol Med Model* 3: 22.
9. Selye H (1950) The physiology and pathology of exposure to stress, a treatise based on the concepts of the general-adaptation-syndrome and the disease of adaptation. Montreal: ACTA, Inc, Medical Publishers.
10. Straface E, Gambardella L, Metere A, Marchesi A, Palumbo G, et al. (2010) Oxidative stress and defective platelet apoptosis in naive patients with Kawasaki disease. *Biochem Biophys Res Commun* 392: 426-430.
11. Filomeni G, Ciriolo MR (2006) Redox control of apoptosis: an update. *Antioxid Redox Signal* 8: 2187-2192.
12. Chou MY, Fogelstrand L, Hartvigsen K, Hansen LF, Woelkers D, et al. (2009) Oxidation-specific epitopes are dominant targets of innate natural antibodies in mice and humans. *J Clin Invest* 119: 1335-1349.
13. Kurien BT, Hensley K, Bachmann M, Scofield RH (2006) Oxidatively modified autoantigens in autoimmune diseases. *Free Radic Biol Med* 41: 549-556.
14. Kurien BT, Scofield RH (2008) Autoimmunity and oxidatively modified autoantigens. *Autoimmun Rev* 7: 567-573.
15. Filion MC, Proulx C, Bradley AJ, Devine DV, Sekaly RP, et al. (1996) Presence in peripheral blood of healthy individuals of autoreactive T cells to a membrane antigen present on bone marrow-derived cells. *Blood* 88: 2144-2150.
16. Thien M, Phan TG, Gardam S, Amesbury M, Basten A, et al. (2004) Excess BAFF rescues self-reactive B cells from peripheral deletion and allows them to enter forbidden follicular and marginal zone niches. *Immunity* 20: 785-798.
17. George JN, Woolf SH, Raskob GE, Wasser JS, Aledort LM, et al. (1996) Idiopathic thrombocytopenic purpura: a practice guideline developed by explicit methods for the American Society of Hematology. *Blood* 88: 3-40.
18. Neunert C, Lim W, Crowther M, Cohen A, Solberg L, Jr., et al. (2011) The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. *Blood* 117: 4190-4207.
19. Begonja AJ, Teichmann L, Geiger J, Gambaryan S, Walter U (2006) Platelet regulation by NO/cGMP signaling and NAD(P)H oxidase-generated ROS. *Blood Cells Mol Dis* 36: 166-170.
20. He B, Raab-Traub N, Casali P, Cerutti A (2003) EBV-encoded latent membrane protein 1 cooperates with BAFF/BLyS and APRIL to induce T cell-independent Ig heavy chain class switching. *J Immunol* 171: 5215-5224.
21. Kamhieh-Milz J, Salama A (2014) Oxidative stress is predominant in female but not in male patients with autoimmune thrombocytopenia. *Oxid Med Cell Longev* 2014: 720347.
22. Kamhieh-Milz J, Bal G, Sterzer V, Kamhieh-Milz S, Arbach O, et al. (2012) Reduced antioxidant capacities in platelets from patients with autoimmune thrombocytopenia purpura (ITP). *Platelets* 23: 184-194.
23. Emmerich F, Bal G, Barakat A, Milz J, Muhle C, et al. (2007) High-level serum B-cell activating factor and promoter polymorphisms in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 136: 309-314.

24. Schoonen WM, Kucera G, Coalson J, Li L, Rutstein M, et al. (2009) Epidemiology of immune thrombocytopenic purpura in the General Practice Research Database. *Br J Haematol* 145: 235-244.
25. Frederiksen H, Schmidt K (1999) The incidence of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults increases with age. *Blood* 94: 909-913.
26. Ortona E, Margutti P, Matarrese P, Franconi F, Malorni W (2008) Redox state, cell death and autoimmune diseases: a gender perspective. *Autoimmun Rev* 7: 579-584.
27. Kennedy G, Spence VA, McLaren M, Hill A, Underwood C, et al. (2005) Oxidative stress levels are raised in chronic fatigue syndrome and are associated with clinical symptoms. *Free Radic Biol Med* 39: 584-589.
28. Zhang B, Lo C, Shen L, Sood R, Jones C, et al. (2011) The role of vanin-1 and oxidative stress-related pathways in distinguishing acute and chronic pediatric ITP. *Blood*.
29. Mason KD, Carpinelli MR, Fletcher JI, Collinge JE, Hilton AA, et al. (2007) Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell* 128: 1173-1186.
30. Qi B, Hardwick JM (2007) A Bcl-xL timer sets platelet life span. *Cell* 128: 1035-1036.
31. Nardi MA, Gor Y, Feinmark SJ, Xu F, Karpatkin S (2007) Platelet particle formation by anti GPIIIa49-66 Ab, Ca²⁺ ionophore A23187, and phorbol myristate acetate is induced by reactive oxygen species and inhibited by dexamethasone blockade of platelet phospholipase A2, 12-lipoxygenase, and NADPH oxidase. *Blood* 110: 1989-1996.
32. Houwerzijl EJ, Blom NR, van der Want JJ, Esselink MT, Koornstra JJ, et al. (2004) Ultrastructural study shows morphologic features of apoptosis and para-apoptosis in megakaryocytes from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood* 103: 500-506.
33. Najaoui A, Bakchoul T, Stoy J, Bein G, Rummel MJ, et al. (2012) Autoantibody-mediated complement activation on platelets is a common finding in patients with immune thrombocytopenic purpura (ITP). *Eur J Haematol* 88: 167-174.
34. Scofield RH, Kurien BT, Ganick S, McClain MT, Pye Q, et al. (2005) Modification of lupus-associated 60-kDa Ro protein with the lipid oxidation product 4-hydroxy-2-nonenal increases antigenicity and facilitates epitope spreading. *Free Radic Biol Med* 38: 719-728.
35. Nurden P, Debili N, Coupry I, Bryckaert M, Youlyouz-Marfak I, et al. (2011) Thrombocytopenia resulting from mutations in filamin A can be expressed as an isolated syndrome. *Blood* 118: 5928-5937.
36. Tha-In T, Bayry J, Metselaar HJ, Kaveri SV, Kwekkeboom J (2008) Modulation of the cellular immune system by intravenous immunoglobulin. *Trends Immunol* 29: 608-615.
37. Boyanova D, Nilla S, Birschmann I, Dandekar T, Dittrich M (2012) PlateletWeb: a systems biologic analysis of signaling networks in human platelets. *Blood* 119: e22-34.
38. Yu HM, Liu YF, Hou M (2008) BAFF - an essential survival factor for B cells: Links to genesis of ITP and may be of therapeutic target. *Med Hypotheses* 70: 40-42.
39. Semple JW (2009) ITP has elevated BAFF expression. *Blood* 114: 5248-5249.
40. Moon EY, Lee JH, Oh SY, Ryu SK, Kim HM, et al. (2006) Reactive oxygen species augment B-cell-activating factor expression. *Free Radic Biol Med* 40: 2103-2111.
41. Tada F, Abe M, Kawasaki K, Miyake T, Shiyi C, et al. (2013) B cell activating factor in obesity is regulated by oxidative stress in adipocytes. *J Clin Biochem Nutr* 52: 120-127.
42. Tell G, Quadrifoglio F, Tiribelli C, Kelley MR (2009) The many functions of APE1/Ref-1: not only a DNA repair enzyme. *Antioxid Redox Signal* 11: 601-620.
43. Jubelirer SJ (1993) Pilot study of ascorbic acid for the treatment of refractory immune thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol* 43: 44-46.
44. Elalfy MS, Elhenawy YI, Deifalla S, Hegazy M, Sabra A, et al. (2015) Oxidant/antioxidant status in children and adolescents with immune thrombocytopenia (ITP) and the role of an adjuvant antioxidant therapy. *Pediatr Blood Cancer* 62: 830-837.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Julian Kamhieh-Milz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung der Pathomechanismen der Autoimmunthrombozytopenie (AITP)“ 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 den ausgewählten Publikationen 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

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Dipl. Ing. Julian Kamhieh-Milz hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Impact Factor: **3.363**

Kamhieh-Milz J, Salama A. Oxidative Stress Is predominant in Females but not in Male Patients with Autoimmune Thrombocytopenia (AITP). *Oxid. Med. Cell. Longev.* Article ID 720347. 9 pages. (2014)

Beitrag im Einzelnen: Rekrutierung der Patienten, Untersuchung der Patienten mit dem FORT und FORD assay, statistische Auswertung der Messdaten, statistische Auswertung des Fragebogens, Anfertigung der Publikation. **Anteil: 80%.**

Publikation 2: Impact Factor: **2.374**

Kamhieh-Milz J, Bal G, Sterzer V, Kamhieh-Milz S, Arbach O, Salama A. Reduced antioxidant capacities in platelet from patients with autoimmune thrombocytopenia purpura (ITP), *Platelets.* 23(3):184-94 (2012)

Beitrag im Einzelnen: Rekrutierung der Patientenproben, Etablierung der durchflusszytometrischen Bestimmungen, Durchführung des FACS Screenings, FACS-Auswertung mit FlowJo, Durchführung von ELISA, statistische Auswertungen mit SPSS19, Anfertigen der Publikation **Anteil: 90 %.**

Publikation 3: Impact Factor: **4.959**

Emmerich F, Bal G, Barakat A, **Milz J**, Mühle C, Martinez-Gamboa L, Dörner T, Salama A. High-level serum B-cell activating factor and promoter polymorphisms in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura., *Br J Haematol.* 136(2):309-14. (2007)

Beitrag im Einzelnen: Bearbeitung und Archivierung des Patientenmaterials, RNA und DNA Isolierung, Durchführung der PCR Messungen, Beitrag bei der Auswertung der Sequenzierungsdaten zum BAFF-Promotor, Proofreading des Manuskripts. **Anteil: 50%.**

Impact Factors (Gesamt): **10.696**

Unterschrift, Datum und Stempel
des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

Lebenslauf

Der Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht veröffentlicht.

Vollständige Publikationsliste

Veröffentlichte Manuskripte

Emmerich F, Bal G, Barakat A, **Milz J**, Mühle C, Martinez-Gamboa L, Dörner T, Salama A. High-level serum B-cell activating factor and promoter polymorphisms in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 136(2):309-14. (2007)

Bal G, **Kamhieh-Milz J**, Futschik M, Haupl T, Salama A, Moldenhauer A. Transcriptional profiling of the hematopoietic support of interleukin-stimulated human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). *Cell Transplant.* 21(1):251-67. (2012)

Kamhieh-Milz J, Bal G, Sterzer V, Kamhieh-Milz S, Arbach O, Salama A. Reduced antioxidant capacities in platelet from patients with autoimmune thrombocytopenia purpura (ITP). *Platelets.* 23(3):184-94. (2012)

Bal G, **Kamhieh-Milz J**, Sterzer V, Al-Samman M, Debski J, Klein O, Kamhieh-Milz S, Bhakdi S, Salama A. Proteomic profiling of the hematopoietic support of interleukin-stimulated human umbilical vein endothelial cells. *Cell Transplant.* 22(7):1185-99. (2013)

Kamhieh-Milz J, Salama A. Oxidative Stress Is predominant in Females but not in Male Patients with Autoimmune Thrombocytopenia (AITP). *Oxid. Med. Cell. Longev.* Article ID 720347. 9 pages. DOI: 10.1155/2014/402475. (2014)

Kamhieh-Milz J, Bartl B, Sterzer V, Kamhieh-Milz S, Salama A. Storage of RBCs results in an increased susceptibility for complement-mediated degradation *Transfus. med.* Dec;24(6): 392-9. (2014)

Kamhieh-Milz J, Mofteh RFH, Bal G, Futschik M, Sterzer V, Khorramshahi O, Burow M, Thiel G, Stuke-Sontheimer A, Chaoui R, Kamhieh-Milz S, Salama A. Differentially expressed microRNAs in maternal plasma for the non-invasive prenatal diagnosis of Down syndrome (Trisomy 21) *BioMed Research International – Obstetrics and Gynecology.* (2014)

Bal G, Futschik M, Hartl D, Ringel F, **Kamhieh-Milz J**, Sterzer V, Hoheisel J, Alhamadani M, Salama A. Identification of novel biomarkers in chronic autoimmune thrombocytopenia (ITP) by microarray-based serum protein profiling. *Br J Haematol* (akzeptiert)

Kamhieh-Milz S, **Kamhieh-Milz J**, Tauchmann Y, Ostermann T, Shah Y, Kalus U, Salama A, Michalsen A. Regular blood donation may help in the management of hypertension: an observational study on 292 blood donors. *Transfusion* (akzeptiert).

Abstract 1

Oxidative stress is predominant in female but not in male patients with autoimmune thrombocytopenia.

Kamhieh-Milz J, Salama A.

As the involvement of oxidative stress (OS) in autoimmune thrombocytopenia (AITP) has been reported, a fast and rapid test for the reliable measurement of OS and antioxidant capacities (AOCs) might be a useful tool in extending current diagnostic possibilities. The free oxygen radical test (FORT) and free oxygen radical defence (FORD) assay (Callegari, Italy) are easy to perform and reliable, with results available within 15 minutes. Thirty-seven AITP patients and 37 matched healthy individuals were included in this study. All participants responded to a standard questionnaire provided by these assays. Female patients with AITP were observed to demonstrate significantly higher OS in comparison to female controls ($P = 0.0027$) and male AITP patients ($P = 0.0018$). The AOCs were not reduced in patients with AITP ($P = 0.7648$). Correlation of OS with platelet count identified a weak positive correlation ($P = 0.0327$, Spearman $R = 0.4672$). The questionnaire revealed that ITP patients in comparison to healthy controls are more stressed, feel exhausted and fatigued, and eat a healthier diet. In conclusion, OS is predominant in female but not in male patients with AITP suggesting gender-specific differences in the pathomechanisms of AITP. Identification of patients with high levels of OS might be beneficial in the management of AITP.

Oxid Med Cell Longev. 2014;2014:720347. doi: 10.1155/2014/720347

<http://dx.doi.org/10.1155/2014/720347>

Abstract 2

Reduced antioxidant capacities in platelets from patients with autoimmune thrombocytopenia purpura (ITP).

Kamhieh-Milz J, Bal G, Sterzer V, Kamhieh-Milz S, Arbach O, Salama A.

Autoimmune thrombocytopenic purpura (ITP) is characterized by an abnormally low platelet count and bleeding risks. The exact triggering event remains elusive. Oxidative stress may play a role in several autoimmune diseases. A direct link between platelets in ITP and oxidative stress has not yet been addressed. The intracellular platelet antioxidant capacity (AOC) in ITP patients in the active phase (n = 24) and remission (n = 12), and 44 healthy controls were analysed with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and in combination with hydrogen peroxide. Enzyme activities (EA) of serum glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GRed) and catalase (CAT) were investigated colourimetrically in patients and controls. The AOC of ITP patients in the active phase was drastically reduced, with significantly high mean fluorescence intensity values. Higher GPx activity was observed in both active phase and remission in comparison to healthy controls ($p < 0.001$), with greater activity observed in active ITP than remission ($p = 0.001$). However, GRed EA was not elevated indicating that reduced glutathione (GSH) is not comparably recovered as consumed, leading to a decreased bioavailability of GSH and increased oxidative stress. These results suggest that oxidative stress is implicated in active ITP and may play a crucial role in its pathophysiology.

Platelets. 2012;23(3):184-94. doi:10.3109/09537104.2011.610909

<http://dx.doi.org/10.3109/09537104.2011.610909>

Abstract 3

High-level serum B-cell activating factor and promoter polymorphisms in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura.

Emmerich F, Bal G, Barakat A, **Milz J**, Mühle C, Martinez-Gamboa L, Dörner T, Salama A.

Idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) is an autoimmune disorder in which platelets are opsonised by autoantibodies and destroyed by macrophages. Therefore, ITP represents a prototype of a B-cell-mediated autoimmune disorder. B-cell activating factor (BAFF) is a member of the tumour necrosis factor family and an important regulator of B-cell development. BAFF levels were determined in serum samples from 53 patients with ITP. Serum BAFF levels in patients with an active ITP were increased when compared with the healthy control group (median 1620 pg/ml vs. 977 pg/ml; $P < 0.001$). Moreover, immunosuppressive treatment was associated with strongly suppressed BAFF levels (median 629 pg/ml; $P < 0.01$). In addition, a polymorphic site was detected in the BAFF promoter region (-871) that appeared to occur more frequently in ITP patients than in healthy persons. This promoter variant was associated with very high BAFF levels in ITP patients. Our data suggest that BAFF is an important pathogenetic factor in the development of ITP.

Br J Haematol. 2007 Jan;136(2):309-14. doi:10.1111/j.1365-2141.2006.06431.x

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.06431.x>

Danksagung

Ich danke meinen Doktorvater Prof. Dr. Salama, dass er mir dieses spannende Thema für meine Doktorarbeit überlassen hat, sowie für seine Unterstützung. Ich danke ihm, dass er mir die Möglichkeit eingeräumt hat, meine eigene Arbeitsgruppe gegen Ende meiner Promotion an seinem Institut zu gründen und hoffe weiterhin auf eine gute Zusammenarbeit in der Zukunft.

Ich danke Herrn Viktor Sterzer, dass er mich bei der Bewältigung der Aufgaben tatkräftig zu Seite stand und den Schwestern der Blutspende, die mich immer freundlichst mit Blutproben unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau und meinen beiden Töchtern, insbesondere für ihr Verständnis, ihre Geduld und Anspruchslosigkeit gegenüber ihres Ehemanns und Vaters in den letzten Jahren, da diese Arbeit einen Großteil meiner (selbst freien) Zeit in Anspruch genommen hat. Und ich danke meiner ganzen Familie für den Rückhalt in den letzten Jahren.