

Aus dem Labor für Pädiatrische Molekularbiologie
der Klinik für Allgemeine Pädiatrie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Entwicklung einer erweiterten Diagnostik von
Thrombozytopenien und Thrombozytopathien mittels
Multi-Farben-Durchflusszytometrie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katja Henning

aus Bad Salzungen

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. H. Schulze
2. Prof. Dr. C. Dame
3. Prof. Dr. med. K. H. Welte

Datum der Promotion: 30.11.2012

Für meinen Vater
Ludwig Henning
(1946 - 1998)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben ganz herzlich bedanken.

Herrn PD Dr. Harald Schulze möchte ich für eine hervorragende Betreuung und die Überlassung eines für mich zu jeder Zeit sehr spannenden Promotionsthemas danken.

Janine Fiedler danke ich für die Einarbeitung in die technischen Grundlagen der Durchflusszytometrie. Mein herzlichster Dank geht außerdem an Silke Schwiebert für Ihre immer wehrende Hilfsbereitschaft in allen Angelegenheiten. Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern des Labors für pädiatrische Molekularbiologie bedanken mit denen ich zusammenarbeiten durfte.

Dr. Susanne Holzhauer und Dr. Gabriele Strauß, sowie den Mitarbeitern des HLA-Labors für die gute Zusammenarbeit. Frau Strauß danke ich außerdem für das Korrekturlesen der Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an Imke Meyer nicht nur für das Korrekturlesen und die produktiven fachlichen Diskussionen.

Für die besten Skype-Motivations-Gespräche möchte ich mich bei Friedel bedanken.

Ein ganz herzlicher Dank geht an meine Familie, besonders an meine Mutter, die mir immer ein großer Rückhalt war.

Wolle danke ich ganz besonders für seine nicht enden wollende Geduld, für das Korrekturlesen und die Hilfe beim Layout der Arbeit, sowie für die ständige herausragende kulinarische Versorgung.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	IV
Glossar	VIII
1. Einleitung	1
1.1. Thrombozyten und Thrombozytenfunktion	1
1.1.1. Thrombozytenmorphologie und Thrombopoese	1
1.1.2. Thrombozytenadhäsion	2
1.1.3. Thrombozytenaggregation	4
1.2. Störungen der primären Hämostase	4
1.2.1. Thrombozytopathien	5
1.2.2. Thrombozytopenien	7
1.3. Aktuelle Diagnostikmethoden bei Verdacht auf eine Störung der primären Hämostase	9
1.3.1. Blutungsanamnese und körperliche Untersuchung	9
1.3.2. Basis-Laborparameter	9
1.3.3. PFA-100®.....	10
1.3.4. Aggregometrie	10
1.3.5. Durchflusszytometrie	11
1.3.6. Sonstige Diagnostikmethoden	12
1.4. Diagnostische Herausforderung „Unklare Blutungsneigung/Thrombozytopenie/Thrombozytopathie“	13
1.4.1. Verschiedene Diagnostik-Algorithmen	13
1.4.2. Aktuelle Probleme in der Diagnostik	14
1.5. Zielsetzung	16
2. Material und Methoden	17
2.1. Gesundspender und Patienten	17
2.2. Verwendete Geräte und Software	17
2.3. Verwendete Chemikalien und Biochemikalien	18

2.4. Charakterisierung der Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie	20
2.4.1. Aufbau und technische Grundlagen.....	20
2.4.2. Optische Messung, Auswahl der Fluorochrome und Kompensation	21
2.4.3. Kontrollen.....	23
2.4.4. Datenauswertung.....	23
2.5. Färbe- und Messprotokolle	24
2.5.1. Immunfluoreszenzfärbung und Funktionsbeurteilung der Thrombozyten	24
2.5.2. Messung der intrazellulären Calciummobilisierung.....	25
2.5.3. Mepacrin-Assay	26
3. Ergebnisse	27
3.1. Basismodul zur Immunphänotypisierung und Funktionsbeurteilung der Thrombozyten	27
3.1.1. Konzept.....	27
3.1.2. Auswertungsstrategie	29
3.1.3. Qualitätskontrollen	31
3.1.4. Variabilität der Rezeptorexpression und Thrombozytenfunktion von Gesundspendern	34
3.2. Zusätzliche Module.....	38
3.2.1. Mepacrin-Assay	38
3.2.2. Messung der intrazellulären Calciummobilisation	39
3.3. Analyse von Patienten mit Thrombozytopathie.....	40
3.3.1. Leukozyten-Adhäsions-Defizienz Typ III (LAD-III)	40
3.3.2. Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS) nach Stammzelltransplantation.....	42
3.3.3. Akute Myeloische Leukämie (AML) mit Transplantationsindikation	43
3.4. Analyse von Patienten mit vermuteter Thrombozytenfunktionsstörung	46
3.4.1. Thrombozytopenie mit Radius-Aplasie-Syndrom (TAR)	46
3.4.2. Sichelzellanämie (SCA)	48
3.4.3. Chronische Immunthrombozytopenie (cITP)	48
3.5. Zusammenfassung aller Ergebnisse des Basismoduls.....	51
3.6. Analyse unklarer Thrombozytopenien und Thrombozytopathien im klinischen Kontext.....	52
3.6.1. Fall 1	52
3.6.2. Fall 2	53

4. Diskussion	55
4.1. Verbesserte Diagnostik bei unklaren Blutungsneigungen durch die Multi-Farben-Durchflusszytometrie	55
4.1.1. Optimierung der Methode	56
4.1.2. Probenvorbereitung und Messbedingungen	57
4.1.3. Wahl der Kontroll- und Patientenpopulationen.....	59
4.2. Einsatz von Basis- und erweiterten Diagnostikmodulen	63
4.2.1. Aussagekraft des Basismoduls.....	63
4.2.2. Einsatz und Aussagekraft erweiterter Diagnostikmodule.....	72
4.2.3. Algorithmus zur Abklärung unklarer Blutungsneigungen mittels Durchflusszytometrie	73
4.3. Ausblick	76
5. Zusammenfassung.....	77
6. Abstract.....	79
7. Literaturverzeichnis	80
Eidesstattliche Erklärung	X
Curriculum Vitae.....	XI
Publikationen	XII

Glossar

*	signifikant, p-Wert < 0,05
**	stark signifikant, p-Wert < 0,01
ADAM	„A Disintegrin And Metalloproteinase“
ADAMTS	„A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs“
ADP	Adenosindiphosphat
AML	Akute Myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
aPTT	aktivierte Prothrombinzeit
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Becton Dickinson
BP	Bandpass
BSA	Bovines Serum Albumin
BSS	Bernard-Soulier-Syndrom
Ca	Calcium
CAMT	„Congenital Amegakaryocytic Thrombocytopenia“, Amegakaryozytäre Thrombozytopenie
CD	„Cluster of Differentiation“
CRP	„Collagen Related Peptide“
CT	„Closure Time“
DAG	Diacylglycerol
DGKL	Deutsche Vereinte Gesellschaft für klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin e.v.
DTS	Dichtes tubuläres System
ELISA	„Enzyme-linked Immunosorbent Assay“
FACS	„Fluorescence Activating Cell Sorting“
FAB	„French-American-British“
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FMO	„Fluorescence Minus One“
FSC	„Forward Scatter“, Vorwärtsscatter
GP	Glykoprotein
GTH	Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde
HSCT	„Hematopoietic Stem Cell Transplantation“, hämatopoetische Stammzelltransplantation
INR	„International Normalized Ratio“
IP₃	Inositol-(1,4,5)-trisphosphat
IPF	„Immature Platelet Fraction“
(c)ITP	(Chronische) Immunthrombozytopenie
LAD-III	Leukozyten Adhäsionsdefizienz Typ III
LP	Langpass

m	männlich
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
Mg	Magnesium
MG	Morbus Glanzmann
min	Minuten
MPV	„Mean Platelet Volume“, Mittleres Plättchenvolumen
n.s.	nicht signifikant
P	Phosphat
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	Tandemfarbstoff Phycoerythrin/Cyanin 5
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
Perz.	Perzentile
PF4	Plättchen Faktor 4
PI3K	PI 3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PLCβ	Phospholipase C β
PLCγ	Phospholipase C γ
PRP	Plättchenreiches Plasma
RIAM	„Rap1-GTP Interacting Adapter Molecule“
SD	Standardabweichung
sec, s	Sekunden
SFKs	„Src Family Kinase“
SPD	„Storage Pool Disease“
Src	„Sarcoma“
SSC	„Side Scatter“, Seitwärtsscatter
SCA	„Sickle Cell Anemia“, Sichelzellanämie
TAR	Thrombozytopenie mit Radius-Aplasie-Syndrom
TPO	Thrombopoietin
TRAP6	„Thrombin Receptor Activation Peptide 6“
TTP	Thrombozytopenisch thrombotische Purpura
TXA2	Thromboxan A2
u.a.	unter anderem
vWF, vWS	von-Willebrand-Faktor, von-Willebrand-Syndrom
w	weiblich
WASP	Wiskott-Aldrich-Syndrom Protein
Z.n.	Zustand nach

1. Einleitung

1.1. Thrombozyten und Thrombozytenfunktion

1.1.1. Thrombozytenmorphologie und Thrombopoese

Thrombozyten stellen den kleinsten korpuskulären Anteil unseres Blutes dar und sind essentieller Bestandteil der primären Hämostase. Die kernlosen, subzellulären Partikel mit einer Größe von $3 - 4 \times 0,5 \mu\text{m}$ und einem Volumen von $7 - 11 \text{ fl}$ zirkulieren im unstimulierten Zustand in diskoider Form (Abb. 1A).^{1,2,3} Pro μl Blut gesunder Menschen findet man $150.000 - 450.000$ Thrombozyten. Die Bildung der Thrombozyten, die Thrombopoese, findet überwiegend im Knochenmark statt. Hier reifen hämatopoetische Stammzellen durch die Wirkung von Thrombopoietin (TPO) zu Megakaryozyten aus.⁴ Aus jedem Megakaryozyten gehen Proplättchen hervor, aus denen wiederum durch Abschnürungen bis zu 1.000 Thrombozyten entstehen.⁵ Knochenmarknischen, welche durch Chemokine, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion Einfluss auf die Differenzierung von der Stammzelle zum reifen Megakaryozyten haben, sind bisher nur wenig charakterisiert.⁶ Nach einer durchschnittlichen Überlebenszeit von $7 - 10$ Tagen werden die Thrombozyten hauptsächlich in der Milz abgebaut.^{1,7}

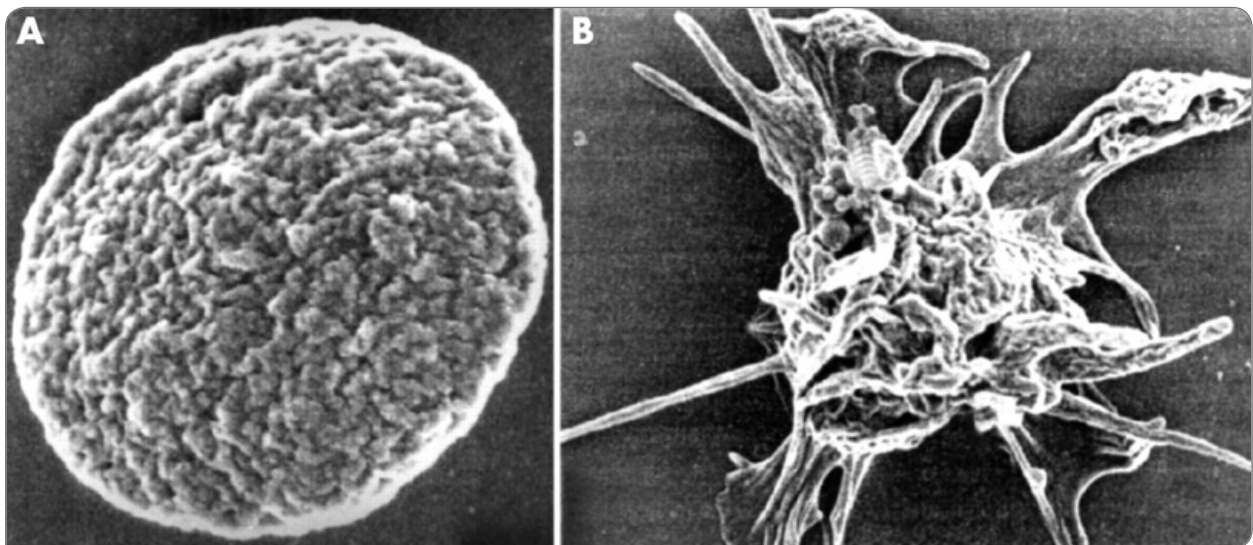


Abb. 1 **A** Zirkulierender, nicht aktivierter Thrombozyt. **B** Thrombozyt im aktivierten Zustand. (Quelle: Knight 2003³)

Rezeptoren und Zellorganellen

In die Membran der Thrombozyten sind viele verschiedene Glykoproteine (GP) und G-Protein gekoppelte Rezeptoren eingelagert, über die zahlreiche Signale vermittelt werden.^{8, 9} Die wichtigsten Rezeptoren, ihre Eigenschaften und Liganden sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Im Zytoplasma der Thrombozyten finden sich neben den Mitochondrien, Lysosomen und einem dichten tubulären System (DTS) verschiedene Speichergranula.^{1,2} Die α -Granula (ca. 80 pro Plättchen) enthalten Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin, von Willebrand-Faktor (vWF), Fibrinogen, Fibronectin etc., Gerinnungsfaktoren (Faktor V, VIII, Multimerin) und weitere Proteine wie z.B. Chemokine. Die δ -Granula, oder auch dichte Granula (ca. 3-9 pro Plättchen), enthalten Ionen (Ca, Mg, P, Pyrophosphate), Nukleotide (ATP, GTP, ADP, GDP), sowie die Membranproteine CD63 (LAMP-3) und LAMP-2.^{1,8,10} In den lysosomalen Granula ist neben CD63 und LAMP-2 auch das Membranprotein LAMP-1 zu finden.

Tabelle 1 Rezeptoren der Thrombozyten und ihre jeweiligen Hauptliganden

GP / Name	Eigenschaften	Hauptligand / Agonist	Kopien / Plättchen
GPIIb-IIIa	Integrin α IIb β 3	Fibrinogen, vWF	80.000 - 100.000
GPIb-IX-V	leucinreich	vWF	50.000
GPIa-IIa	Integrin α 2 β 1	Kollagen	2.000 - 4.000
GPVI	Immunglobulin	Kollagen	?
GPIc-IIa	Integrin α 5 β 1	Fibronectin	?
GPIc-IIa	Integrin α 6 β 1	Laminin	?
Vitronectin Rezeptor	Integrin α V β 3	Vitronectin	wenige 100
PAR1	G _q , G _i , G ₁₂ gekoppelt	Thrombin	2.000
PAR4	G _q , G ₁₂ gekoppelt	Thrombin	?
P2Y1	G _q , G ₁₂ gekoppelt	ADP	150
P2Y12	G _i gekoppelt	ADP	600
TP α / β	G _q , G ₁₂ gekoppelt	Thromboxan A ₂	1.000
α _{2A} -adrenerg	G _i gekoppelt	Epinephrin	300
IP	G _s	PGI ₂	?

1.1.2. Thrombozytenadhäsion

Die Rezeptoren der Thrombozyten übernehmen im Rahmen der Thrombusentstehung verschiedene Aufgaben. Wird das Gefäßendothel verletzt, tritt die subendotheliale Matrix, welche Adhäsionsmoleküle wie Fibrinogen, Fibronectin, Laminin, vWF und Kollagen enthält, in Kontakt mit dem Blut und setzt so die Hämostase in Gang.¹¹ Diese unterteilt sich in eine primäre (zelluläre) und eine sekundäre (plasmatische) Komponente. Bei der primären Hämostase binden Thrombozyten vor allem über den GPIb-V-IX-Komplex an subendotheliale vWF und es kommt zur Translokation dieser an

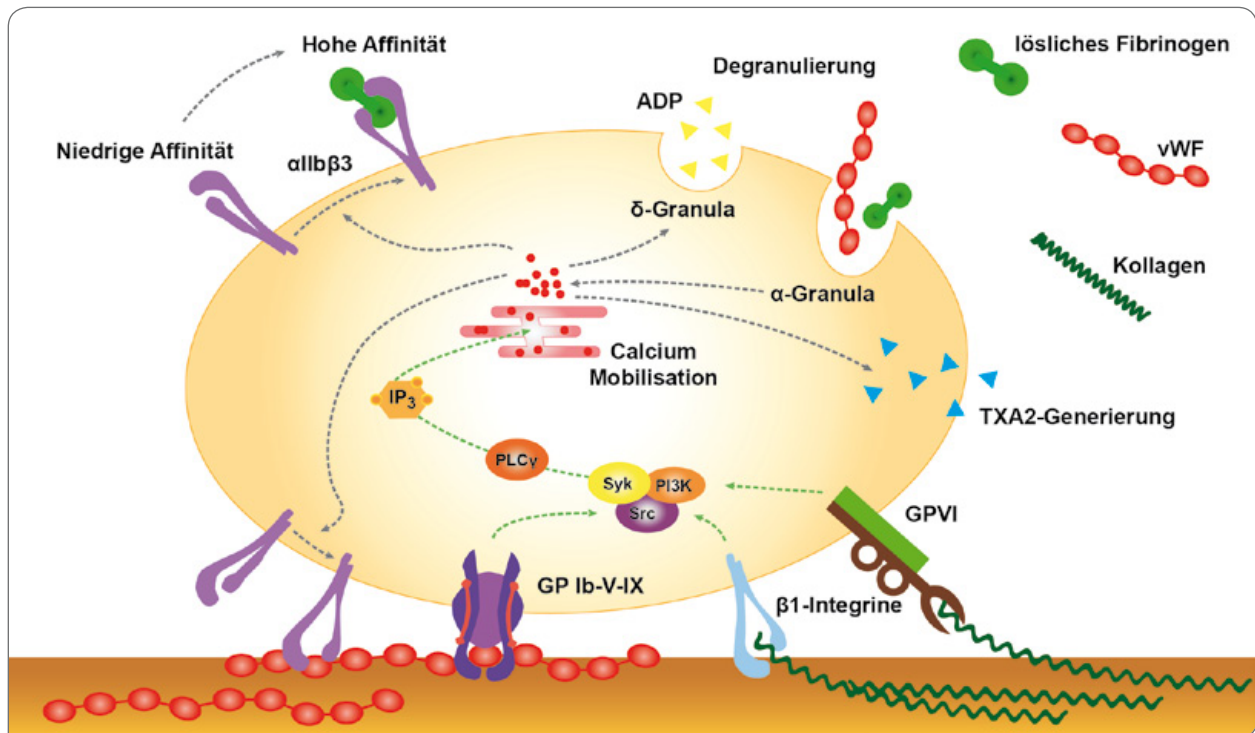


Abb. 2 Thrombozytenadhäsion. Die Thrombozyten binden über ihre Rezeptoren an die subendotheliale Matrix; es kommt zur Aktivierung des Thrombozyten mit Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, welcher zur Degranulierung, Thromboxan-Generierung und Konformitätsänderung des Fibrinogenrezeptors in einen Zustand hoher Affinität führt. (Abbildung modifiziert nach Wei et al. 2009¹¹)

das Subendothel. Durch die Bindung von GPVI an Kollagen und den verschiedenen $\beta 1$ -Integrinrezeptoren an ihre jeweiligen Liganden des Subendothels (siehe Tabelle 1) wird die Adhäsion stabilisiert und außerdem verschiedene Signalwege aktiviert. So führt die Aktivierung der „Src Family Kinase“ (SFKs), Syk und PI 3-Kinase (PI3K) zur Aktivierung der Phospholipase C γ (PLC γ), welche zur Generierung von Inositol-(1,4,5)-trisphosphat (IP $_3$) führt (Abb. 2). Durch die Bindung von IP $_3$ an das dichte tubuläre System werden darin gespeicherte Calcium-Ionen in das Zytoplasma entlassen. Der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration führt (1) zur Generierung von Thromboxan A2 (TXA2), (2) zur Sekretion der Granula durch Verschmelzung der Granulamembran mit der Thrombozytenmembran, (3) zur lokalen Thrombingenerierung und (4) zur Überführung des Integrin $\alpha IIb\beta 3$ in ein Stadium hoher Affinität für Fibrinogen und vWF. Die Bindung von Integrin $\alpha IIb\beta 3$ an subendothelialen vWF stabilisiert die Adhäsion zusätzlich. Das intrazelluläre Calcium führt außerdem zur Phosphorylierung der „Myosin Light Chain“ und damit zu kontraktile Kräfte, welche für den „Shape Change“, also die Formveränderung der Thrombozyten notwendig sind. Durch den „Shape Change“ nehmen die Thrombozyten eine sphärische Form an und bilden Pseudopodien aus (Abb. 1B).²

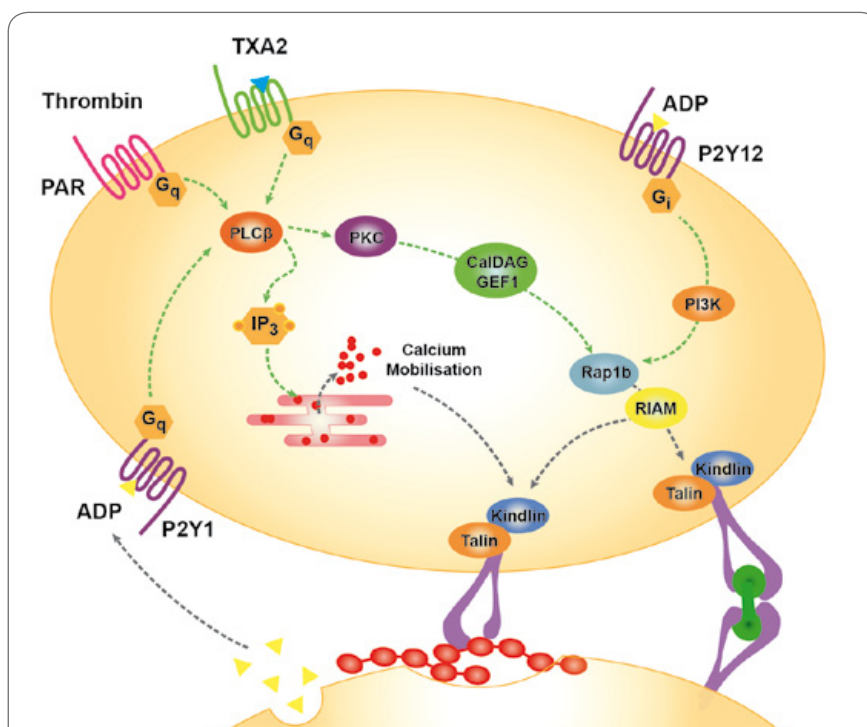


Abb. 3 Thrombozytenaggregation. Durch die Degranulierung nach Aktivierung der Thrombozyten werden lösliche Agonisten in die Umgebung freigegeben und rekrutieren andere zirkulierende Thrombozyten. Diese angelockten Thrombozyten werden ebenfalls aktiviert und können über Fibrinogen und vWF an die bereits adhärenierten Thrombozyten aggregieren. Auf diese Weise entsteht ein stabiler Thrombus. (Abbildung modifiziert nach Wei et al. 2009¹¹)

1.1.3. Thrombozytenaggregation

Die Freisetzung des Granulainhaltes führt zu einer so genannten zweiten Welle „Second Wave“ der primären Hämostase, bei der weitere Thrombozyten rekrutiert werden. Dieser Vorgang ist essentiell für die Aggregation und stabile Thrombusbildung. ADP, Thrombin und TXA2 binden zunächst an ihre überwiegend G_q -Protein gekoppelten Rezeptoren. Über die Aktivierung der Phospholipase C_β (PLC β) kommt es zur Generierung von Diacylglycerol (DAG) und IP $_3$, was zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) und wiederum zur Calciummobilisierung führt. ADP bindet außerdem an den G_i -Protein gekoppelten P2Y12 Rezeptor, welcher die Adenylatcyclase inhibiert und über PI3K die kleine GTPase Rap1b aktiviert. Über das „Rap1-GTP Interacting Adapter Molecule“ (RIAM) wird die Bindung von Talin und dessen Bindungsparameter Kindlin an den zytoplasmatischen Teil des β_3 -Integrin getriggert und so der Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ Rezeptor aktiviert und mit dem intrazellulären Aktin-Zytoskelett verbunden (Abb. 3). Die Thrombozyten aggregieren über Fibrinogen und vWF und bilden einen stabilen, irreversiblen Thrombus, welcher den Gefäßdefekt verschließt und die Blutung stoppt. Dieser Thrombus wird im Rahmen der sekundären Hämostase durch Fibrin zusätzlich stabilisiert.

1.2. Störungen der primären Hämostase

Patienten mit einer Störung der primären Hämostase leiden häufig unter mukokutanen Blutungen wie Epistaxis, Menorrhagien und gastrointestinalen Blutungen, sowie unter subkutanen Blutungen wie Petechien und Hämatomen. Außerdem wird häufig von

problematischen Blutungen während und nach kleineren Verletzungen und Eingriffen wie z.B. Zahnextraktionen oder Tonsillektomien berichtet. Milde Blutungsdiathesen fallen häufig erst während eines solchen Eingriffes auf und schränken den Patienten im Alltag nicht ein. Einblutungen in Gelenke und ausgeprägte Hirnblutungen, sowie innere Blutungen sind die Seltenheit und sprechen eher für einen Defekt der sekundären Hämostase.

Die Ursachen für einen Defekt der primären Hämostase sind aufgrund der Komplexität von Adhäsion und Aggregation sehr vielfältig. Grundsätzlich kann die Störung Folge einer Fehlfunktion der Thrombozyten, also eine Thrombozytopathie sein oder durch eine zu geringe Anzahl von Thrombozyten, eine Thrombozytopenie, ausgelöst werden. Von beiden Kausalitäten sind angeborene und erworbene Formen bekannt.

1.2.1. Thrombozytopathien

Angeborene Thrombozytopathien

Die am häufigsten diagnostizierten angeborenen Thrombozytenfunktionsstörungen sind das autosomal-rezessiv vererbte **Bernard-Soulier-Syndrom** (BSS) und der ebenfalls autosomal-rezessiv vererbte **Morbus Glanzmann** (MG). Beide Erkrankungen sind durch Defekte der Membranrezeptoren für Adhäsionsmoleküle gekennzeichnet und Betroffene zeigen eine milde bis schwere Blutungsneigung. So ist beim Bernard-Soulier-Syndrom der GPIb-IX-Komplex stark vermindert (Typ I) oder fehlt (Typ II). Außerdem findet man häufig Riesenthrombozyten und verminderte Plättchenzahlen.¹² Bei einem MG liegt ein Strukturdefekt des GPIIb/IIIa vor, welcher sich durch eine komplett fehlende Aggregationsfähigkeit in der Funktionsdiagnostik bemerkbar macht.¹³ Eine dritte Funktionsstörung dieser Gruppe ist das **von-Willebrand-Syndrom vom Plättchentyp** (vWS Typ 2B), bei dem eine „gain-of-function“-Mutation auf Chromosom 17p13 vorliegt, welche das GPIIb des vWF-Rezeptors betrifft. Die Plättchen dieser Patienten neigen zur Spontanaggregation, die Blutungsneigung ist mild.¹⁴ Das Montreal-Plättchen Syndrom, welches früher als eigenständiges Krankheitsbild gesehen wurde, konnte ebenfalls dem vWS Typ 2B zugeordnet werden.¹⁵

Milde Blutungsneigungen werden auch bei Defekten der Membranrezeptoren für lösliche Agonisten beobachtet. Hier sind z.B. Defekte der ADP-Rezeptoren, des α -adrenergen Rezeptors und der Kollagenrezeptoren bekannt.

Eine weitere große Gruppe der angeborenen Thrombozytopathien umfasst Defekte der Thrombozytengranula. Die Verminderung der dichten Granula, welche als „ **δ -storage pool disease**“ (δ -SPD) bekannt ist, spielt in dieser Gruppe die größte Rolle. Die fehlende Ausschüttung von ATP, ADP, Serotonin und Calcium führt zu moderaten Blutungsneigungen. Weiterhin sind Defekte der dichten Granula mit den seltenen

Chediak-Higashi- und dem **Hermansky-Pudlak-Syndrom** assoziiert. Die α -Granula sind beim „**Gray-Platelet**“ **Syndrom** zwar vorhanden, aber leer. Verminderte α -Granula finden sich beim „ **α -storage pool disease**“ (α -SPD) oder beim **Quebec-Syndrom**.¹⁶

Sehr selten sind Defekte der Signaltransduktion. Hierzu zählen z.B. **Störungen der Zyklooxygenase oder Thromboxan-Synthase**. Die **Leukozyten-Adhäsions-Defizienz Typ III** (LAD-III) entsteht durch Mutationen im FERMT3-Gen welches das Kindlin-3 Protein codiert.^{17,18} Kindlin-3 bindet an den zytoplasmatischen Teil der β -Untereinheit des Fibrinogenrezeptors und ist maßgeblich an der Integrin-Aktivierung beteiligt.¹⁹ Die Aktivierung des Fibrinogenrezeptors fehlt bei Patienten mit einer LAD-III somit vollständig und sie zeigen eine gestörte Aggregation, wie sie auch bei Patienten mit MG zu finden ist. Aufgrund der schweren Blutungen leiden die Patienten außerdem häufig an einer Thrombozytopenie.

Erworbene Thrombozytopathien

Den größten Anteil an den erworbenen Thrombozytopathien haben **medikamenten-induzierte Defekte** der Thrombozytenfunktion.²⁰ Aus diesem Grund ist eine ausführliche Medikamentenanamnese bei der Diagnostik einer unklaren Blutungsneigung unerlässlich. Dabei ist darauf zu achten, dass z.B. Aspirin auch in vielen Kombinationspräparaten enthalten ist. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die wichtigsten Medikamente mit einem Einfluss auf die Thrombozytenfunktion.

Eine komplexe Thrombozytopathie entsteht im Rahmen einer Urämie, doch lebensbedrohliche Blutungen sind aufgrund

Tabelle 2 Medikamente mit Einfluss auf die Thrombozytenfunktion

Zyklooxygenaseinhibitoren
<ul style="list-style-type: none"> ▸ Acetylsalicylsäure ▸ Nichtsteroidale Antirheumatika/ Antiphlogistika (Indomethazin, Ibuprofen, Naproxen)
ADP- bzw. GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten
<ul style="list-style-type: none"> ▸ Clopidogrel, Ticlopedin ▸ Abciximab
Antibiotika, Antimykotika
<ul style="list-style-type: none"> ▸ Penicilline, Cephalosporine ▸ Nitrofurantoin ▸ Hydroxychloroquin ▸ Miconazol
Chemotherapeutika
<ul style="list-style-type: none"> ▸ Daunorubicin, Mitomycin, Carmustin
Kardiovaskuläre Medikamente
<ul style="list-style-type: none"> ▸ Propranolol ▸ ACE - Hemmer ▸ Nitroprussid, Nitroglycerin ▸ Furosemid ▸ Quinidin
Weitere Medikamente und Substanzen
<ul style="list-style-type: none"> ▸ NO ▸ Dextrane ▸ Clofibrate ▸ Antihistaminika ▸ Nahrungsmittel und -ergänzungsmittel (Vitamin E, Fischöl mit Omega-3-Fettsäuren, Zwiebeln, Knoblauch, Ingwer, Ginko-Extrakt u.a.)

der verbesserten Therapie der niereninsuffizienten Patienten nur noch selten zu beobachten. Dennoch ist die Frage nach dem Blutungsrisiko z.B. vor Nierenpunktionen in diesem Zusammenhang immer noch relevant.

Im Erwachsenenalter kommt es im Rahmen von Tumoren oder myeloproliferativen Erkrankungen manchmal zur Bildung von Antikörpern gegen Membranglykoproteine, was zu einer Dysfunktion der Thrombozyten führt, welche häufig dem MG ähnelt.

1.2.2. Thrombozytopenien

Neben Thrombozytopathien, welche auch, z.B. beim BSS, mit Thrombozytopenien einhergehen können, sind außerdem Thrombozytopenien bekannt, die nicht primär mit einem Funktionsdefekt assoziiert sind. Von einer Thrombozytopenie spricht man bei Thrombozytenzahlen unter 150 Thrombozyten/nL, wobei klinische Symptome meist erst bei Zahlen unter 30 Thrombozyten/nL auftreten.

Angeborene Thrombozytopenien

Das „**Thrombocytopenia-absent-radii**“-**Syndrom** (TAR) ist mit einer Inzidenz von 1-2:1.000.000 äußerst selten. Durch einen Mangel an Megakaryozyten im Knochenmark²¹ können nicht genügend Thrombozyten gebildet werden und die Patienten sind vor allem in den ersten beiden Lebensjahren stark thrombozytopen, danach steigt die Thrombozytenzahl an, erreicht aber selten den Normbereich.²² Außerdem ist das TAR-Syndrom durch eine bilaterale Radiusaplasie gekennzeichnet und ist mit anderen skeletalen Verformungen wie z.B. Ulnaveränderungen und Humerusaplasie sowie renalen und kardialen Fehlbildungen assoziiert. Klinisch weisen die Patienten eine Blutungsneigung auf, die von Petechien und milden Schleimhautblutungen bis hin zu schweren Hirnblutungen reicht. Die autosomal-rezessiv vererbte **Amegakaryozytäre Thrombozytopenie** (CAMT) ist ebenfalls durch einen Mangel an Megakaryozyten im Knochenmark bedingt, geht aber nicht mit skeletalen Fehlbildungen einher. Der Megakaryozytenmangel wird durch Mutationen im TPO-Rezeptor c-Mpl verursacht.²³ Im weiteren Verlauf des Krankheitsbildes kommt es häufig zur aplastischen Anämie und einer damit verbundenen Panzytopenie.

Das **Wiskott-Aldrich-Syndrom** (WAS) wird wie die **X-chromosomale Thrombozytopenie** (XLT) durch eine Mutation im Gen des WAS-Proteins (WASP) auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms vererbt und ist gekennzeichnet durch eine Mikrothrombozytopenie mit vermehrter Blutungsneigung und progredient verlaufender T- und B-Zell-Defizienz.²⁴ Durch eine Mutation im GATA-1 Gen kommt es zur **X-chromosomal vererbten Makrothrombozytopenie** mit häufigen Blutungen und Riesenthrombozyten im Blutaussstrich. Autosomal-dominant vererbte Mutationen im MYH9-Gen sind assoziiert mit der **May-Hegglin-Anomalie** sowie den **Sebastian-**

Fechter-, und Epstein-Syndromen. Die Erkrankungen sind durch die Trias Riesenthrombozyten, Thrombozytopenie und charakteristische Leukozyteneinschlüsse (Döhle-Körper ähnlich) gekennzeichnet und unterscheiden sich im Auftreten verschiedener zusätzlicher Symptome, wie z.B. Katarakt.

Erworbene Thrombozytopenien

Erworbene Thrombozytopenien treten deutlich häufiger auf als angeborene. Die Thrombozytopenie kann Folge einer verminderten Bildung, eines vermehrten Abbaus oder einer verstärkten Speicherung von Thrombozyten sein.

Durch Bildung von Autoantikörpern gegen Oberflächenmoleküle der Thrombozyten kommt es zum verfrühten Abbau und damit zur Thrombozytopenie. Eine der häufigsten Ursachen für eine immunologische Thrombozytopenie ist die **Immunthrombozytopenie** (ITP), ursprünglich als Morbus Werlhof bekannt. Im Kindesalter tritt sie häufig als zeitlich begrenzte akute Form nach viralen Infekten auf. Die Patienten fallen mit Petechien und Hämatomen nach nicht relevanten Traumen auf. Die neu diagnostizierte ITP wird als akut bezeichnet, nach 3 Monaten als persistierend. Dauert die ITP länger als 12 Monate wird sie als chronisch (cITP) definiert.^{25,26} Die oft schleichend beginnende und häufig durch Zufall diagnostizierte chronische ITP betrifft sowohl Erwachsene als auch Kinder. Eine sekundäre ITP ist außerdem häufig beim systemischen Lupus erythematoses, dem Evans-Syndrom, chronisch lymphatischen Leukämien, HIV-Infektionen und Kollagenosen zu finden. Auch eine Schwangerschaft, die Gabe von Thrombozytenkonzentraten und bestimmte Medikamente (z.B. Goldsalze) können die Bildung von Autoantikörpern gegen Thrombozyten auslösen. Die häufigste durch Medikamente ausgelöste Thrombozytopenie ist die Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT). Hier werden zwei Typen unterschieden: für den ungefährlichen Typ 1 wird die proaggregatorische Wirkung von Heparin verantwortlich gemacht. Beim gefährlichen, zeitverzögerten Typ 2 kommt es durch Antikörper, welche in den meisten Fällen gegen einen Komplex aus Heparin und Plättchenfaktor 4 (PF4) gerichtet sind, zu deren Aktivierung und zur Bildung massiver Thromben.²⁷

Nicht immunologisch bedingte Thrombozytopenien, ausgelöst durch eine Umsatzstörung, sind häufig im Rahmen von Infektionskrankheiten v.a. in septischen Stadien zu beobachten. Dem gesteigerten Thrombozytenumsatz liegt häufig ein erhöhter peripherer Verbrauch durch eine **disseminierte intravasale Gerinnung** (DIC) zu Grunde.

Patienten mit der **Thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura** (TTP) weisen neben Zeichen einer hämorrhagischen Diathese fluktuierende neurologische Ausfälle bedingt durch Mikrothromben auf. Bei der erworbenen idiopathischen Form liegen

Autoantikörper gegen die Protease ADAMTS13 vor. Es ist außerdem auch eine autosomal-rezessiv vererbte Form der TTP bekannt mit Mutationen im ADAMTS13-Gen auf Chromosom 9q34.²⁸ Das **Hämolytisch-urämische Syndrom (HUS)** weist Ähnlichkeiten zur TTP auf und ist gekennzeichnet durch die Symptomtrias: akutes Nierenversagen, Thrombozytopenie und hämolytische Anämie.

1.3. Aktuelle Diagnostikmethoden bei Verdacht auf eine Störung der primären Hämostase

1.3.1. Blutungsanamnese und körperliche Untersuchung

Die Anamnese ist eines der wichtigsten und einfachsten Bausteine bei der Abklärung unklarer Blutungsneigungen. Zunächst sollten die charakteristischen Blutungszeichen wie Schleimhautblutungen, Purpura oder Hämatome ohne adäquates Trauma, Menorrhagien und Blutungskomplikationen bei OPs erfragt werden. Diese Symptome können in Blutungsscores quantifiziert werden und bei Bedarf reevaluiert werden. Außerdem ist eine umfassende Erhebung der Eigen- und Familienanamnese, sowie der aktuellen Medikamentenanamnese obligat.²⁹

Bei der körperlichen Untersuchung ist vor allem auf Stigmata, die auf bestimmte syndromale Erkrankungen hinweisen zu achten. Es empfiehlt sich außerdem Hämatome und Petechien genau zu dokumentieren.

1.3.2. Basis-Laborparameter

Bei jedem Verdacht auf eine Störung der primären Hämostase werden zunächst verschiedene Basis-Laborparameter bestimmt. Die Thrombozytenzahl deckt eine thrombozytopenie Ursache der Blutungsneigung auf. Die Thrombozytenzahl kann durch das Vorhandensein von Riesenthrombozyten und sehr kleinen Thrombozyten verfälscht werden, da diese nicht im beurteilten Analysefenster liegen und deswegen vom Zählautomaten nicht erkannt werden. Außerdem kann es zu Pseudothrombozytopenien aufgrund der Verwendung von EDTA-Blut kommen, was in manchen Fällen eine Aggregation der Thrombozyten auslöst. Deshalb muss eine neu aufgetretene Thrombozytopenie immer anhand von Citrat-Blut auch im Blutaussstrich kontrolliert werden. In sehr seltenen Fällen kommen aber auch Pseudothrombozytopenien im Citrat-Blut vor.³⁰

Das „Mean Platelet Volume“ (MPV) gibt Hinweise auf eine Makro- oder Mikrothrombozytopenie. Zum Ausschluss einer leukämischen Blutungsursache sollte auch immer die Morphologie aller Zellen des Blutes beurteilt werden. Eine Störung der sekundären Hämostase kann durch Gerinnungstests wie INR (Quick) und aPTT ausgeschlossen werden.

In wenigen Laboratorien ist es außerdem möglich, die „Immature Platelet Fraction“ (IPF) zu bestimmen. Die IPF ist ein Maß für die Thrombopoese-Rate und beruht auf dem RNA-Gehalt der Thrombozyten. Die Bestimmung der IPF sollte bei Thrombozytopenien durchgeführt werden, um zwischen einer Bildungsstörung (IPF erniedrigt) und einem gesteigerten peripheren Umsatz von Thrombozyten (IPF erhöht) zu unterscheiden.³¹

Da diese Parameter allein meist noch nicht ausreichend für eine Diagnosestellung sind, werden die Patienten häufig in spezialisierte Zentren überwiesen, an denen eine erweiterte Diagnostik möglich ist.

1.3.3. PFA-100®

Der PFA-100® („Platelet Function Analyser“) simuliert die kapilläre Blutstillung *in vitro* und wird als Screening-Methode bei Verdacht auf Störungen der primären Hämostase eingesetzt. Im Analyse-Gerät befindet sich eine Membran mit einer kleinen Öffnung. Die Membran ist mit den Thrombozyten-aktivierenden Substanzen Kollagen/Epinephrin oder Kollagen/ADP beschichtet. Das antikoagulierte Blut fließt über eine Kapillare durch diese Öffnung und wird aufgrund der Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten verschlossen. Die Zeit bis zum vollständigen Verschluss der Öffnung wird in Sekunden gemessen und als Verschlusszeit „CT“ („Closure Time“) angegeben.³²

Für die weit verbreitete PFA-100® Analyse ist nur eine geringe Menge an Material notwendig und sie ist schnell und einfach durchzuführen. Da der Test sehr sensitiv ist, aber wenig spezifisch, stellt er ein gutes Screening-Instrument da, um den Verdacht auf eine Störung der primären Hämostase zu erhärten, aber bietet nicht die Möglichkeit den Defekt genauer zu charakterisieren. Außerdem wird der Test durch eine Thrombozytopenie oder einen erniedrigten Hämatokrit verfälscht. Defekte, die nur zu einer leichten Blutungsneigung führen, wie z.B. eine Sekretionsstörung, resultieren nicht in einer Verlängerung der Verschlusszeit und werden so häufig übersehen.³³

1.3.4. Aggregometrie

Die Aggregometrie erlaubt die Beurteilung der Aggregationsfähigkeit von Thrombozyten. Die Aggregation kann durch (1) die Messung der Lichttransmission in plättchenreichen Plasma (PRP) erfolgen, oder (2) durch die Messung der Impedanz im Vollblut. Obwohl aufwendiger und zeitintensiver, ist die Licht-Transmissions-Aggregometrie verbreiteter und soll deshalb hier betrachtet werden.

Für diese Methode ist zunächst die Herstellung von PRP notwendig, für das ca. 40 ml Vollblut benötigt wird. Während der Messung bei 37 °C wird der Probe ein Plättchen aktivierender Agonist zugesetzt. Durch die Aggregation der Thrombozyten kommt es zu einer Veränderung der Lichttransmission, welche durch einen Photomultiplier detektiert

wird. Die Änderung der Lichttransmission wird in einer für die Aggregometrie typischen Kurve aufgezeichnet. Um die Reaktion auf verschiedene Agonisten abzubilden, werden den Proben starke Agonisten wie Kollagen und Arachidonsäure, sowie schwache Agonisten wie Epinephrin und ADP zugesetzt. Jedes Labor verwendet hierfür andere Konzentrationen, was einen Vergleich zwischen verschiedenen Laboren schwierig macht.

Zusätzlich ist es bei manchen Aggregometern möglich per Lumiaggregometrie die Degranulierung von Thrombozyten zu beurteilen. Hierzu wird die Biolumineszenz erfasst, welche durch die Reaktion von freigesetztem ATP mit Luciferin und Luciferase entsteht.³⁴

Obwohl die Licht-Transmissions-Aggregometrie sehr zeitintensiv ist und die Arbeitsschritte zu vielfältigen Artefakten führen können, gilt sie als Goldstandard zur Abklärung unklarer Thrombozytenfunktionsstörungen. Das Blut von Patienten mit einer ausgeprägten Thrombozytopenie kann durch diese Methode nicht evaluiert werden, da für die Herstellung des PRP größere Mengen Vollblut benötigt werden. Das steht vor allem bei Kleinkindern, Säuglingen und Neugeborenen oft nicht zur Verfügung. Auch die Plättchenfunktion von Patienten mit Riesenthrombozyten, wie z.B. beim BSS, kann nur eingeschränkt beurteilt werden, da große Thrombozyten durch die Zentrifugation abgereichert werden.³³

1.3.5. Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie können verschiedenste Untersuchungen zur Beurteilung der Thrombozyten und Thrombozytenfunktion durchgeführt werden:³⁵

- Expression der Oberflächenrezeptoren
- Expression von Aktivierungsmarkern nach Stimulation
- Degranulierung
- Vorhandensein von Leukozyten-Plättchen-Aggregaten, Plättchen-Plättchen-Aggregaten und Mikropartikeln
- Anteil der retikulierten Thrombozyten
- HPA-Typisierung
- Vorhandensein von Thrombozytenantikörpern
- Signaltransduktion durch Calciummobilisierung

Shattil et al. führten 1987 die durchflusszytometrische Analyse im Vollblut ein.³⁶ Sie löste die fehleranfällige und aufwändigere Analyse an gewaschenen Plättchen oder im

PRP ab. Die Thrombozyten werden zur Messung im Vollblut zunächst verdünnt und mit einem fluoreszenten Marker inkubiert. In der Regel werden hierfür fluoreszenzmarkierte, monoklonale Antikörper oder fluoreszierende Farbstoffe verwendet. Um die Thrombozytenfunktion zu beurteilen, werden diese mit physiologischen Agonisten wie z.B. ADP aktiviert und anschließend mit Antikörpern gegen verschiedene Aktivierungsmarker markiert. Im Durchflusszytometer wird die Probe dann durch eine Messkammer geleitet, die Zellen vereinzelt und die Fluorophore durch einen Laser angeregt. Das emittierte Licht und die Brechungseigenschaften der Zelle werden vom Durchflusszytometer gemessen und aufgezeichnet, so können in kurzer Zeit die Eigenschaften einer sehr großen Zellzahl beurteilt werden.

Für durchflusszytometrische Analysen sind nur geringe Blutvolumina im μl -Bereich notwendig, und auch die Analyse von Blut stark thrombozytopen Patienten ist möglich. Da die meisten Tests im Vollblut durchführbar sind, und somit in einem nahezu physiologischen Milieu, werden Artefakte durch Manipulation auf ein Minimum reduziert. Für die Durchführung der Analysen ist allerdings gut geschultes Personal notwendig, die benötigten Antikörper sind zudem teuer.

1.3.6. Sonstige Diagnostikmethoden

Neben den bisher aufgeführten Diagnostikmethoden kommen bei speziellen Fragestellungen noch folgende Methoden zum Einsatz:

- Thrombelastographie, Rotationsthrombelastometrie
- „Plateletworks“
- Elektronenmikroskopie
- Genetische Diagnostik
- Molekularbiologische Analysen
- Multimerenanalyse des vWF
- Ristocetin-induzierte Agglutination

1.4. Diagnostische Herausforderung „Unklare Blutungsneigung/Thrombozytopenie/Thrombozytopathie“

1.4.1. Verschiedene Diagnostik-Algorithmen

Um die Abklärung unklarer Blutungsneigungen oder unklarer Thrombozytopenien zu vereinfachen und den Weg von der Anamnese, über die Diagnostik zur endgültigen Diagnose zu strukturieren, entwickelten verschiedene Arbeitsgruppen Diagnostik-Algorithmen. Diese Algorithmen sind in Ihrem Umfang sehr unterschiedlich, beruhen aber im Grundsatz auf den im Kapitel 1.3. aufgeführten Methoden. Eine relativ einfach gehaltene Übersicht zur Diagnostik-Strategie bei Verdacht auf primäre Hämostasestörung gibt Mani et al. 2010, hier dargestellt in Abbildung 4.³⁷ In dieser Übersicht finden sich keine klaren differentialdiagnostischen Angaben, sondern sie gibt ausschließlich die Richtung der möglichen Krankheitsentität und einen sinnvollen Ablauf zur Durchführung der verschiedenen Diagnostikinstrumente vor.

Kottke-Marchant und Corcoran veröffentlichen 2002 einen etwas genaueren Algorithmus, in dem die verschiedenen Differentialdiagnosen bereits eingearbeitet sind.³⁸ Balduinis Arbeitsgruppe publizierte 2003 einen sehr detaillierten Algorithmus, in dem die verschiedenen Differentialdiagnosen und v.a. die endgültig beweisenden Diagnostikmethoden einzeln aufgeschlüsselt werden.³⁹ Obwohl es Ziel der Arbeitsgruppe war, einen Algorithmus zu entwickeln, welcher auch in nicht spezialisierten Laboratorien Anwendung findet, tauchen auch hier Spezialuntersuchungen wie z.B. Aggregometrie

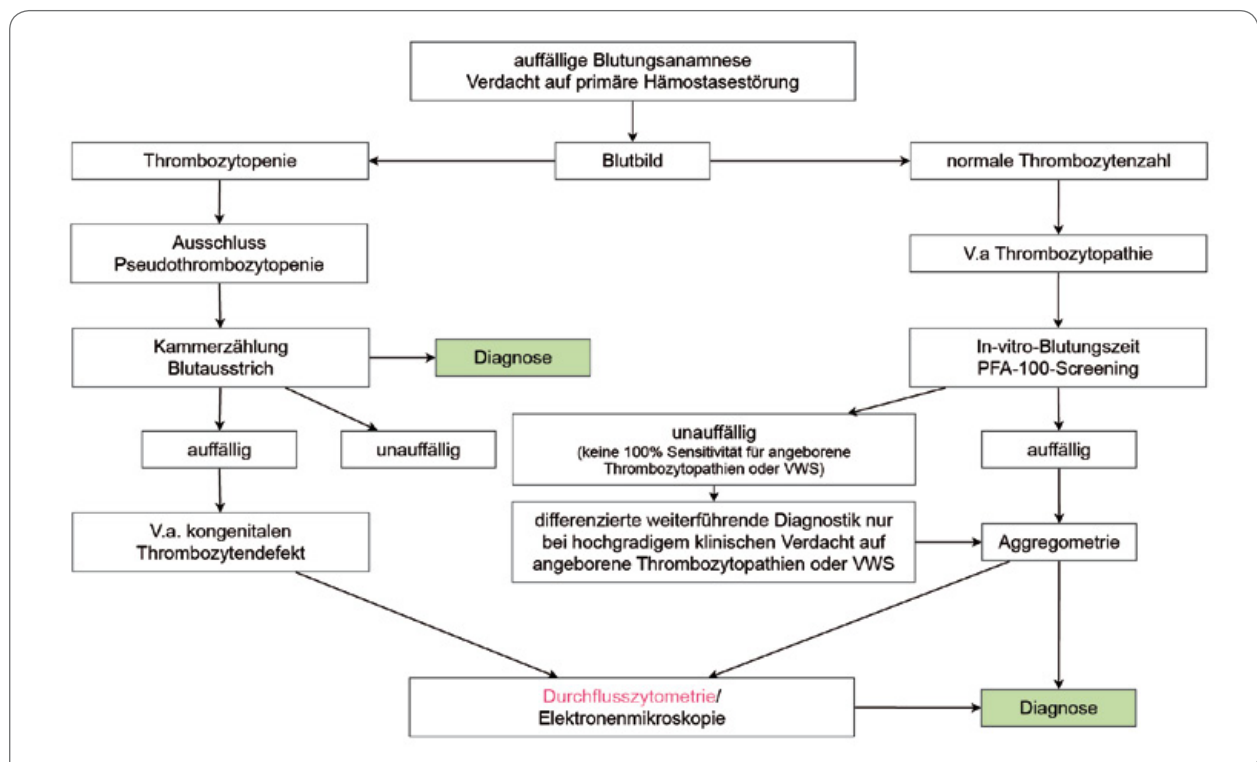


Abb. 4 Diagnostik-Strategie bei Verdacht auf Störung der primären Hämostase nach Mani et al. 2010³⁷

und Durchflusszytometrie auf. Einen sehr ähnlichen Algorithmus aus Großbritannien veröffentlichten 2006 Bolton-Maggs et al. Bei allen Algorithmen steht am Beginn der Diagnostik die Anamnese und die Basis-Labordiagnostik wie im Kapitel 1.3. beschrieben.⁴⁰

Aus den Angaben der Anamnese und dem klinischen Bild können häufig bereits angeborene, angeborene syndromatische und erworbene Störungen der primären Hämostase unterschieden werden. Als weiteres wichtiges Diagnostikkriterium wird häufig die Thrombozytenzahl und die Thrombozytenmorphologie heran gezogen. Im nächsten Schritt werden dann schon spezielle Diagnostikmethoden wie Aggregometrie, PFA-100® etc. vorgeschlagen, um verschiedene Differentialdiagnosen zu evaluieren. Schwerpunkt aller Publikationen ist die Diagnostik von angeborenen Thrombozytendefekten. Auch die Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL) publizierte im Jahr 2004 zum Thema Diagnostikstrategien zur Abklärung einer Thrombozytendysfunktion.²⁹ Die hier vorgelegte Strategie basiert auf der Auswertung verschiedener Befundkonstellationen, die sich aus den drei Pfeilern Thrombozytenzahl und -morphologie, PFA-100® und Aggregometrie ergeben. Die neueste Publikation zum Thema Diagnostik von Thrombozytendefekten bei Kindern stammt von Israels et al. aus Kanada.⁴¹ Im Gegensatz zu den früheren Algorithmen werden hier auch erworbene Defekte mit in den Algorithmus einbezogen und dafür auf die Aufführung endgültig beweisender Methoden für die einzelnen Differentialdiagnosen verzichtet.

1.4.2. Aktuelle Probleme in der Diagnostik

Trotz vorhandener Diagnostikinstrumente und -algorithmen gibt es bei der Diagnostik von Thrombozytenfunktionsstörungen viele Schwierigkeiten. Ein Problem ist die Verfügbarkeit der meist komplizierten und zeitaufwendigen speziellen Diagnostikmethoden. Im Rahmen der THROMKID-Studie der Deutschen Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH) wurden 41 klinische Zentren im gesamten deutschsprachigen Raum identifiziert, die eine Spezialdiagnostik anbieten.⁴² 37 Zentren beantworteten Fragen zu den eingesetzten Diagnostikmethoden. In allen Zentren wird die Aggregometrie durchgeführt, in 76 % der PFA-100® und in 73 % die Durchflusszytometrie. Die Durchführung der Methoden war allerdings sehr unterschiedlich. Ein Grund hierfür ist die fehlende Standardisierung der Methoden, die in vielen Publikationen kritisiert wird. Speziell für die Durchflusszytometrie ist zwar ein „Konsensus-Paper“ vorhanden, dieses enthält aber beispielsweise keine klaren Angaben über Konzentrationen von Agonisten.⁴³ Durch die fehlende Standardisierung ist es außerdem nicht möglich, Befunde der einzelnen Laboratorien untereinander zu vergleichen. Weiterhin fällt auf, dass einem Großteil der Laboratorien (44 %) für die durchflusszytometrische Diagnostik nur ein FACS Scan oder ein EPICS XL oder XL/MCL

Coulter zur Verfügung steht, welche max. 2-3 Fluorophore, die durch den 488nm Laser angeregt werden, simultan messen können. Das heißt, für eine wirklich umfangreiche Diagnostik müssen diese Laboratorien eine große Anzahl an Proben aufbereiten und messen.

Ein weiteres großes Problem ist die immer noch hohe Anzahl an Patienten mit ungeklärter Blutungsneigung. Der Diagnostik-Algorithmus für angeborene Thrombozytopenien von Balduini et al.³⁹ wurde retrospektiv bei 46 Patienten angewandt.⁴⁴ Bei 18 Patienten, also 39 %, blieb die Ursache der Thrombozytopenie weiter unklar.

In einer prospektiven Studie untersuchten Quiroga et al.⁴⁵ 280 Patienten mit Schleimhautblutungen. Neben den Basisuntersuchungen wurde eine Aggregometrie mit Beurteilung der Sekretion, ein PFA-100® Screening, sowie eine Untersuchung hinsichtlich von-Willebrand-Syndrom durchgeführt. Die Durchflusszytometrie kam nicht zum Einsatz. Hier blieb bei 167 der Patienten, also bei knapp 60 %, die Blutungsursache weiterhin unklar.

1.5. Zielsetzung

Die Diagnosefindung für Patienten mit einer anamnestischen Blutungsneigung ist komplex und bleibt in vielen Fällen immer noch ergebnislos. Dies ist unter anderem der Vielzahl der Defekte, die dieses Symptom bedingen können, und der schwierigen Diagnostik geschuldet. Es stehen zwar verschiedene Instrumente zur Abklärung einer Blutungsdiathese zur Verfügung, aber diese sind meist wenig standardisiert, gehören nicht zur Routinediagnostik und werden, wie oben beschrieben, nur von spezialisierten Laboratorien ausgeführt. Außerdem ist beispielsweise die Aggregometrie bei Neugeborenen, Säuglingen und Kleinkindern, sowie bei Patienten mit ausgeprägten Thrombozytopenien gar nicht durchführbar. Aus diesem Grund ist es notwendig, verbesserte, einfachere und vor allem standardisierte Diagnostik-Methoden zu entwickeln.

Die Multi-Farben-Durchflusszytometrie ist ein geeignetes Instrument, um die Expression der Oberflächenrezeptoren und die Reaktivität der Thrombozyten schnell und mit wenig Material zu beurteilen. Ziele der vorliegenden Arbeit sollten sein:

- I. Etablierung und Optimierung einer durchflusszytometrischen Untersuchung der Thrombozyten zur Beurteilung der Expression von Oberflächenrezeptoren und der Thrombozytenfunktion mittels Multi-Farben-Durchflusszytometrie.
- II. Entwicklung eines Algorithmus mit mehreren Modulen zur Abklärung einer unklaren, anamnestischen Blutungsneigung mittels Multi-Farben-Durchflusszytometrie.
- III. Etablierung weiterer Diagnostikmodule zur Beurteilung kurzfristiger Signalwege, wie der Calciummobilisierung, und der Degranulierung.

2. Material und Methoden

2.1. Gesundspender und Patienten

Die gesunden Kontrollen für diese Arbeit stammen aus zwei Quellen: zum einen wurde Blut von anonymen Stammzellspendern verwendet, zum anderen konnten aus dem näheren Laborumfeld gesunde Personen zur Analyse auf freiwilliger Basis gewonnen werden. Das Blut der Stammzellspender wird nach HLA-Typisierung normalerweise verworfen. Einige Gesundspender gaben mehrmalig Blut zur Analyse.

Das Patientenkollektiv setzte sich aus mehreren Gruppen zusammen. Für die an Leukämie erkrankten Patienten wurde Blut zur Phänotypisierung zwecks Stammzellspende analysiert und das nicht benötigte Material für diese Arbeit weiter verwendet. Das Blut der TAR-Patienten wurde im Rahmen einer Studie zur Charakterisierung der Erkrankung analysiert. Alle anderen Proben wurden im Rahmen der diagnostisch-experimentellen Abklärung (LAD-III, WAS, unklare Thrombozytopenie) und Vorstudien (SCA, cITP) analysiert.

Da für die Analysen keine zusätzlichen Blutentnahmen notwendig waren und die Probanden keine zusätzlichen Termine wahrnehmen mussten, wurde kein Ethikvotum beantragt. Eine allgemeine Einwilligung der Probanden lag vor.

Tabelle 3 Übersicht über die Gesundspender und die Patientenkollektive.

Erkrankung	Abkürzung	n	w/m	Alter (Jahre)
Gesundspender Erwachsene	-	35	19/16	18-62
Thrombozytopenie mit Radiusaplasie-Syndrom	TAR	7	7/0	1-37
Leukozyten-Adhäsions-Defizienz Typ III	LAD-III	2	2/0	17
Wiskott-Aldrich-Syndrom nach Stammzelltransplantation	tWAS	2	0/2	4
Akute myeloische Leukämie, I. Induktion	AML	15	4/11	30-73
Sichelzellanämie	SCA	5	4/1	6-17
Chronische Immunthrombozytopenie	cITP	3	2/1	15-17

2.2. Verwendete Geräte und Software

FACS Canto II	Beckton Dickinson, Heidelberg
FACSDiva	Beckton Dickinson, Heidelberg
FlowJo 7.6.3	Tree Star, Ashland
Kühlschrank	Bosch, München

Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg
Numbers 2.1	Apple Inc., Cupertino
Pipetten, verschiedene	Gilson, Middleton
Tiefkühler	Bosch, München
Tischzentrifuge Galaxy MiniStar	VWR, Darmstadt
Vortex Genie 2	Carl-Roth, Karlsruhe
Zentrifuge GS-15R	Beckmann Coulter, Krefeld

2.3. Verwendete Chemikalien und Biochemikalien

Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tabelle 4 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antigen	Beschreibung	Spezies	Klon	Isotyp	Fluorophore	Firma
CD41a	Integrin α IIb β 3 / GPIIb-IIIa	Maus	HIP8	IgG ₁ , κ	APC, Pe-Cy5, PE	BD
CD61	Integrin β 3 / GPIIIa	Maus	VI-PL2	IgG ₁ , κ	FITC	BD
CD42a	GPIX	Maus	Beb1	IgG ₁ , κ	Per-CP	BD
CD42b	GPIb α	Maus	HIP1	IgG ₁ , κ	APC	BD
CD29	Integrin β 1 / GPIIa	Maus	MAR4	IgG ₁ , κ	PE	BD
CD49b	Integrin α 2 / GPIa	Maus	AK-7	IgG ₁ , κ	FITC	BD
CD49e	Integrin α 5 / GPIc	Maus	IIA1	IgG ₁ , κ	PE	BD
CD49f	Integrin α 6 / GPIc	Maus	GoH3	IgG _{2a} , κ	PE-Cy5	BD
CD62P	P-Selektin der α -Granula	Maus	AK-4	IgG ₁ , κ	APC	BD
CD63	Granulophysin der Lysosomen und δ -Granula	Maus	H5C6	IgG ₁ , κ	PE	BD
PAC-1	Epitop des aktivierten Integrin α IIb β 3	Maus	PAC-1	IgM, κ	FITC	BD
CD45	Panleukozytenmarker	Maus	HI30	IgG ₁ , κ	FITC	BD

Agonisten für die Thrombozytenaktivierung

TRAP6	Bachem, Weil am Rhein
ADP	DiaMed, München
U46619	Sigma Aldrich, München

Häufig verwendete Puffer*PBS - Puffer*

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
10 mM	Na ₂ HPO ₄
5,5 mM	KH ₂ PO ₄
	// pH 7,2

HEPES-Tyrodes Puffer

10,0 mM	HEPES
129,0 mM	NaCl
8,9 mM	NaHCO ₃
0,8 mM	KH ₂ PO ₄
5,6 mM	Glucose
	// pH 7,4 partikelfrei filtriert

Modifizierter HEPES-Tyrodes Puffer für die Messung der Calciummobilisierung

10,0 mM	HEPES
137 mM	NaCl
2,8 mM	KCl
1 mM	MgCl ₂
12 mM	NaHCO ₃
0,4 mM	Na ₂ HPO ₄
5,5 mM	Glucose
0,35 %	BSA (w/V)
	// pH 7,4 partikelfrei filtriert

FACS Puffer

0,5 %	PBS
0,1 %	BSA
	// steril filtriert

Sonstige Chemikalien und Biochemikalien

Fluo-3 AM	Sigma Aldrich
Probenecid	Sigma Aldrich
Mepacrin	Sigma Aldrich

2.4. Charakterisierung der Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist heute fester Bestandteil der klinischen Diagnostik und erlaubt eine qualitative und quantitative Vermessung und Immunphänotypisierung intakter, apoptotischer und toter Zellen. In der Routine findet diese Methode z.B. Anwendung in der Leukämietypisierung. Durch die Analyse einer großen Zellzahl in kürzester Zeit und mit minimalem Materialeinsatz eignet sich diese Methode nicht nur zur Subklassifizierung von Lymphomen und Leukämien, sondern ist auch in der Lage, minimale Resterkrankungen zu identifizieren.

Das hier verwendete Durchflusszytometer FACSCanto II der Firma Becton Dickinson ist ein Gerät der neueren Generation und ermöglicht die simultane Messung von bis zu 8 Fluorochromen, die durch drei Laser angeregt werden.

2.4.1. Aufbau und technische Grundlagen

Das Multi-Farben-Durchflusszytometer FACSCanto II beinhaltet (1) die Strömungselemente, (2) das optische System und (3) eine elektronische Einheit. Die Strömungseinheit generiert einen Hüllstrom um eine Suspension von Zellen, verdünnt und vereinzelt diese und leitet sie fokussiert und im rechten Winkel an einer Lichtquelle (Messpunkt) vorbei. Anhand der Streuung des Anregungslichts (in Vorwärts- und Seitwärtsrichtung) und der Detektion von Fluoreszenz durch Anregung von Fluorophoren werden physikalische (Größe und Granularität) und molekulare Eigenschaften jeder einzelnen Zelle am Messpunkt simultan analysiert.

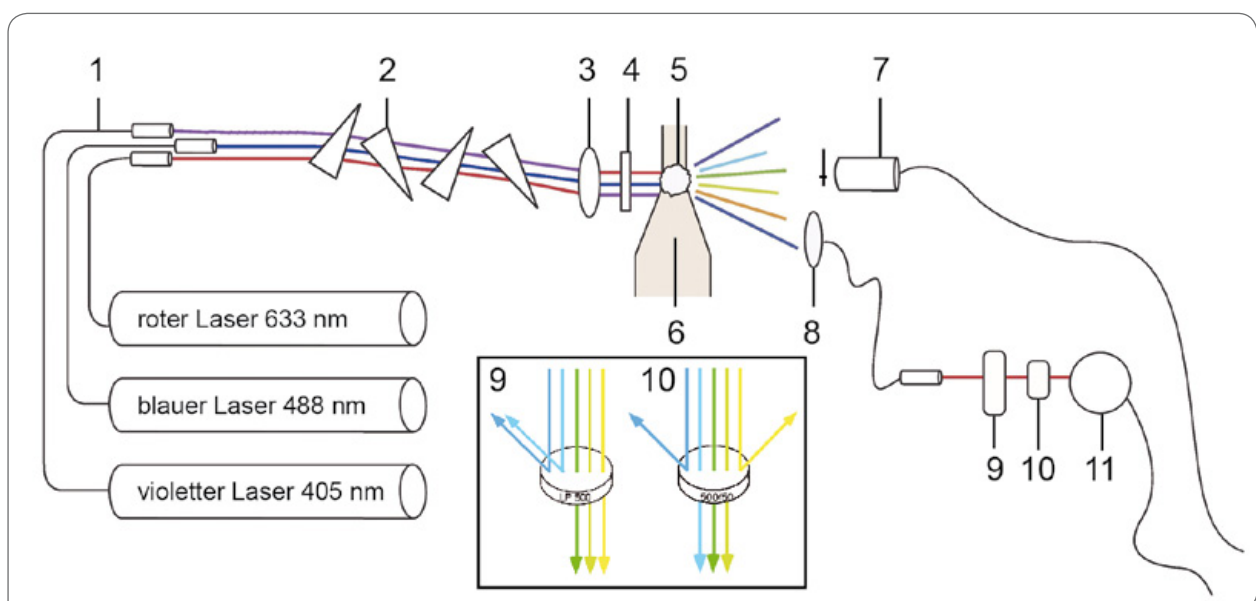


Abb. 5 Weg des Lichtes durch das Durchflusszytometer. 1 Glasfaserkabel, 2 Prismen, 3 Fokussierungslinse, 4 Führungsplatte, 5 Fluoreszenzgefärbte Zelle am Messpunkt, 6 Durchflusskammer, 7 Diodendetektor, für den Vorwärtsstreuung, 8 Sammellinse, 9 Langpassfilter, 10 Bandpassfilter, 11 Photomultiplier Detektor (Bildquelle: BD)

Die optische Einheit des FACSCanto II besteht aus 3 Lasern (488nm-blau, 633nm-rot, 405nm-violett). Wie in Abbildung 5 dargestellt, wird Laserlicht über Glasfaserkabel durch verschiedene Prismen und Linsen gebündelt und zum Messpunkt geleitet. Die vorbeiströmenden Zellen streuen das Laserlicht und fluoreszieren. Das Streu- und Fluoreszenzlicht wird durch Linsen in die Sammeleinheiten des Zytometers geleitet, passiert dort verschiedene Filter, die Licht einer bestimmten Wellenlänge separieren und wird von Photomultipliern detektiert. Die Photomultiplier verstärken das Signal und generieren einen elektrischen Strom, dessen Stärke direkt mit der Fluorophordichte korreliert und der in der elektronischen Einheit digitalisiert, umgewandelt und an den Computer gesendet wird.

2.4.2. Optische Messung, Auswahl der Fluorochrome und Kompensation

Das Laserlicht wird am Messpunkt abhängig von den physikalischen Eigenschaften der Zelle gebrochen. Die Intensität des Vorwärtstreulichts (FSC „Forward Scatter“) ist ein Maß für die Größe der brechenden Zelle. Das Seitwärtstreulicht (SSC „Side Scatter“) ist ein Maß für die Granularität und die Dichte der brechenden Zelle. Zur Bestimmung

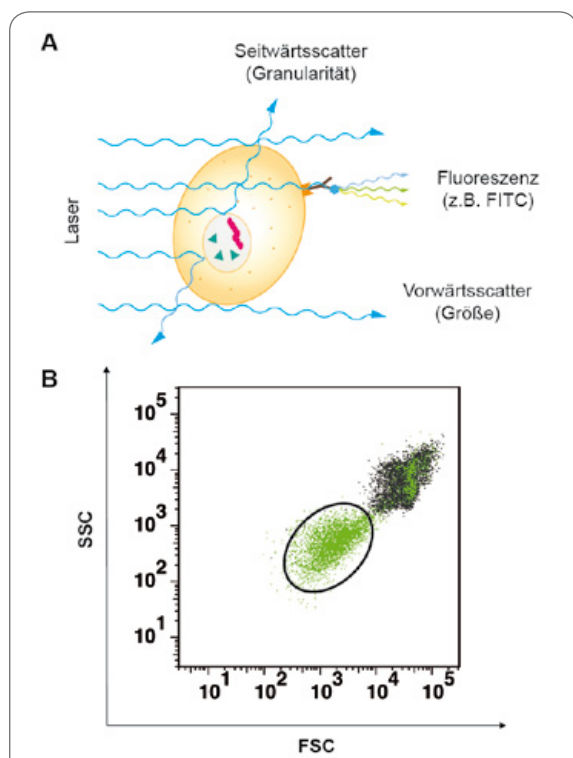


Abb. 6 Charakterisierung der Thrombozyten durch Scattereigenschaften und Fluoreszenz. **A** Schematische Darstellung des Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsscatters (SSC). **B** Dotplot: CD41 positive Thrombozyten (grün, eingekreist) grenzen sich sehr gut durch ihre Scattereigenschaften von den anderen Zellen des Blutes ab. Thrombozytenaggregate weisen die gleichen Scattereigenschaften wie die anderen Blutzellen auf.

des SSC wird das Licht gemessen, was von den Zellen im rechten Winkel gebrochen wird. Thrombozyten können anhand ihrer geringen Größe im Punktwolkendiagramm (Dotplot) klar von anderen Zellen des Blutes abgegrenzt werden (Abb. 6).

Neben dem Streulicht können mit dem Durchflusszytometer membranständige oder intrazytoplasmatisch gebundene, fluoreszierende Farbstoffe gemessen werden. Fluoreszenz ist die kurzzeitige, spontane Emission von Licht beim Übergang eines elektronisch angeregten Systems (im Falle der Durchflusszytometrie durch den entsprechenden Laser) in einen Zustand niedriger Energie, wobei die Wellenlängen der eingehenden Photonen im Sinne des „Stokes-Shifts“ immer kürzer sind als die der ausgehenden. Die Intensität der Fluoreszenzsignale entspricht der Menge an Fluorophoren oder den biochemischen Eigenschaften der Zelle, wie z.B. der

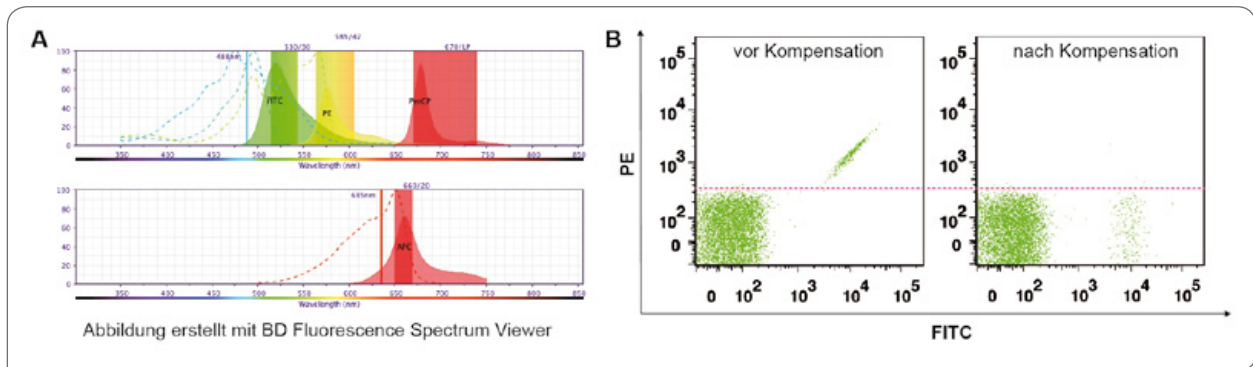


Abb. 7 Spektrumübersicht eingesetzter Fluorochrome. **A** Für die Thrombozytendiagnostik sind aktuell direkt markierte Antikörper mit den Fluorochromen FITC, PE, PerCP, PE-Cy5 (nicht dargestellt, im gleichen Kanal mit PerCP) und APC verfügbar. Die Fluorochrome werden durch einen Laser (vertikale Linie) mit einer Wellenlänge innerhalb des Anregungsspektrums (gestrichelte Linie) angeregt. Das Licht des Lasers wird vom Fluorochrom absorbiert, sodass ein energieärmeres Licht emittiert wird (gefüllte Kurve). Das emittierte Licht wird nach Passage entsprechender Filter (breite Streifen) in ein elektrisches Signal umgewandelt. **B** Durch Überlagerung des emittierten Lichtes der Fluorochrome FITC und PE kommt es zu falsch positiven Ergebnissen im PE Kanal einer ausschließlich FITC gefärbten Probe (links). Durch die Kompensation kann dieser Effekt ausgeglichen werden (rechts).

intrazellulären Calciumkonzentration. Die Auswahl des Filters richtet sich nach dem Spektrum des emittierten Lichtes des eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffes. Ein Langpassfilter dient hier dazu, Licht ab einer bestimmten Wellenlänge (z.B. LP590 > 590 nm) zu separieren, ein Bandpassfilter separiert das Licht eines bestimmten Wellenlängen-Spektrums (z.B. BP 500/50 475-525 nm). In Abbildung 7A sind die Spektren und Filter der in dieser Arbeit eingesetzten Fluorochrome dargestellt.

Die Auswahl der Fluorochrome für die verschiedenen Antikörper erfolgte nach den folgenden Grundsätzen:

- so weit möglich immer das hellste bzw. sensitivste verfügbare Fluorochrom für das am niedrigsten exprimierte Antigen wählen (CAVE: durch Überstrahlung vermindert sich die Sensitivität)
- niedrig exprimierte Antigene möglichst nicht mit hoch exprimierten Antigenen simultan analysieren
- für die Einstellung der Instrumente und die Kompensation der Fluorochrome immer Antikörper gegen hoch exprimierte Antigene nutzen
- eine Überlappung der Spektren möglichst vermeiden
- bei Verwendung von Tandem-Konjugaten (z.B. PE-Cy5, PerCP) Proben umgehend analysieren, denn diese sind besonders anfällig für Hitze und Licht

Durch die simultane Messung mehrerer Fluorochrome kommt es zu Überlagerungen der Emissionsspektren, was zu falsch positiven Ergebnissen führt. In Abbildung 7B wird die Überlappung der Emissionsspektren der beiden häufig genutzten Fluorochrome FITC und PE gezeigt. Die Kompensation der einzelnen, angeregten Fluorochrome

gleicht diese Überlappung aus und verhindert falsch positive Ergebnisse. Während die Kompensation von bis zu drei Fluorophoren noch von Hand durchgeführt werden kann, ist dies bei multiplen Fluorophoren praktisch nicht mehr möglich. Die Software FACSDiva stellt einen Algorithmus zur Verfügung, welcher die Kompensation von bis zu 8 Fluorochromen anhand von Positiv- und Negativkontrollen automatisch berechnet. Alternativ ist auch eine nachträgliche Kompensation mittels der Auswertungssoftware für FACS-Daten FlowJo möglich.

2.4.3. Kontrollen

Um unspezifische Bindung der Antikörper auszuschließen, werden Isotypkontrollen eingesetzt. Eine Isotypkontrolle ist eine Färbung mit einem Antikörper vom gleichen Subtyp wie der spezifische Antikörper, welcher jedoch gegen ein nicht relevantes Antigen gerichtet ist. Isotypkontrollen sollten vom gleichen Hersteller wie die spezifischen Antikörper sein und müssen äquivalent zu den eingesetzten Fluorochromen der spezifischen Antikörper simultan gemessen werden. Da der Einsatz von Isotypkontrollen kostspielig und zeitaufwendig ist, muss die Notwendigkeit dieser gut bedacht sein.

In der Multi-Farben-Analyse ist es außerdem üblich, „Fluorescence-Minus-One“ (FMO) Kontrollen einzusetzen. Dabei wird das Fluorochrom, welches kontrolliert werden soll, weggelassen. Anhand der FMO-Kontrollen können falsch positive Ergebnisse durch Überstrahlung aus anderen Kanälen ausgeschlossen werden. Außerdem dienen sie als Leerkontrolle, um bei der Auswertung eindeutig positive Signale zu identifizieren.

Für Funktionstests von Patientenblut ist es wichtig, immer eine Gesundspenderkontrolle mitzuführen. So können Funktionsverluste von eingesetzten Stimulanzen und systematische Messfehler kontrolliert werden.

2.4.4. Datenauswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte nach Datenexport aus der FACSDiva Software mittels FlowJo 7.6.3. von Treestar. Hier wurden die Thrombozyten zunächst anhand eines eindeutigen Markers, z.B. CD41a, identifiziert und die zu untersuchende Population im Punktwolkendiagramm (Dotplot) „gated“. Beim „Gating“ wird über ein Analysefenster „Gate“ eine Population festgelegt, welche einer („Gating“ im Histogrammplot) oder mehreren („Gating“ im Dotplot) bestimmten Eigenschaften entspricht. Zur Analyse der Fluoreszenzintensität für die verschiedenen Antikörper wurde die mittlere Fluoreszenzintensität „MFI“ bestimmt. Es gibt keine klare Vorgabe, ob die MFI den Median oder den Mittelwert „Mean“ einer Wertemenge meint. In dieser Arbeit beschreibt die MFI ausschließlich den Median, welcher der 50. Perzentile entspricht und robuster gegenüber Ausreißern ist.

Für die Analyse der Reaktion auf eine Stimulierung der Thrombozyten wurde außerdem der Anteil an Zellen bestimmt, die nach Stimulierung positiv für einen bestimmten Marker werden, also den "Percent over Threshold". Hierzu wird anhand der FMO-Kontrolle der Schwellenwert „Threshold“ für den zu untersuchenden

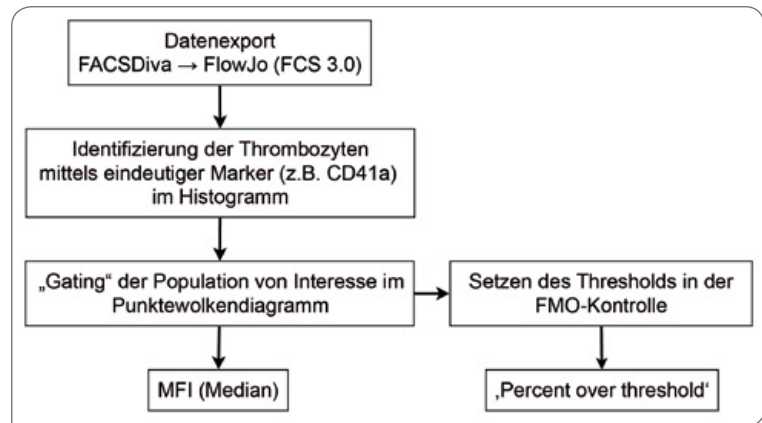


Abb. 8 Ablauf der Datenauswertung

Antikörper gesetzt (entspricht der 98.-100. Perzentile) und dann auf alle anderen Proben übertragen. Allgemein ist zu sagen, dass alle „Gates“, die anhand von Perzentilen definiert wurden, für jeden Probanden neu gesetzt wurden. Alle anderen „Gates“, wurden einmalig anhand einer durchschnittlichen Thrombozytenpopulation eines Gesundspenders gesetzt und dann auf alle Proben übertragen.

Zum statistischen Vergleich der Stichproben aus der Gesundspender- und Patientenpopulation wurde der zweiseitige Student'sche t-Test angewandt. Eine Signifikanz wurde ab einem p-Wert von < 0,05 (*) angenommen, als stark signifikant galten p-Werte < 0,01 (**).

Um die Variabilität der Ergebnisse in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer zu quantifizieren, wurde der Variabilitätskoeffizient als Quotient von Standardabweichung und Mittelwert berechnet.

2.5. Färbe- und Messprotokolle

2.5.1. Immunfluoreszenzfärbung und Funktionsbeurteilung der Thrombozyten

Citrat-Vollblut wird zunächst im Verhältnis 1:10 mit HEPES-Tyrodes Puffer verdünnt und in 49 µl Proben aliquotiert. Für die Beurteilung der Reaktivität wird den Proben 1 µl eines Agonisten in der gewünschten Konzentration (siehe Tabelle 6, Kapitel 3.1.1) zu gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur stimuliert. Für die reine Immunphänotypisierung entfällt dieser Schritt. Anschließend werden den Proben die gewünschten Antikörper zu gegeben. Die benötigten Volumina für ein optimales Färbeergebnisse wurden austitriert und können der Tabelle 5 entnommen werden.

Tabelle 5 Eingesetztes Volumen der Antikörper.

Antikörper	Volumen
CD49b, CD49e, CD49f	1 µl
CD41a, CD61, CD42a, CD42b, CD29, CD63, CD62P	5 µl
PAC-1	15 µl

Die Proben werden für 20 min bei Raumtemperatur und in Dunkelheit mit den Antikörpern inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Reaktion mit 1,5 ml FACS-Puffer abgestoppt und die Proben sofort analysiert oder bis zur Messung in Dunkelheit auf Eis gelagert.

2.5.2. Messung der intrazellulären Calciummobilisierung

Der Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration nach Stimulation mit einem Agonisten kann durch den Calcium-Chelator Fluo-3 in der Durchflusszytometrie sichtbar gemacht werden. Ein Defekt in der frühen Signalübertragung der Zelle kann so aufgedeckt werden.

Zur Messung der intrazellulären Calcium-Mobilisierung wird zunächst Citrat-Vollblut mit modifizierten HEPES-Tyrodes Puffer im Verhältnis 1:10 verdünnt. Um eine möglichst homogene Färbung zu erreichen, wird die Probe mit 2,5 mM Probenecid, einem Hemmer des Typ1-Transporters für organische Anionen, versetzt. Die Proben werden damit 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit dem Calcium-Chelator Fluo-3 in einer Konzentration von 5 μM beladen und für 35 min bei 37°C inkubiert (Abb. 9). Nun werden die Proben in 25 μl Proben aliquotiert und mit einem Antikörper zur eindeutigen Identifizierung der Thrombozyten, meist CD41a, für 15 min in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben werden anschließend auf ein Volumen von 720 μl mit modifizierten HEPES-Tyrodes Puffer aufgefüllt und am FACSCanto II analysiert. Die folgenden Zeiten und Einstellungen der Durchflussrate müssen während des gesamten Messvorgangs genau eingehalten werden. Während der ersten 90 sec der Analyse bei einer Durchflussrate von 120 $\mu\text{l}/\text{min}$ werden die Einstellungen optimiert und die Thrombozyten „gaget“, die Daten werden allerdings noch nicht aufgezeichnet. Fluo-3 ist im ungebundenen Zustand wenig fluoreszent; dieses basale Signal wird nun für exakt 50 sec bei einer Durchflussrate von 60 $\mu\text{l}/\text{min}$ aufgezeichnet. Anschließend wird die Probe entnommen, um sie mit dem Agonisten

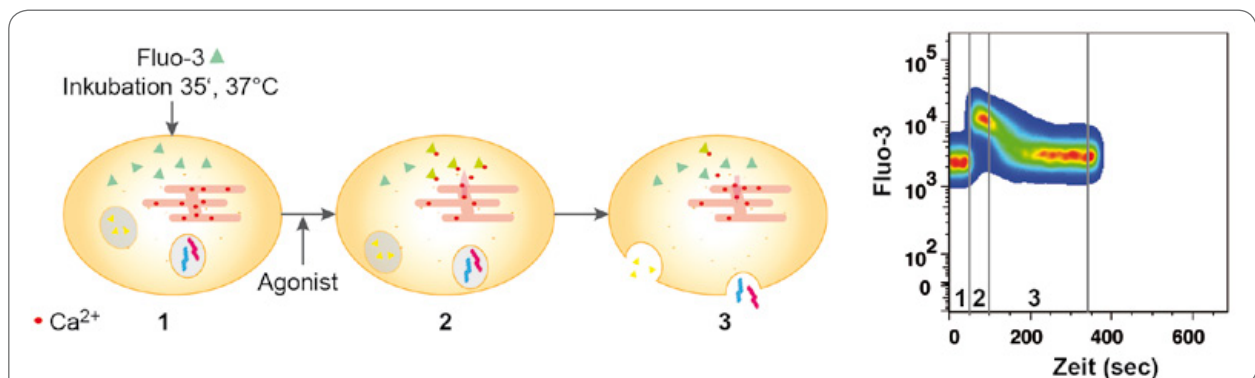


Abb. 9 Messung der Calciummobilisation. Nach Beladung der Thrombozyten mit dem Calciumchelator Fluo-3 wird das Ausgangssignal für 50 sec aufgezeichnet (1). Anschließend wird der Probe ein Agonist hinzugefügt, der zu einem rasanten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration führt und damit zur Bindung von Fluo-3 an Calcium. Fluo-3 beginnt zu fluoreszieren, was im Dichteplot eindeutig nachvollzogen werden kann (2). Die Calciumkonzentration sinkt anschließend wieder ab und das Fluoreszenzsignal fällt auf das Ausgangsniveau zurück (3).

in der gewünschten Konzentration zu versetzen. Die Zugabe von 10 µl des Agonisten entspricht zu diesem Zeitpunkt einer Verdünnung von 1:50. Die Proben werden kurz gemischt und so schnell wie möglich in der Messvorrichtung arretiert, um die Messung wieder frei zu geben. Durch die Zugabe des Agonisten steigt die intrazelluläre Calciumkonzentration. Die Calcium-Ionen gehen mit Fluo-3 eine Chelat-Bindung ein und bringen den Farbstoff zum Fluoreszieren. Dieser Anstieg des Fluoreszenzsignals und die sich anschließende langsame Abnahme wird für weitere 5 min aufgezeichnet.

2.5.3. Mepacrin-Assay

Die Degranulierung der δ -Granula kann durch den Fluoreszenzfarbstoff Chinacrinidihydrochlorid, bekannter unter dem Namen Mepacrin, im Durchflusszytometer gemessen werden. Mepacrin wurde ursprünglich als Arzneistoff gegen Malaria entwickelt und wird von thrombozytären δ -Granula über eine Bindung an ATP, GTP etc. gespeichert.

Die Blutproben werden zunächst im Verhältnis 1:10 mit HEPES-Tyroses Puffer verdünnt und zu 45 µl-Proben aliquotiert. Anschließend werden die Proben mit 5 µl eines

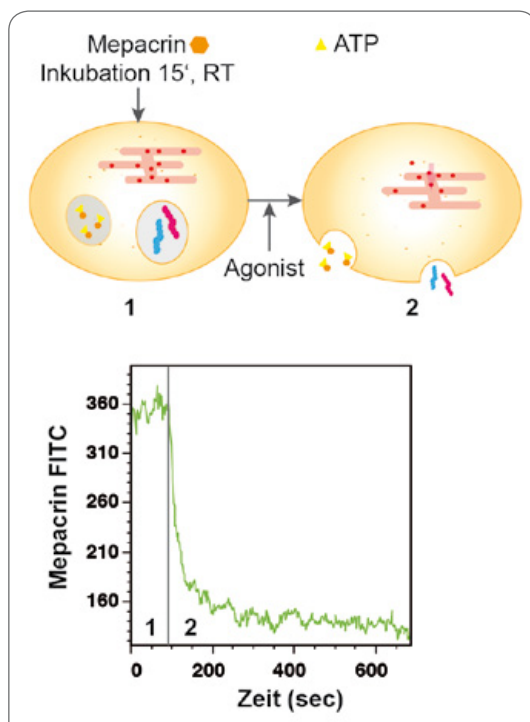


Abb. 10 Prinzip des Mepacrin-Assays. Die Thrombozyten werden zunächst mit Mepacrin beladen. (1) Die Grundbeladung wird für 50 s aufgezeichnet. Dann wird den Proben ein Agonist hinzugegeben. (2) Durch die Degranulierung nimmt das Signal ab.

Antikörpers zur eindeutigen Identifizierung der Thrombozyten, z.B. CD41a, 15 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Für die Beladung der Thrombozyten mit Mepacrin werden den Proben der Farbstoff mit einer Konzentration von 65 µM zugesetzt und 30 min bei 37 °C in Dunkelheit inkubiert (Abb. 10). Zum Schluss werden die Proben mit 1,5 ml FACS-Puffer aufgefüllt und am Durchflusszytometer analysiert.

Hierzu wird zunächst das basale Signal für Mepacrin für 50 sec aufgezeichnet. Anschließend wird die Probe entnommen, 490 µl der Probe in ein neues Röhrchen überführt und 10 µl des Agonisten in der gewünschten Konzentration hinzugegeben, kurz gemischt und sofort weiter analysiert. Durch die Ausschüttung der Granula und somit auch des Farbstoffes ergibt sich eine Abnahme des Fluoreszenzsignals, welche gemessen und dokumentiert werden kann (Abb. 10).

3. Ergebnisse

3.1. Basismodul zur Immunphänotypisierung und Funktionsbeurteilung der Thrombozyten

3.1.1. Konzept

Es ist ein Ziel dieser Arbeit, ein Basismodul für die durchflusszytometrische Analyse von Thrombozyten zu entwickeln, welches primär durchgeführt wird, wenn Blut eines Patienten mit Verdacht auf Störung der primären Hämostase unklarer Genese untersucht werden soll. Dieses Basismodul soll schnell und einfach durchführbar sein und eine Vergleichbarkeit sowie Dokumentationsfähigkeit der erhobenen Daten gewährleisten. Außerdem soll dieses Modul in der Lage sein, möglichst viele Thrombozytopathien zu identifizieren und richtungsweisend für alle anderen Störungen der primären Hämostase sein. Zu beachten ist weiterhin, dass Standarddiagnostik wie Blutbild, Gerinnungstests, PFA-100®, Aggregometrie etc. zu diesem Zeitpunkt meist schon erfolgt sind; es sei denn, es steht nicht genügend Material für diese Tests zur Verfügung (z.B. Neugeborene und Kinder, Patienten mit ausgeprägter Thrombozytopenie).

Um die beiden häufigsten Thrombozytopathien MG und BSS zu identifizieren, soll zunächst die Expression des Fibrinogen- und vWF-Rezeptors beurteilt werden. Für die Beurteilung des Fibrinogenrezeptors werden Antikörper gegen den gesamten Integrin-Rezeptor (CD41a) und gegen die β 3-Untereinheit (CD61) eingesetzt. Ein BSS wird durch Antikörper gegen die beiden am häufigsten betroffenen Glykoproteine des vWF-Rezeptors GPIX (CD42a) und GPIb α (CD42b) ausgeschlossen. CD41a und CD42b sind außerdem geeignete Linienmarker zur späteren eindeutigen Identifizierung der Thrombozyten.

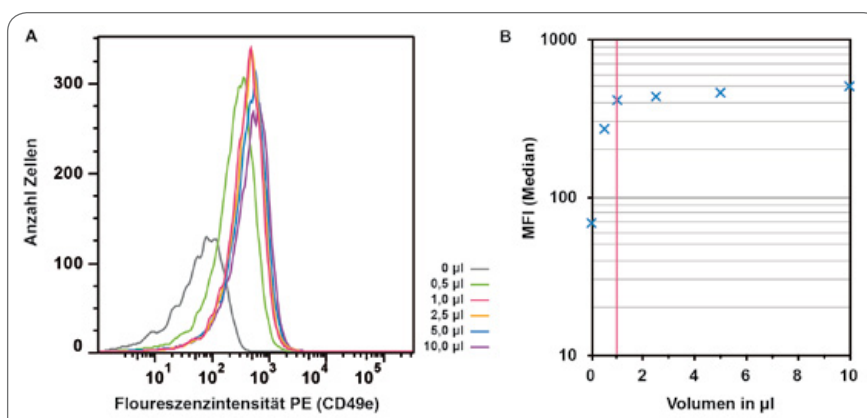


Abb. 11 Titration des Antikörpers CD49e. **A** Die Thrombozyten eines Gesundspenders wurden mit verschiedenen Volumina des Antikörpers CD49e inkubiert. **B** Anhand der MFI wurde das kleinste Volumen ermittelt, mit dem noch ein optimales Färbeergebnis erreicht wurde (durchgezogene Linie).

Des Weiteren soll die Expression der Integrinrezeptoren für Kollagen, Fibronectin und Laminin analysiert werden. Hierzu kommen Antikörper gegen die diesen Rezeptoren gemeinsame β 1-Untereinheit (CD29) und gegen die

jeweils spezifische α -Untereinheit (CD49b, CD49e, CD49f) zum Einsatz. Um ein optimales Färbeergebnis zu erhalten, wurde für jeden Antikörper eine Titrationsreihe angelegt. Als optimal wurde die geringste Konzentration angenommen, die das beste Fluoreszenzsignal lieferte wie beispielhaft für CD49e in Abbildung 11 dargestellt.

Die Analyse der Thrombozytenfunktion erfolgt *in vitro* durch die Stimulation mit Agonisten und der anschließenden Beurteilung der Reaktivität durch die Expression bestimmter Marker. Für das Basismodul werden zur Stimulation der Thrombozyten die beiden häufig verwendeten Agonisten ADP, als schwacher Agonist, und TRAP6, als starker Agonist, ausgewählt. Diese Agonisten aktivieren unterschiedliche Signalwege: TRAP6 löst über eine starke Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration die Degranulierung und somit die „Second Wave“ aus, welche die Wirkung anderer Agonisten verstärkt. ADP ist dagegen hauptsächlich für die Aktivierung des Fibrinogenrezeptors verantwortlich. Zur Beurteilung der α -Degranulierung werden Antikörper gegen P-Selektin der α -Granulamembran (CD62P) eingesetzt. Die Degranulierung der lysosomalen und zum Teil auch der δ -Granula wird durch Antikörper gegen „Lysosome-associated membrane glycoprotein 3“ (CD63) nachgewiesen. Der Antikörper-Klon PAC-1 bindet an ein Epitop des aktivierten Fibrinogenrezeptors und bildet so die Integrinaktivierung ab. Die jeweiligen Agonisten sollen in einer suboptimalen und einer optimalen Konzentration zum Einsatz kommen. Um diese zu ermitteln, wurde eine Titrationsreihe angelegt wie beispielhaft für TRAP6 in Abbildung 12 zu sehen ist.

Die Wahl der geeigneten Fluorochrome für die ausgewählten Antikörper wurde nach den Grundsätzen wie im Kapitel 2.4.2. aufgeführt getroffen. Die Verfügbarkeit direkt-gekoppelter Antikörper war dabei ein begrenzender Faktor, es wurde aber versucht, so viele Fluorophore wie möglich simultan zu messen, um die Probenanzahl

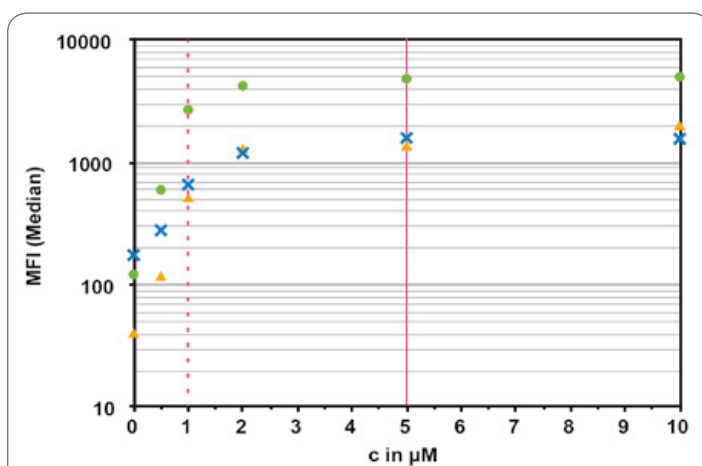


Abb. 12 Titration der TRAP6-Konzentration. Die Thrombozyten eines Gespendsers wurden mit TRAP6 in verschiedenen Konzentrationen stimuliert und anhand der MFI für die Aktivierungsmarker CD62P (●), CD63 (×) und PAC-1 (▲) die suboptimale (gestrichelte Linie) und die optimale Konzentration (durchgezogene Linie) für die Stimulation ermittelt.

möglichst gering zu halten.

Für eine gute Auswertbarkeit der Messungen sollten ins Pipettierschema außerdem FMO-Kontrollen integriert werden. Nach diesen Vorgaben wurde ein Analyseschema (Tabelle 6) entwickelt, welches simultan 4 Fluorochrome (FITC, PE, PerCP oder PE-Cy5, APC) einbezieht, welche durch den 488nm oder den 633nm Laser angeregt werden,

Tabelle 6 Analyseschema des Basismoduls

#	Antikörper				Agonist	Rationale der Messung
	FITC	PE	PeCy5/ PerCP	APC		
1	CD61	CD29	CD42a PerCP	CD42b	-	Beurteilung der Rezeptorexpression zum Ausschluss des Bernard-Soulier-Syndroms, dem Morbus Glanzmann und von Defekten des Kollagen-, Laminin- und Fibronectinrezeptors
2	CD49b	CD49e	CD49f PE-Cy5	CD41a	-	
3	PAC-1	CD63	CD41a PE-Cy5	CD62P	-	Beurteilung der Grundexpression von Aktivierungsmarkern (Frage nach einer evtl. Voraktivierung)
4	-	-	CD41a PE-Cy5	CD62P	ADP 2µM	Funktionsbeurteilung durch Expression von Aktivierungsmarkern nach Stimulation mit Agonisten zum Ausschluss von Defekten: <ul style="list-style-type: none"> • des PAR1- und ADP-Rezeptors • der Degranulierung • der Aktivierung des Fibrinogenrezeptors • Hypo- und Hyperreaktivität
5	PAC-1	CD63	CD41a PE-Cy5	FMO APC	ADP 5µM	
6	PAC-1	FMO PE	CD41a PE-Cy5	CD62P	TRAP6 1 µM	
7	FMO FITC	CD63	CD41a PE-Cy5	CD62P	TRAP6 5µM	

und aus insgesamt 7 Proben besteht. Für das Basismodul werden 50 µl Citrat-Vollblut benötigt.

Für die simultane Messung der vier Farben wird eine Kompensation durchgeführt (je mit PerCP oder PE-Cy5) und eine Messvorlage angelegt. Die Einstellungen am FACS-Gerät wird für alle Messungen des Basismoduls beibehalten. Pro Probe werden 5.000-10.000 CD41a- oder CD42b-positive Ereignisse aufgezeichnet und eine maximale Durchflussrate von 10.000 events/sec eingehalten. Alle Parameter werden mit logarithmischer Verstärkung aufgenommen. Die Aufarbeitung der Proben mit anschließender Messung (eine Kontrolle + ein Patient, ohne Auswertung) dauert im Schnitt eine Zeitstunde.

3.1.2. Auswertungsstrategie

Charakterisierung der Thrombozytenpopulation

Am Anfang jeder Analyse von Zellen steht die Beurteilung der Zellzahl und der Morphologie. Die Thrombozytenzahl wird bei einem kleinen Blutbild immer mit bestimmt, ebenso das MPV. Allerdings ist die Bestimmung des MPV bei einer ausgeprägten Thrombozytopenie aus technischen Gründen an Sysmex-Geräten nicht möglich. In diesem Fall kann die Morphologie im Blutaussstrich beurteilt werden. Eine quantitative Auswertung ist bei dieser Methode aber nicht möglich. Da die Morphologie aber richtungsweisend in der Diagnostik ist, sollte diese unbedingt in die Datenauswertung integriert werden.

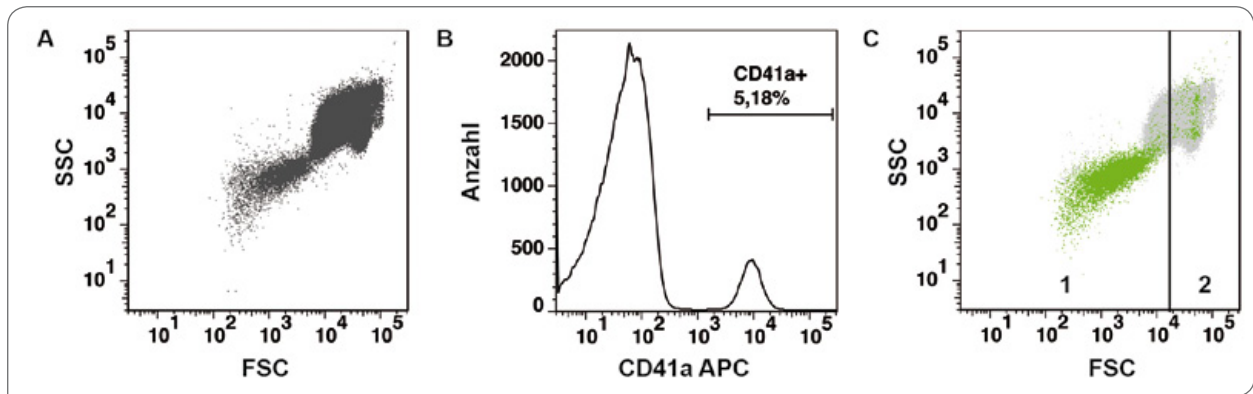


Abb. 13 Gatingstrategie zur Charakterisierung der Thrombozytenpopulation. **A** Punktwolkendiagramm (Dot-plot) Vollblut. **B** Identifizierung der Thrombozyten im Vollblut anhand der CD41a-Expression im Histogrammplot. **C** Dotplot-Overlay von CD41a-positiven Ereignissen (grün) und CD41a-negativen Ereignissen (grau). Die Abgrenzung einzelner Thrombozyten (1) von Thrombozytenaggregaten (2) erfolgte anhand der Scattereigenschaften der CD41a-positiven Ereignisse. Die MFI von FSC und SSC im Gate 1 charakterisiert die Population.

Zur quantitativen Beurteilung der Thrombozytenmorphologie werden zunächst einzelne Thrombozyten von Thrombozytenaggregaten getrennt und die MFIs des Vorwärts- und Seitwärtsscatters der einzelnen Thrombozyten dokumentiert (Abb. 13). Aus diesen beiden Werten wird der Quotient (SSC/FSC) gebildet. Außerdem wird der Anteil der Aggregate an der gesamten CD41a-positiven Population dokumentiert.

Quantifizierung der Rezeptor-Expression

Die Expression der Rezeptoren korreliert mit der MFI des Rezeptor-markierenden Antikörpers. Es ist bekannt, dass diese MFI stark von der durchschnittlichen Größe der beurteilten Zelle abhängig ist. Das bedeutet, je größer die Zelle, desto mehr Rezeptoren sind oft auf der Oberfläche, desto höher ist die MFI. Dieser Fakt würde bei Patienten mit Makro- oder Mikrothrombozytopenie zu falsch hohen oder niedrigen MFIs führen. Um dies zu vermeiden, werden die Thrombozyten für die Analyse der Rezeptorexpression in ein enges von FSC und SSC abhängiges „Gate“ gesetzt und die MFIs der jeweiligen Fluorophore dokumentiert (Abb. 14).

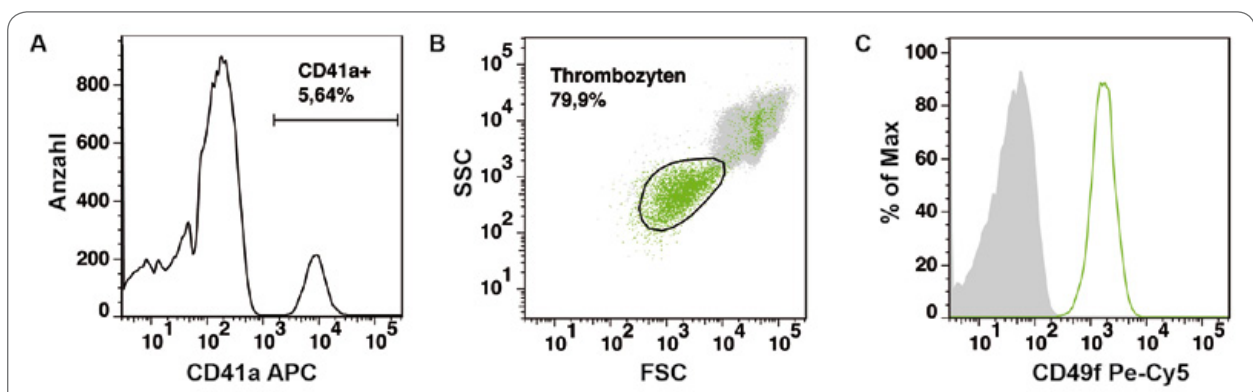


Abb. 14 Gatingstrategie zur Analyse der Rezeptorexpression. **A** Identifizierung der Thrombozyten anhand der CD41a-Expression im Histogrammplot. **B** Gating der CD41a-positiven Thrombozytenpopulation (grün) im Dotplot. **C** Expression des CD49f Rezeptors (grün) mit der dazugehörigen FMO-Kontrolle (grau) im Histogrammplot.

Analyse der Thrombozytenfunktion

Das „Gating“ für die Analyse der Reaktivität erfolgt grundsätzlich auf gleiche Art und Weise wie für die Beurteilung der Population (s.o.). Im Histogrammplot für die Fluoreszenzintensität der Thrombozytenpopulation erkennt man eine deutliche Zunahme des Signals nach Stimulation (Abb. 15).

Um diese Zunahme zu quantifizieren, wird in der FMO-Kontrolle ein Schwellenwert gesetzt, welcher der 98. Perzentile der Fluoreszenzintensität des jeweiligen Aktivierungsmarkers entspricht (Abb. 15). Dieser Schwellenwert wird auf alle gefärbten Proben übertragen und beschreibt so den Anteil an für den Farbstoff positiven Zellen „Percent over Threshold“. Außerdem werden die MFIs der einzelnen Thrombozyten für den jeweiligen Kanal dokumentiert.

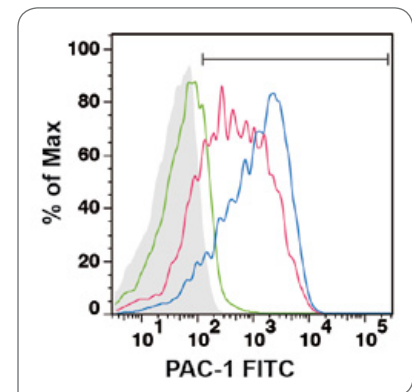


Abb. 15 Analyse der Reaktivität anhand des Aktivierungsmarkers PAC-1 im Histogrammplot. Anhand der 98. Perzentile der FMO-Kontrolle (·) wird ein Schwellenwert gesetzt, welcher den Anteil an PAC-1 positiven Zellen in den anderen Proben beschreibt. - unstimuliert - TRAP6 1µM - ADP 5 µM.

3.1.3. Qualitätskontrollen

Da die durchflusszytometrische Diagnostik der Thrombozytenfunktion nur in sehr wenigen spezialisierten Laboratorien möglich ist, stellt sich häufig die Frage wie schnell eine Probe aufbereitet und analysiert werden muss, um ein verlässliches Ergebnis zu erhalten, und wie die Blutprobe bis zur Analyse transportiert und gelagert werden muss. Es ist bereits bekannt, dass eine Lagerung der Thrombozyten bei Temperaturen unter 10°C zur Störung der Thrombozytenfunktion führt, weshalb das Citratblut bis zur Analyse streng bei Raumtemperatur gelagert werden muss. Über den Zeitrahmen, in dem eine Blutprobe analysiert werden muss, ist man sich immer noch uneinig. Für die Funktionsbeurteilung durch Lichttransmissionsaggregometrie wird in den Leitlinien der GTH zum Beispiel eine Analyse der Proben innerhalb von 4 Stunden empfohlen.³⁴

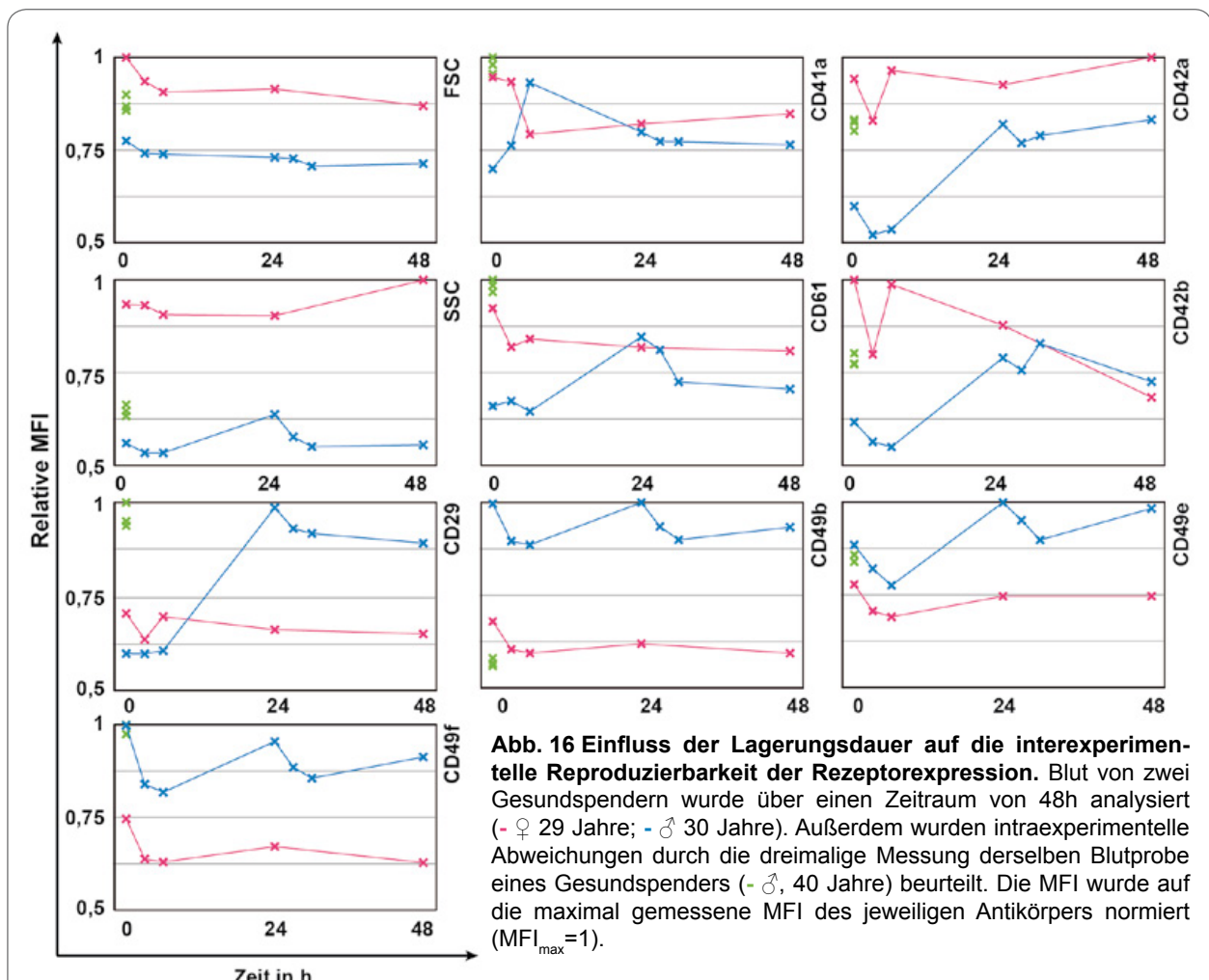
Um den Einfluss der Lagerungsdauer auf die Messergebnisse zu evaluieren, wird Citratblut von zwei Gesundspendern über einen Zeitraum von 48h in unterschiedlichen Intervallen mit dem entwickelten Basismodul analysiert. Die Blutproben werden bei Raumtemperatur in Ruhe gelagert und zur Analyse nach mehrmaligen Schwenken der Probe die benötigte Blutmenge entnommen. Zusätzlich wird das Basismodul bei einem dritten Gesundspender zum Zeitpunkt 0 dreimal parallel analysiert, um intraexperimentelle Abweichungen beurteilen zu können.

In Abbildung 16 ist die MFI des Vorwärts- und Seitwärtsscatters, sowie der Rezeptoren zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Messung aufgetragen. Die MFI wurde auf

die maximal gemessene MFI des jeweiligen Antikörpers normiert ($MFI_{max}=1$), um eine gute Vergleichbarkeit zu gewährleisten. In Tabelle 7 sind die Variationskoeffizienten für die einzelnen Parameter dargestellt. Im intraexperimentellen Vergleich zeigen die MFIs für den Vorwärts- und Seitwärtsscatter, sowie für die einzelnen Antikörper nur einen geringen Variationskoeffizienten von max. 2,8 % (CD29). Das heißt der Fehler durch intraexperimentelle Einflüsse wie Pipettiergenauigkeit und Messbedingungen ist vernachlässigbar. Im zeitlichen Verlauf zeigen die MFIs von Vorwärts- und Seitwärtsscatter nur eine geringe Variabilität mit einem maximalen Variationskoeffizienten von 5,9 %. Betrachtet man die MFIs für die einzelnen Antigene, fallen größere Schwankungen auf, jedoch können diese in keinen klaren Zusammenhang mit der Lagerungsdauer der Probe gebracht werden. Die MFIs nehmen im Laufe eines Messtages tendenziell ab, das wird vor allem bei den Antigenen CD49b, CD49e und CD49f deutlich. Es ist also anzunehmen, dass

Tabelle 7 Variationskoeffizienten für die inter- und intraexperimentelle (IE) Reproduzierbarkeit der Rezeptorexpression.

Anti-körper	IE	♀ 29 J	♂ 30 J
FSC	1,9 %	4,7 %	2,8 %
SSC	2,1 %	3,7 %	5,9 %
CD41a	1,9 %	7,1 %	8,4 %
CD61	1,3 %	5,0 %	9,9 %
CD42a	1,6 %	18,3 %	6,1 %
CD42b	1,7 %	13,7 %	15,1 %
CD29	2,8 %	4,0 %	21,0 %
CD49b	1,5 %	5,2 %	4,7 %
CD49e	1,0 %	4,3 %	8,5 %
CD49f	1,2 %	6,8 %	6,7 %



die abweichenden Messergebnisse auf andere, bislang nicht beeinflussbare Faktoren zurückzuführen sind. Außerdem können diese Ergebnisse Ausdruck der intrinsischen Variabilität der Spender sein. Vergleicht man die Rezeptorexpression der Probanden untereinander, fällt eine unterschiedliche Grundexpression der entsprechenden Antigene auf, was wiederum für die Variabilität der Rezeptorexpression der einzelnen Individuen spricht.

Die Reaktivität der Thrombozyten zeigt hingegen eine stärkere Abhängigkeit von der Lagerungsdauer der Proben wie in Abbildung 17 zu sehen ist. Hier wurde zur Auswertung der Anteil der positiven Zellen gewählt; der Kurvenverlauf in einem Diagramm mit den MFIs der Proben sieht fast identisch aus. Vergleicht man die Korrelationskoeffizienten in Tabelle 8 von „Percent over Threshold“ und MFI untereinander, so ist die Variabilität für den „Percent over Threshold“ in den meisten Fällen geringer. Dieser Parameter ist also im zeitlichen Verlauf robuster als die MFI. Die Stimulation mit der optimalen Dosis TRAP6 führt nach 24 h und teilweise auch nach 48 h zu einer adäquaten De-granulierung (CD62P, CD63). Auch die Aktivierung des Fibrinogenrezeptors nach Stimulation mit ADP in optimaler Dosis ist nach 24h

Tabelle 8 Variationskoeffizienten für die inter- und intraexperimentelle (IE) Reproduzierbarkeit der Thrombozytenfunktionsanalyse.

Anti-körper	Agonist	IE		♀ 29 J		♂ 30 J	
		%	MFI	%	MFI	%	MFI
CD62P	-	2,7 %	6,4 %	68,9 %	23,1 %	35,6 %	43,1 %
CD62P	ADP 2 µM	3,7 %	9,7 %	20,0 %	33,1 %	23,3 %	41,9 %
CD62P	TRAP6 1µM	3,1 %	3,7 %	39,3 %	36,7 %	46,4 %	75,8 %
CD62P	TRAP6 5µM	0,6 %	0,8 %	8,6 %	19,6 %	1,6 %	10,9 %
CD63	-	7,4 %	10,4 %	18,9 %	18,6 %	32,7 %	33,7 %
CD63	ADP 5 µM	1,8 %	7,7 %	19,9 %	32,3 %	19,6 %	30,3 %
CD63	TRAP6 5µM	0,3 %	5,5 %	9,2 %	35,3 %	2,5 %	18,5 %
PAC-1	-	10,2 %	15,2 %	62,8 %	75,2 %	43,6 %	56,3 %
PAC-1	ADP 5 µM	0,4 %	7,9 %	19,9 %	65,5 %	2,3 %	20,1 %
PAC-1	TRAP6 1µM	1,1 %	13,1 %	54,5 %	102,4 %	36,4 %	87,3 %

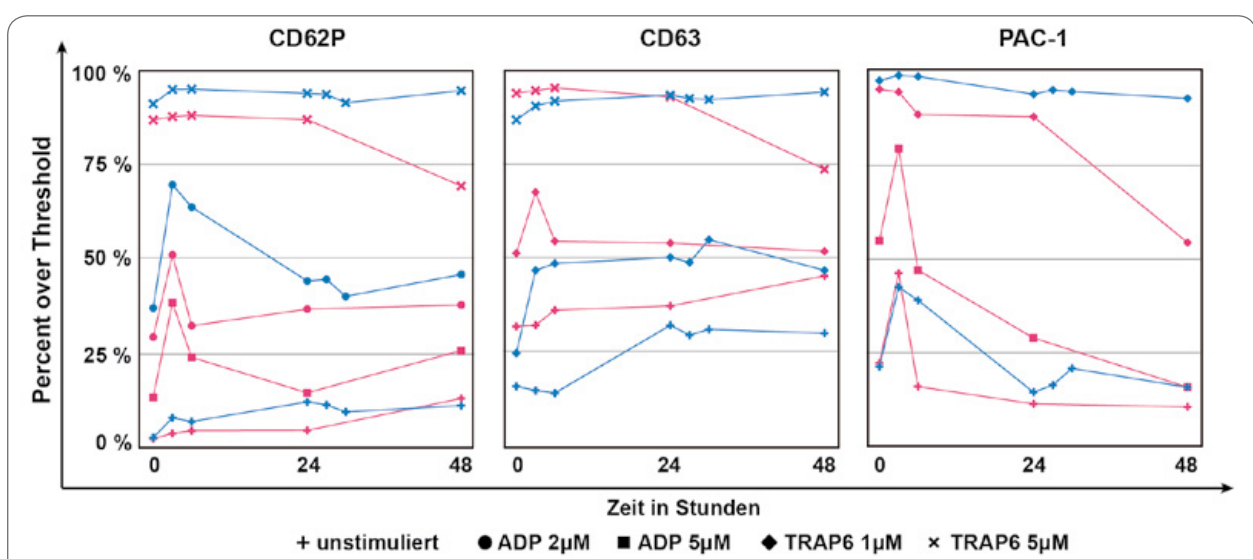


Abb. 17 Einfluss der Lagerungsdauer auf die Thrombozytenfunktion. Blut von 2 Gesundspendern wurde über einen Zeitraum von 48h immer wiederholt analysiert (- ♀ 29 Jahre; - ♂ 30 Jahre). Dargestellt ist die Veränderung des „Percent over Threshold“ in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer.

noch aussagekräftig. Die Reaktion auf eine Stimulation mit Agonisten in suboptimaler Konzentration nimmt nach 3-6 h deutlich zu und erreicht nach etwa 24 h wieder das Niveau der Reaktion direkt nach Blutentnahme. Den gleichen Kurvenverlauf findet man auch bei der Grundexpression des aktivierten Fibrinogenrezeptors. Die Grundexpression von CD62P und CD63 nimmt mit dem Alter der Proben tendenziell zu, bei CD63 ist diese Zunahme am deutlichsten zu erkennen. Dieses Ergebnis spricht für eine Zunahme der Voraktivierung je länger die Probe gelagert wurde. Der Vergleich der Messergebnisse der Spender untereinander zeigt auch hier wieder die Variabilität in der Reaktivität der einzelnen Individuen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Lagerungsdauer der Blutproben vor allem einen Einfluss auf die Reaktion der Thrombozyten nach Stimulation mit Agonisten in suboptimalen Konzentrationen sowie auf die Voraktivierung der Plättchen hat. Die Reaktivität auf Agonisten in optimalen Konzentrationen und die Rezeptorexpression sind hingegen weniger von der Lagerungsdauer der Blutprobe abhängig.

Aus diesen Ergebnissen ergibt sich, dass die Blutentnahme vom Patienten und vom Gesundspender im Optimalfall zur gleichen Zeit vorgenommen und die Proben bis zur Messung unter gleichen Bedingungen gelagert werden sollten. Die Messung sollte idealerweise am Abnahmetag erfolgen, eine Analyse am Folgetag innerhalb von 24 h ist auch akzeptabel. Eine Analyse zu einem späteren Zeitpunkt ist nur noch eingeschränkt beurteilbar.

3.1.4. Variabilität der Rezeptorexpression und Thrombozytenfunktion von Gesundspendern

Wie ansatzweise schon im Experiment zur interexperimentellen Reproduzierbarkeit gesehen, ist die Rezeptorexpression und die Reaktivität der Thrombozyten nicht bei jedem Menschen genau gleich, sondern zeigt eine natürliche Variabilität. Diese Variabilität wird anhand von Blut von insgesamt 35 erwachsenen Gesundspendern quantifiziert. Davon werden 23 am Tag der Blutentnahme, sechs am Tag 1, jeweils zwei am Tag 2 und 3, und jeweils einer am Tag 4 und 7 nach Blutentnahme analysiert. Das Blut von einem Probanden wird zu sechs unterschiedlichen Zeitpunkten und von zwei Probanden zu drei verschiedenen Zeitpunkten analysiert.

Variabilität der Rezeptorexpression

In Abbildung 18 ist zu erkennen, dass die Variabilität der Antigenexpression unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Die Variabilität ist in Tabelle 9 anhand des Variationskoeffizienten quantifiziert. Man sieht, dass der Variationskoeffizient für CD61 oder CD41a geringer ist als beispielsweise von CD49b. Die MFIs der Probanden, die zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert werden, sind gut miteinander vergleichbar.

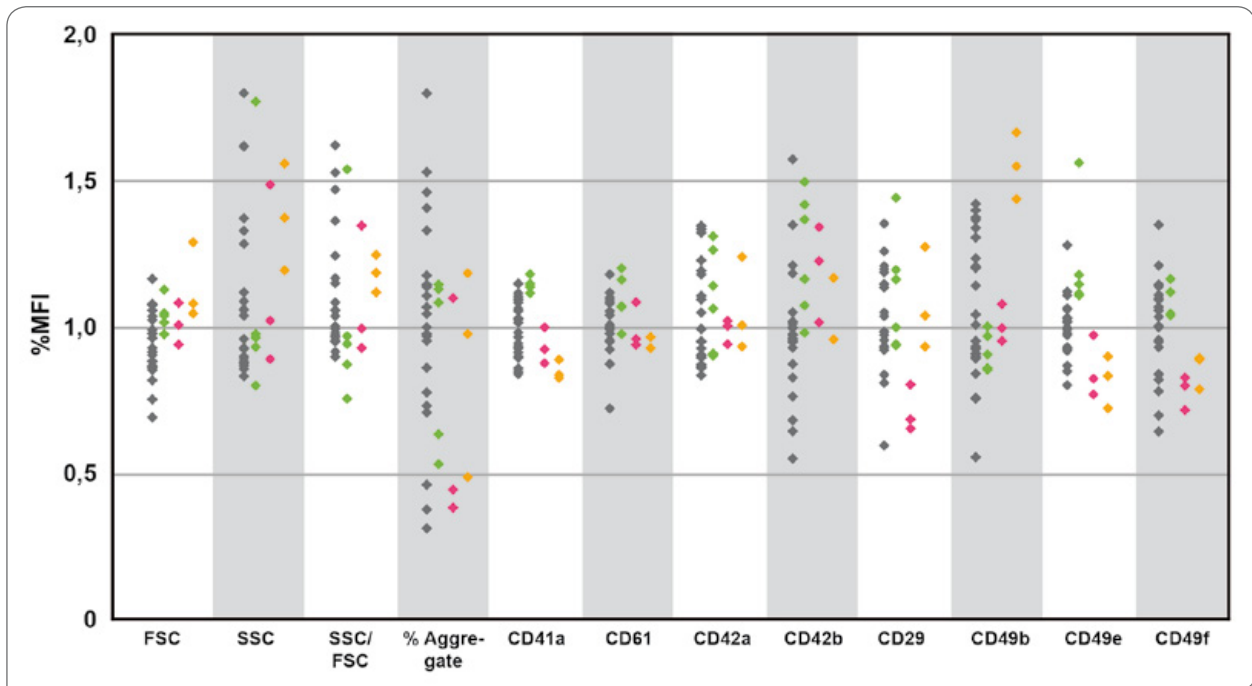


Abb. 18 Relative Rezeptorexpression in der Gesunderpopulation. Insgesamt wurde die Rezeptorexpression von 35 Gesunderpendern (◆) analysiert, davon wurde das Blut von einem Probanden zu 6 verschiedenen Zeitpunkten (◆) und von 2 Probanden zu 3 verschiedenen Zeitpunkten (◆◆) analysiert. Die Werte wurden für den Graph relativ zur 50. Perzentile (=1) der MFI berechnet.

Für die MFIs der einzelnen Antikörper werden vorläufige Normwerte (Tabelle 9), die den Werten der 5. bis 95. Perzentile entsprechen, festgelegt. Anhand dieser Normwerte sollen bei der Analyse von Patientenblut pathologische von physiologischen Messergebnissen abgegrenzt werden.

Variabilität der Thrombozytenreaktivität

Auch die Variabilität der Thrombozytenreaktivität ist abhängig vom Agonisten und dessen Konzentration unterschiedlich ausgeprägt. Die geringste Variabilität ist bei der Reaktion auf einen starken Agonisten in optimaler Konzentration zu verzeichnen (Abb.19). Hierbei können außerdem die von den verschiedenen Agonisten ausgelösten Reaktionswege nachvollzogen werden. So zieht die Stimulation mit TRAP6 maximale MFIs für die Marker der Degranulierung (CD63, CD62P) nach sich, während die Stimulation mit ADP maximale Ergebnisse bei der Aktivierung des Fibrinogenrezeptors (PAC-1) erzeugt.

Die Reaktion auf die Agonisten in suboptimaler Konzentration und auf schwache Agonisten (für TRAP-6 PAC-1, für ADP CD62P und CD63) ist

Tabelle 9 Vorläufige Normwerte und Variationskoeffizienten (VK) der Thrombozytenmorphologie und Rezeptorexpression.

Parameter	Vorläufige Normwerte		n	VK
FSC	1556	- 2365	34	17 %
SSC	553	- 1091	34	26 %
SSC/FSC	0,302	- 0,521	34	19 %
Aggregate	4,65	- 19,36	33	39 %
CD41a	7.809	- 10.700	33	11 %
CD61	5.331	- 7.134	32	10 %
CD42a	7.318	- 11.235	34	15 %
CD42b	4.145	- 8.913	35	22 %
CD29	1.045	- 2.031	33	19 %
CD49b	277	- 539	34	24 %
CD49e	250	- 383	34	16 %
CD49f	1.436	- 2.395	33	17 %

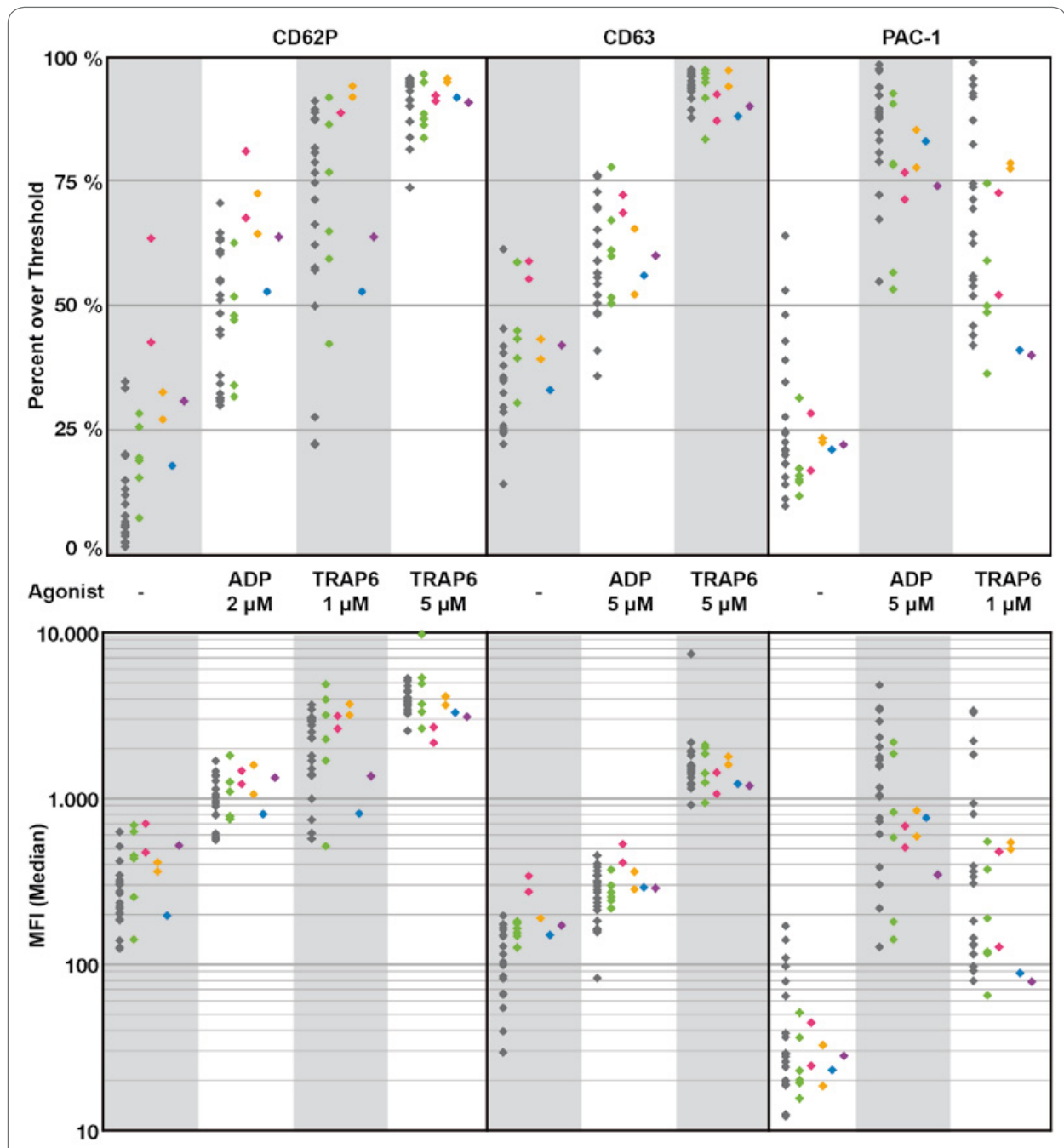


Abb. 19 Thrombozytenfunktion der Gesunderpopulation. Insgesamt wurde die Thrombozytenfunktion von 32 Gesunderpopulation analysiert, davon wurde das Blut von 20 Probanden am Tag der Blutentnahme (◆), von 6 Probanden am Tag 1 (◆), von jeweils 2 Probanden am Tag 2 (◆) und Tag 3 (◆), und von jeweils einem Probanden am Tag 4 (◆) und Tag 7 (◆) nach Blutentnahme analysiert.

wesentlich variabler. Am ausgeprägtesten ist die Variabilität bei der Aktivierung des Fibrinogenrezeptors nach Stimulation mit TRAP6 in suboptimaler Konzentration. Zu beachten ist, dass für die Integrinaktivierung nach suboptimaler Stimulation mit TRAP6 die Ausschüttung von ADP und ATP aus den δ -Granula notwendig ist und dieser Aspekt hier indirekt mitbeurteilt wird.

Die Expression der Aktivierungsmarker auf unstimulierten Zellen ist vor allem im Fall des aktivierten Fibrinogenrezeptors (PAC-1-Bindung) sehr hoch. Außerdem fällt eine relativ hohe Grundexpression von CD63 auf unstimulierten Plättchen auf.

Betrachtet man abschließend noch die Ergebnisse der Probanden, die nicht am Tag der Blutentnahme analysiert wurden, so erkennt man, dass die Rezeptorexpression in den meisten Fällen den Ergebnissen der am ersten Tag analysierten Proben ähnlich ist.

Auch für die Reaktivität wurden vorläufige Normwerte über die Werte der 5.-95. Perzentile definiert (Tabelle 10). Werte, die nicht im Rahmen der Ergebnisse vom Tag 0 lagen und Ausreißer wurden ausgeschlossen. Anhand der MFI kann die Bindung von PAC-1 nach Stimulation mit einer suboptimalen Dosis TRAP6 in 3 Kategorien eingeteilt werden: Low, Middle und High Responder.

Tabelle 10 Normwerte und Variationskoeffizienten für die Analyse der Thrombozytenfunktion.

Anti-körper	Agonist	„Percent over threshold“				MFI				
		Normwerte		n	VK	Response	Normwerte		n	VK
CD62P	-	3 %	- 20 %	23	62 %		132	- 495	30	42 %
CD62P	ADP 2 μ M	32 %	- 72 %	31	27 %		582	- 1628	32	32 %
CD62P	TRAP6 1 μ M	51 %	- 92 %	29	22 %		1121	- 3855	28	38 %
CD62P	TRAP6 5 μ M	84 %	- 96 %	29	4 %		3249	- 5258	25	18 %
CD63	-	22 %	- 42 %	24	24 %		43	- 174	26	39 %
CD63	ADP 5 μ M	45 %	- 76 %	32	17 %		158	- 428	32	33 %
CD63	TRAP6 5 μ M	92 %	- 97 %	25	2 %		1.139	- 2142	29	66 %
PAC-1	-	11 %	- 37 %	28	38 %		14	- 89	30	70 %
PAC-1	ADP 5 μ M	69 %	- 97 %	28	12 %		719	- 3426	20	54 %
PAC-1	TRAP6 1 μ M	52 %	- 95 %	25	21 %	Low	86	- 185	13	27 %
						Middle	320	- 689	6	42 %
						High	1155	- 3351	9	32 %

3.2. Zusätzliche Module

3.2.1. Mepacrin-Assay

Da der Aktivierungsmarker CD63 nur bedingt in der Lage ist, einen Defekt der δ -Granula aufzudecken, wurde zusätzlich zum Basismodul die Messung des „Mepacrin-Uptake“ etabliert. Durch Bindung des fluoreszenten Farbstoffes Mepacrin an Purinnukleotide, welche in den δ -Granula gespeichert sind, kann die Degranulierung der δ -Granula mittels Durchflusszytometrie gemessen werden. 1999 etablierten Ramström et al.⁴⁶ diese Methode bereits an 22 gesunden Probanden; dieses Vorgehen diene als Grundlage für den Assay und wurde modifiziert. Während Ramström et al. eine Färbung der Zellen nach erfolgter Stimulation vorsehen, postulierten Wall et al. die Färbung vor der Agonistenstimulation vorzunehmen.⁴⁷ Um eine maximale Degranulierung herbei zu führen, wurde der starke Agonist TRAP6 in optimaler Konzentration für die Stimulation gewählt. In Vormessungen konnten mit beiden Methoden vergleichbare Ergebnisse erzielt werden. Allerdings bringt die Färbung vor Stimulation einen entscheidenden Vorteil mit sich: durch Zugabe des Agonisten während der Messung ist es möglich, eine Kinetik-Kurve, welche den MFI für Mepacrin über die Zeit beschreibt, für die Degranulierung zu erstellen (Abb. 20B). Das heißt die Degranulierung der δ -Granula kann in Echtzeit am Durchflusszytometer verfolgt werden.

Zur Auswertung werden die Thrombozyten in das gleiche Analysefenster wie für die Analyse der Rezeptorexpression gesetzt (siehe Kapitel 3.1.2.). Die Quantifizierung der Analyse erfolgt durch Dokumentation des „Percent over Threshold“ (Abb. 20A) und die MFI für Mepacrin vor und nach Degranulierung sowie der Differenz der jeweiligen Werte (Bsp. MFI vor Stimulation - MFI nach Stimulation). Der MFI vor Degranulierung steht für das Vorhandensein von Purinnukleotiden. Sind die Granula leer oder nicht vorhanden, ist dieser Wert erniedrigt, so können Erkrankungen wie Storage-Pool-Defekte diagnostiziert werden. Die Differenz steht für die Fähigkeit der Thrombozyten, die Granula auszuschütten. Die Mepacrin-Messung wurde bei insgesamt 12 Gesundspendern durchgeführt und ergab für die Differenz des MFI im Mittel einen Wert von 159 ± 54 und

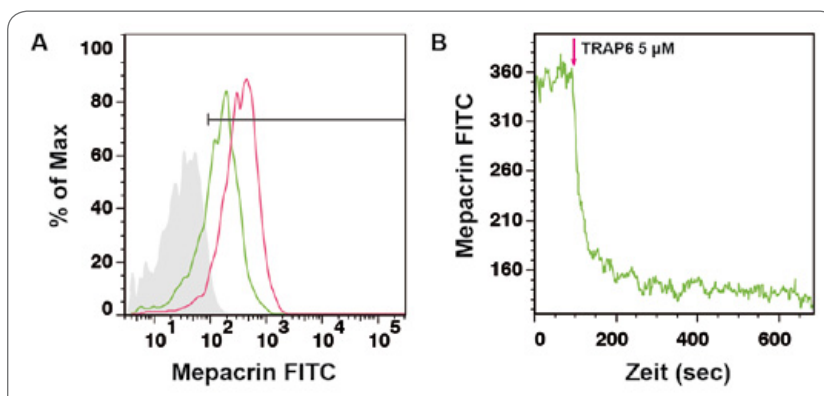


Abb. 20 Auswertung des Mepacrin-Assays. **A** Setzen des Thresholds anhand der 95. Perzentile der FMO-Kontrolle (-) und Mepacrin-Signal vor (-) und nach (-) Zugabe des Agonisten. **B** Kinetik-Kurve: nach 50 s wurde der Probe 5 μ M TRAP6 hinzugefügt und dadurch die Degranulierung ausgelöst. Zur Auswertung wird der MFI der ersten und der letzten 50 s der Messung herangezogen.

für die Differenz des „Percent over Threshold“ 23 ± 5 unter Stimulation mit TRAP6 $5 \mu\text{M}$. Insgesamt wird für den Mepacrin-Assay ein Volumen von nur $3 \mu\text{l}$ Citratblut benötigt und der Test ist parallel zum Basismodul durchführbar (der Zeitaufwand verlängert sich dann etwa um 30 min auf 1,5 h).

3.2.2. Messung der intrazellulären Calciummobilisation

Die Messung der intrazellulären Calciummobilisation im Vollblut wird zur Zeit von fast keinem Labor im Rahmen der Routinethrombozytendiagnostik eingesetzt.⁴² Aber durch diese Methode kann die Reaktivität der Thrombozyten, speziell die frühen Signalwege, die für die Calciummobilisierung notwendig sind, sehr gut unter physiologischen Bedingungen beurteilt werden. So könnten z.B. Defekte des Thrombinrezeptors aufgedeckt werden. Grundlage des Assays ist die Fähigkeit des Farbstoffs Fluo-3 mit Calcium eine Chelatbindung einzugehen, unter welcher der Farbstoff eine höhere Fluoreszenz entwickelt. Auch hier wird der Fluo-3 gefärbten Probe erst während der Messung ein Agonist hinzugegeben und der Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in einer Kinetikkurve sichtbar gemacht. „Gating“ und Quantifizierung der Messung erfolgte genau wie beim Mepacrin-Assay. Grundlage des Experiments bildete das Protokoll von Monteiro et al. aus dem Jahr 2003.⁴⁸

Auch für die Messung des Calciumfluxes sind nur wenige Mikroliter Citratblut notwendig, allerdings ist der Zeitaufwand für diese Methode etwas höher. Da Puffer frisch angesetzt werden müssen und mehrere Inkubationsschritte notwendig sind, muss für die Durchführung ein Zeitaufwand von mindestens 2 h kalkuliert werden.

3.3. Analyse von Patienten mit Thrombozytopathie

3.3.1. Leukozyten-Adhäsions-Defizienz Typ III (LAD-III)

Um die Funktionalität des Basismoduls zu untersuchen, wurde Blut von 17 jährigen weiblichen eineiigen Zwillingen mit bekannter LAD-III analysiert. Durch einen Defekt des Kindlin-3 Proteins fehlt die Aktivierung des Fibrinogenrezeptors vollständig.^{17,18} Dieser Defekt sollte bei guter Funktion des Basismoduls durch eine fehlende Bindung von PAC-1 an den aktivierten Fibrinogenrezeptor nachweisbar sein. Patient A hatte 3 Tage, Patient B 5 Tage vor der Analyse ein Thrombozytenkonzentrat erhalten. Zur Analyse wiesen sie Thrombozytenzahlen von 190/nL und 81/nL auf.

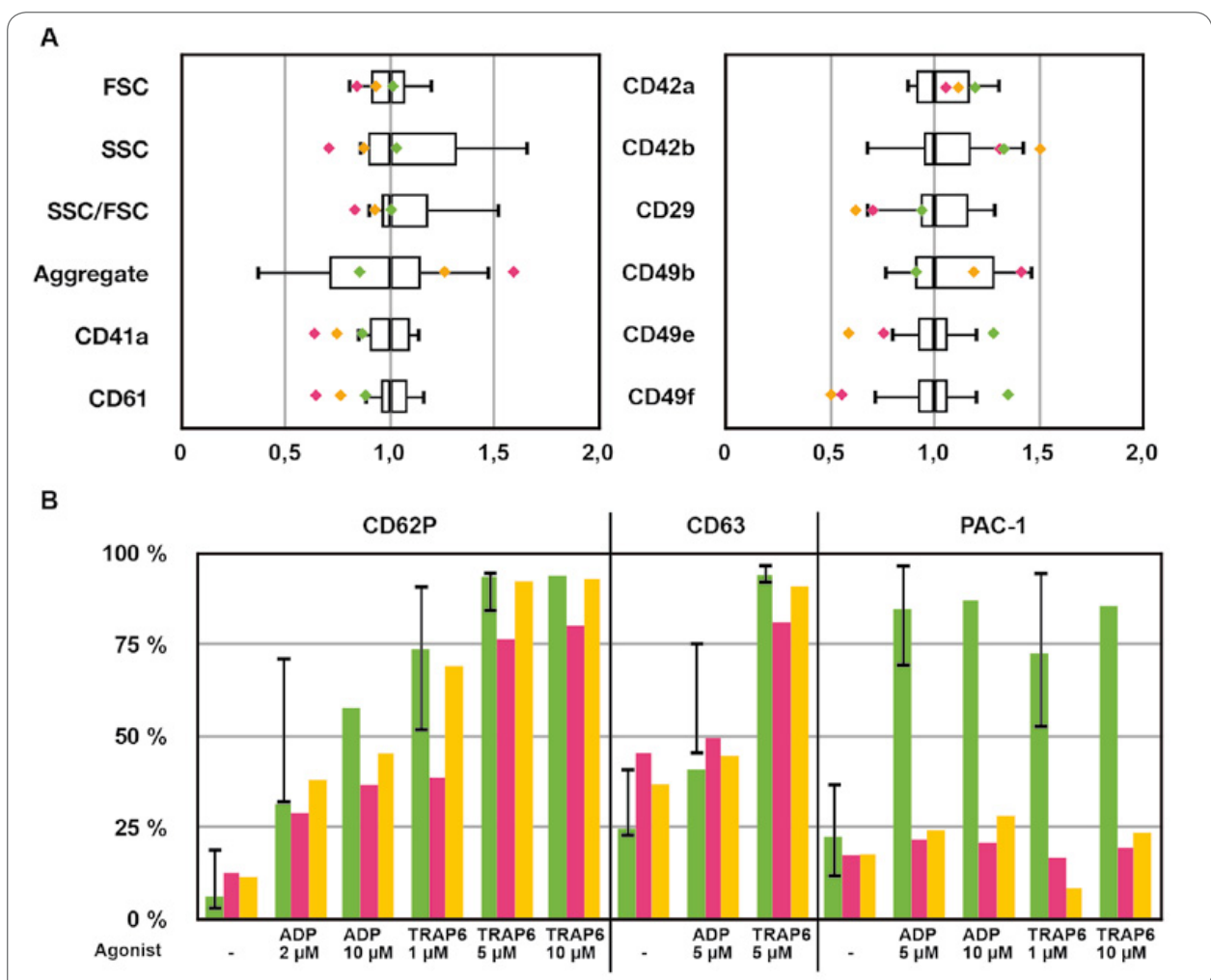


Abb. 21 Rezeptorexpression und Thrombozytenfunktion von LAD-III-Patienten. **A** Insgesamt wurde die Rezeptorexpression von n=2 LAD-III-Patienten untersucht (◆ Kontrolle, ◆ Patient B, ◆ Patient A) und die MFIs mit der Gesunderpopulation verglichen (Whisker: 5.-95. Perzentile, Balken: Median). Die Thrombozyten zeigen eine verminderte Expression des Fibrinogen- (CD41a, CD61), sowie des Fibronektin- (CD29, CD49e) und Lamininrezeptors (CD29, CD49f). **B** Insgesamt wurde die Thrombozytenfunktion von n=2 LAD-III-Patienten untersucht (◆ Kontrolle, ◆ Patient B, ◆ Patient A) und der „Percent over Threshold“ mit der Gesunderpopulation verglichen (Whisker: 5.-95. Perzentile). Die Thrombozyten zeigen keinen Anstieg des Aktivierungsmarkers PAC-1, auch nicht auf „High Dose“ Stimulation.

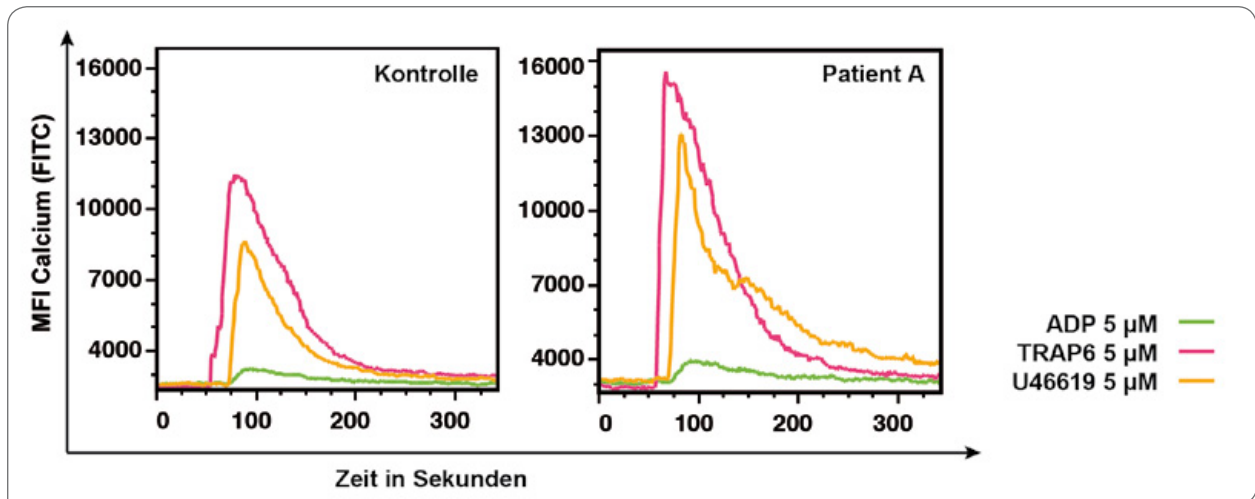


Abb. 22 Calciummobilisation in Thrombozyten von Patienten mit LAD-III. Kinetik-Kurve: nach 50 sec wurden den Proben verschiedene Agonisten zugegeben, um den frühen Signalweg der Calciummobilisierung zu analysieren. Der Calciumflux war bei beiden Patienten unauffällig.

Die Thrombozytenpopulation beider Patienten sind weitgehend unauffällig, bis auf einen gering verminderten Wert des Seitwärtsscatters gegenüber der Kontrollpopulation bei Patient B (Abb. 21A). Bei der Analyse der Rezeptoren fällt bei beiden eine verminderte Expression des Fibrinogenrezeptors (CD41a, CD61) sowie des Fibronectin- und Lamininrezeptors (CD29, CD49e, CD49f) auf. Die Expression des vWF- und des Kollagenrezeptors ist unauffällig.

Wie zu erwarten, kommt es bei beiden Patienten nach Stimulation mit ADP oder TRAP6 nicht zur Bindung von PAC-1 an den aktivierten Fibrinogenrezeptor (Abb. 21B). Dieses Ergebnis wurde zusätzlich durch eine Stimulation mit einer sehr hohen Dosis ADP 10 µM und TRAP6 10 µM, sowie mit dem Thromboxan-Analogen U46619 bestätigt (Daten nicht dargestellt). Bei Patient B ist außerdem die Degranulierung aller Granula grenzwertig vermindert, was der Verminderung des Seitwärtsstreulichts entspricht und wahrscheinlich durch einen höheren Anteil an Eigenthrombozyten erklärbar ist. Patient A zeigt keine Auffälligkeiten bei der Degranulierung der α -Granula (CD62P) und der lysosomalen, sowie δ -Granula (CD63). Der Mepacrin-Assay war zum Zeitpunkt der Messung noch nicht verfügbar und wurde somit nicht durchgeführt.

Einen Defekt im frühen Signalweg der Thrombozytenaktivierung wurde durch die zusätzliche Messung des Calciumflux ausgeschlossen. Es kann bei beiden Patienten keine Verminderung der Calciummobilisierung nach Stimulation mit TRAP6, ADP oder U46619 nachgewiesen werden (Abb. 22).

Die Analyse der Blutproben mit dem Basismodul ergab die zu erwartenden Ergebnisse. Der prinzipielle Nachweis der Funktionalität des Moduls „Proof-of-principle“ wurde somit geführt. Die Thrombozytenzahl stellt bei der Analyse mit dem Basismodul kein Problem

dar. Die Kinetikkurve des Calciumfluxes zeigt bei den Patienten größere Schwankungen als beim Gesundspender, ist aber auswertbar.

3.3.2. Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS) nach Stammzelltransplantation

Das Wiskott-Aldrich-Syndrom beruht auf einem Defekt des WAS-Protein-Gens auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms. Als Schlüsselregulator der Aktin-Polymerisation in hämatopoetischen Stammzellen führt ein Fehlen des WAS-Proteins u.a. zu einer verminderten Thrombozytopenese. Betroffene werden durch eine mikrozytären Thrombozytopenie, sowie durch Ekzeme, wiederkehrende Infektionen und maligne Erkrankungen auffällig. Neben der Splenektomie ist bei Patienten mit schweren kombinierten Immundefekten allein die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT) Therapie der Wahl.⁴⁹

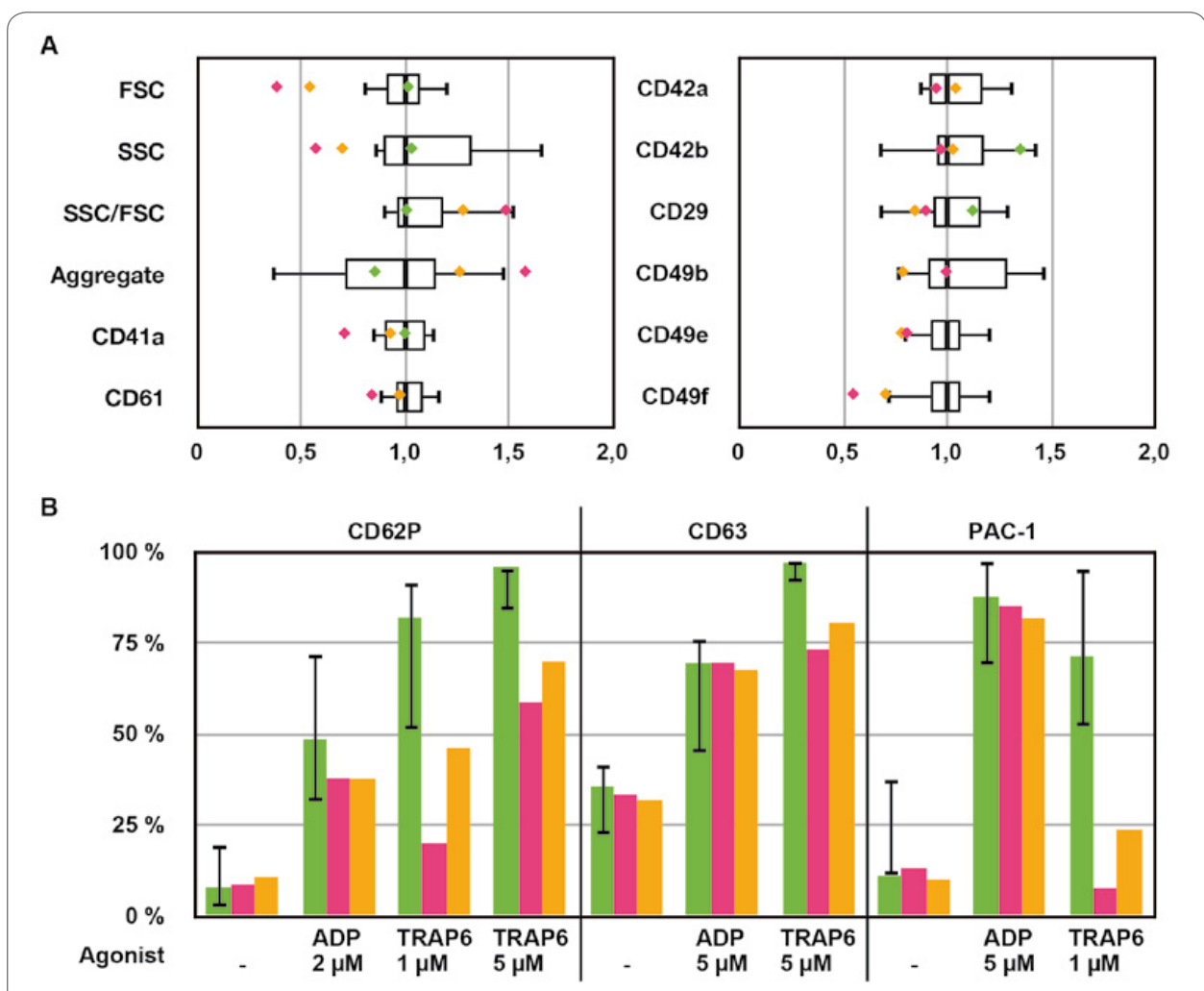


Abb. 23 Rezeptorexpression und Thrombozytenfunktion bei tWAS-Patienten. **A** Insgesamt wurde die Rezeptorexpression von n=2 WAS-Patienten nach HSCT untersucht (◆ Kontrolle, ◆ Patient A, ◆ Patient B) und die MFIs mit der Gesundspenderpopulation verglichen (Whisker: 5.-95. Perzentile, Balken: Median). Die Thrombozyten sind klein (verminderter FSC) und zeigen eine verminderte Expression des Fibronektin- (CD49e) und Lamininrezeptors (CD49f). **B** Insgesamt wurde die Thrombozytenfunktion von n=2 tWAS-Patienten untersucht (◆ Kontrolle, ◆ Patient A, ◆ Patient B) und der „Percent over Threshold“ mit der Gesundspenderpopulation verglichen (Whisker: 5.-95. Perzentile). Die Thrombozyten zeigen eine Hyporeaktivität v.a. bei Stimulation mit TRAP6.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Blut von zwei nicht verwandten, vierjährigen Jungen mit bekanntem WAS analysiert. Beide Kinder erhielten bereits im ersten Lebensjahr eine HSCT. Während sich die Zahl der Leukozyten und Lymphozyten bei beiden Patienten nach Transplantation verbesserte, besteht auch noch 3 Jahre nach HSCT eine deutliche Mikrothrombozytopenie. Grund hierfür ist, dass der so genannte Chimärismus, also der Spenderanteil je nach Zelllinie zwischen 10 und 90 % liegen kann. Bei den hier untersuchten Kindern liegt der Spenderanteil der Thrombozyten bei nur ca. 20 %. Die Mikrothrombozytopenie sollte sich im Basismodul durch einen verminderten Vorwärts- und Seitwärtsscatter bemerkbar machen.

Die Thrombozytenpopulation beider Patienten fällt tatsächlich durch ein deutlich vermindertes Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht im Sinne der Mikrothrombozytopenie auf (Abb. 23A). Die Expression des vWF- und Kollagenrezeptors, sowie der β_1 -Untereinheit ist unauffällig oder nur gering vermindert. Die Expression des Fibrinogenrezeptors ist bei Patient A, die des Fibrinonektin- und Lamininrezeptors bei beiden vermindert. Bei den Reaktivitätstests wird eine Hyporeaktivität der Thrombozyten v.a. nach Stimulation mit TRAP6 deutlich (Abb. 23B). Die Reaktivität auf ADP ist dagegen normal.

Um eine Aussage über den Spenderanteil der Thrombozyten der beiden Patienten machen zu können, wurde zusätzlich eine CD36 (GPIV) Cofärbung durchgeführt. Es ist bekannt, dass CD36 auf Thrombozyten von WAS-Patienten vermindert exprimiert wird.⁵⁰ Der Chimärismus von Monozyten oder Lymphozyten kann durch die Menge an WASp durch zytoplasmatische Bindung eines Fluorophor-markierten Antikörpers bestimmt werden.⁵¹ Diese Methode konnte bisher nicht auf Thrombozyten übertragen werden. Leider grenzten sich durch die CD36-Cofärbung die Thrombozyten des Patienten nicht von denen des Knochenmarkspenders ab (Daten nicht dargestellt).

3.3.3. Akute Myeloische Leukämie (AML) mit Transplantationsindikation

Für Patienten mit AML sind in der Literatur verschiedene Thrombozytenfunktionsdefekte im Sinne einer Hyporeaktivität beschrieben. Diese sollten im Basismodul bei einer guten Funktionalitätssensitivität nachweisbar sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Blut von 15 erwachsenen Patienten mit AML untersucht. Diese Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Analyse unter Induktionstherapie, welche in der Regel eine Medikation mit Cytosin-Arabinosid (ARA-C) und Anthrazyklinen umfasst, und sind der Gruppe der Hochrisiko-Patienten zugeordnet.

Bei der Charakterisierung der Thrombozytenpopulation mittels Vorwärts- und Seitwärtsscatter fallen große Schwankungen auf, obwohl die meisten Thrombozyten dieser Patienten tendenziell kleiner erscheinen (Abb. 24A). Die Expression des Fibrinogenrezeptors ist im Vergleich zur Gesundspenderpopulation signifikant vermindert. Auch der Laminin- und Fibronektinrezeptor ist nur in einer reduzierten

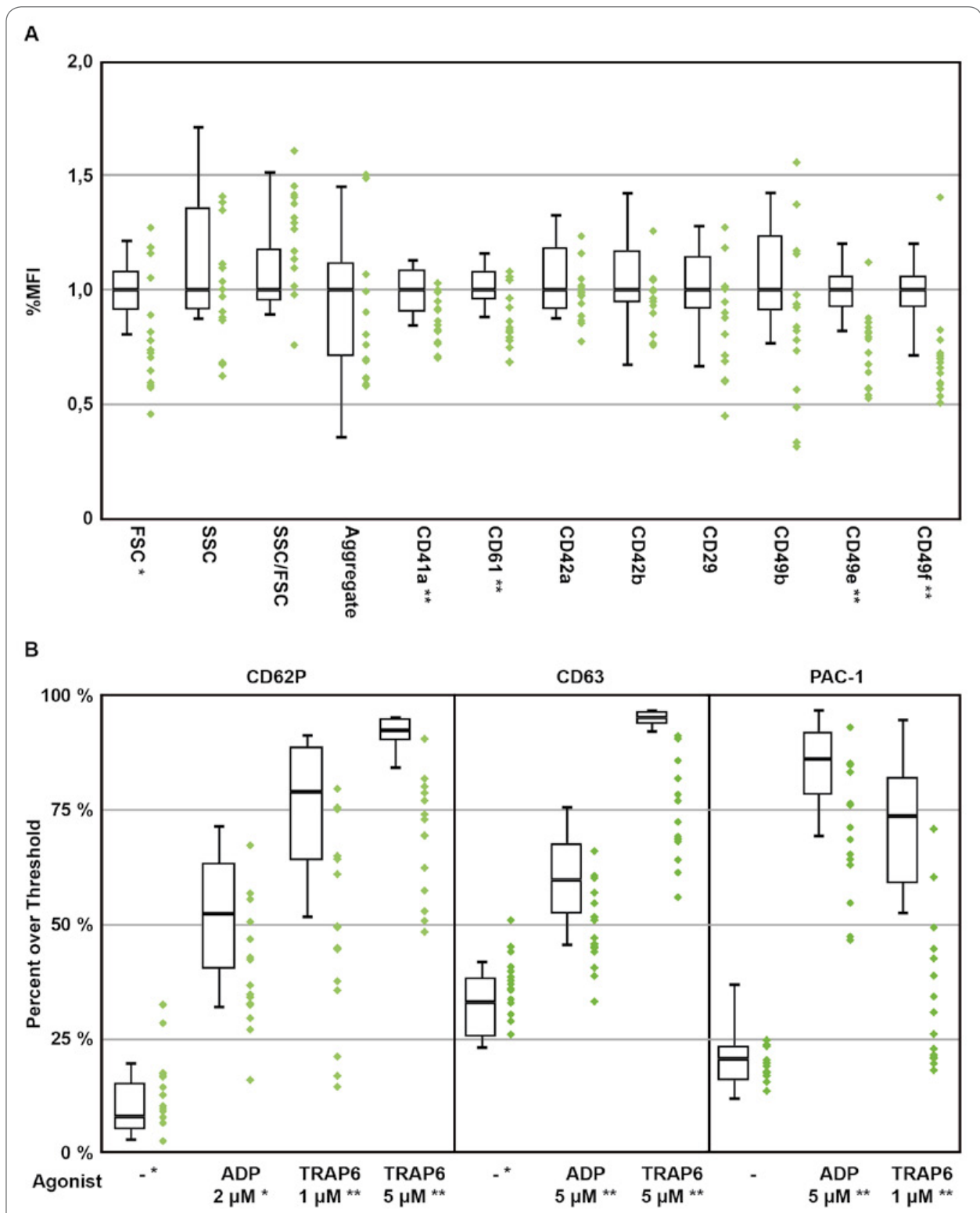


Abb. 24 Rezeptorexpression und Thrombozytenfunktion bei AML-Patienten. A Insgesamt wurde die Rezeptorexpression von n=15 AML-Patienten untersucht (◆) und die MFIs mit der Gesunderpopulation verglichen (Box: 25.-75. Perzentile, Whisker: 5.-95. Perzentile, Balken: Median). Die Thrombozyten zeigen vor allem eine verminderte Expression des Fibrinogen- (CD41a, CD61), sowie des Fibronektin- (CD49e) und Lamininrezeptors (CD49f). **B** Insgesamt wurde die Thrombozytenfunktion von n=15 AML-Patienten untersucht (◆) und der „Percent over Threshold“ mit der Gesunderpopulation verglichen (Box: 25.-75. Perzentile, Whisker: 5.-95. Perzentile, Balken: Median). Die Thrombozyten zeigen eine Hyporeaktivität in Hinblick auf alle Agonisten und Aktivierungsmarker. * p < 0,05, ** p < 0,01

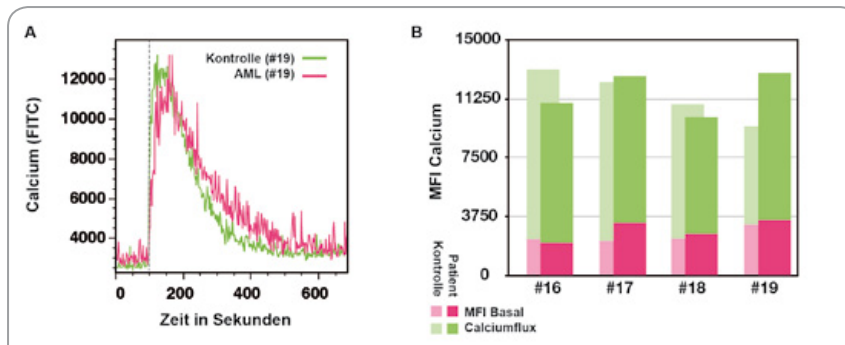


Abb. 25 Calciummobilisation in Thrombozyten von AML-Patienten. **A** Kinetik-Kurve: nach 50 sec wurde den Proben 5 μ M TRAP6 (gestrichelte Linie) zugegeben, um den frühen Signalweg der Calciummobilisation zu analysieren. **B** Der Calciumflux war in allen untersuchten Patienten im Vergleich zur Kontrolle unauffällig.

Anzahl zu finden. Bei einigen Patienten fällt außerdem eine verminderte Expression des Kollagenrezeptors auf. Die Expression des vWF-Rezeptors ist bei allen Patienten ungestört.

Die Thrombozyten der AML-Patienten sind im Vergleich zur Gesunderpopulation hyporeaktiv, denn weder auf die Stimulation mit ADP noch auf die Stimulation mit TRAP6 erfolgt eine adäquate Expression der Aktivierungsmarker CD63, CD62P und PAC-1 (Abb. 24B). Besonders fällt auf, dass bei einigen Patienten fast keine Aktivierung des Fibrinogenrezeptors nach Stimulation mit suboptimalen Dosen TRAP6 nachweisbar ist. Dieser Fakt spricht wahrscheinlich für eine verminderte Ausschüttung von ADP und ATP aus den δ -Granula, welche für eine effektive Integrinrezeptor-Aktivierung notwendig ist.

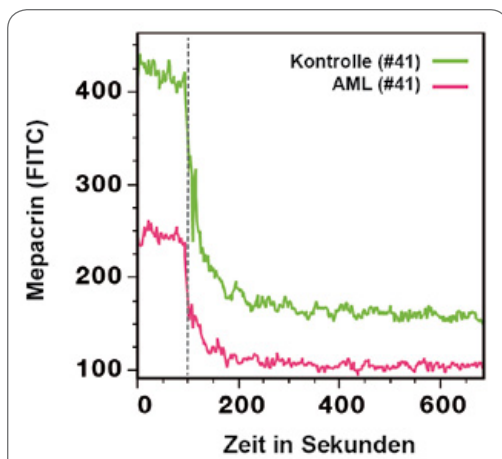


Abb. 26 Mepacrin-Release der Thrombozyten von AML-Patienten. Die Thrombozyten von n=3 Patienten wurden mit Mepacrin inkubiert und nach 100 s Messung mit 5 μ M TRAP6 stimuliert (gestrichelte Linie). Wie hier beispielhaft abgebildet, ist die Anfärbarkeit der Thrombozyten von AML-Patienten mit Mepacrin vermindert, die Abnahme des Signals nach Stimulation im Sinne der Degranulierung aber vorhanden.

Aufgrund der beobachteten Hyporeaktivität sollten Störungen der frühen Signalwege zusätzlich bei 4 Probanden mittels Messung der Calciummobilisierung nach optimaler TRAP6-Stimulation ausgeschlossen werden. Wie in Abbildung 25 dargestellt, steigt bei allen Patienten die intrazelluläre Calciumkonzentration nach Stimulation adäquat an, womit ein Defekt der frühen Signaltransduktion ausgeschlossen ist.

Bei 3 Patienten wurde zusätzlich ein Mepacrin-Assay durchgeführt, um den Hinweis auf eine ineffektive δ -Degranulierung genauer zu untersuchen. Hier zeigt sich eine verminderte Anfärbarkeit der Thrombozyten mit Fluo-3, was für eine verminderte Verfügbarkeit von Pruinnukleotiden in den δ -Granula sprechen kann. Die Degranulierung an sich zeigt sich ungestört (Abb. 26).

3.4. Analyse von Patienten mit vermuteter Thrombozytenfunktionsstörung

3.4.1. Thrombozytopenie mit Radius-Aplasie-Syndrom (TAR)

Das TAR-Syndrom ist mit 1-2 Fällen/1.000.000 Geburten eine seltenes angeborenes Syndrom, das mit einer Thrombozytopenie einhergeht. Betroffene weisen eine Mikrodeletion auf Chromosom 1 im Bereich q21.1 auf, welche aber nicht allein für das Syndrom verantwortlich sein kann, da auch gesunde Träger mit dieser Deletion bekannt sind.⁵² Die Thrombozytopenie ist im Säuglings- und Kindesalter am ausgeprägtesten und normalisiert sich im Schulkindalter mit Thrombozytenzahlen im unteren Normbereich.²² Im Rahmen von chirurgischen Interventionen kommt es immer wieder zu Blutungskomplikationen, welche sich nicht nur auf die reduzierte Thrombozytenzahl zurückführen lassen, sondern einen zusätzlichen Funktionsdefekt der Thrombozyten vermuten lassen. Bisherige Studien in unserem Labor ergaben einen Defekt im JAK-STAT-Signalweg, der sich durch eine fehlende Jak-2 Phosphorylierung nach TPO-Stimulation auszeichnet. Dieser Defekt konnte jedoch nicht bei allen untersuchten Patienten nachgewiesen werden.²² Um die Blutungsneigung besser zu charakterisieren und eine eventuelle zusätzliche Funktionsstörung aufzudecken, wurden Blutproben von sieben Patienten mit TAR-Syndrom untersucht. Die Analyse der Blutproben von 6 Patienten erfolgte am Tag der Blutentnahme und von einem Patienten am Tag 2 nach Blutentnahme.

Die Thrombozyten der TAR-Patienten fallen durch deutlich verminderte Werte im Vorwärts- und Seitwärtsscatter auf, dies spricht für kleine, wenig granulierte Plättchen (Abb. 27A). Bei der Analyse der Rezeptorexpression fällt eine signifikant verminderte Expression des GPIIb/IIIa-Rezeptors (GPIX), sowie eine verminderte Expression der α - und β -Untereinheit des Fibronektin- und Lamininrezeptors auf. Die Verminderung dieser Glykoproteine ist unabhängig von der Thrombozytenzahl und tritt sowohl bei den noch stark thrombozytopenen als auch bei den Patienten mit schon normalen Thrombozytenzahlen auf (Daten nicht dargestellt).

Außerdem lässt sich bei Thrombozyten der Patienten im unstimulierten Zustand eine normale Expression von CD62P und Bindung von PAC-1 an den aktivierten Fibrinogenrezeptor beobachten (Abb. 27B). Die Expression von CD63 hingegen ist im nichtaktivierten Zustand deutlich erhöht. Die Reaktivität ist nach Stimulation mit ADP unauffällig, die Stimulation mit TRAP6 führt nur zu einer unzureichenden Erhöhung der CD63-Expression. Auch die Bindung von PAC-1 ist nach TRAP6 Stimulation gering vermindert.

Der Mepacrin-Assay war zum Zeitpunkt der Messung noch nicht verfügbar und wurde nicht durchgeführt. Der Messung des Calciumflux konnte aus logistischen Gründen nicht durchgeführt werden.

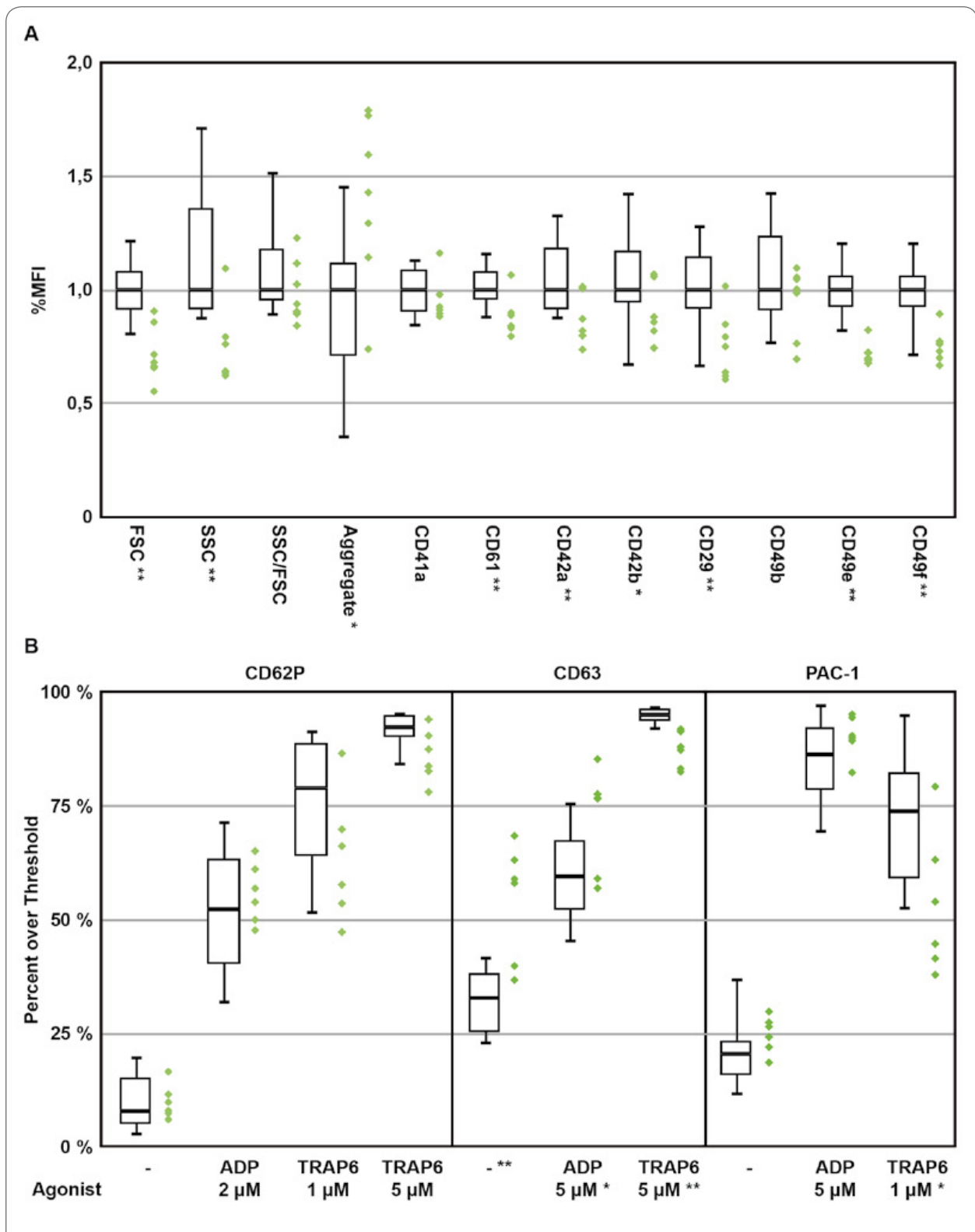


Abb. 27 Rezeptorexpression und Thrombozytenfunktion bei TAR-Patienten. **A** Insgesamt wurde die Rezeptorexpression von n=7 TAR-Patienten untersucht (◆) und die MFIs mit der Gesundspenderpopulation verglichen (Box: 25.-75. Perzentile, Whisker: 5.-95. Perzentile, Balken: Median). Die Thrombozyten sind klein (verminderte FSC) und fallen vor allem mit einem verminderten Fibronektin- (CD49e) und Lamininrezeptor (CD49f) auf. **B** Insgesamt wurde die Thrombozytenfunktion von n=6 TAR-Patienten untersucht (◆) und der „Percent over Threshold“ mit der Gesundspenderpopulation verglichen (Box: 25.-75. Perzentile, Whisker: 5.-95. Perzentile, Balken: Median). Besonders auffällig ist die erhöhte Grundexpression von CD63 und im Gegensatz dazu die verminderte CD63-Expression nach Stimulation mit optimalen TRAP6 Konzentrationen. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

Anhand des Basismoduls konnten also, neben verschiedenen Auffälligkeiten der Rezeptorexpression, auch ein pathologisches Muster in der CD63-Expression nachgewiesen werden.

3.4.2. Sichelzellanämie (SCA)

Die autosomal-kodominant vererbte Sichelzellanämie (SCA) beruht auf einer Punktmutation, welche zur Bildung des abnormen Sichelzellhämoglobin führt. Die SCA geht in der Regel nicht mit einer veränderten Thrombozytenzahl einher, Patienten neigen aber zu Thrombosen. Im klinischen Alltag wird als Grund dafür u.a. eine Hyperreaktivität der Thrombozyten angenommen. Diese müsste sich als gesteigerte Reaktion auf Stimulation mit Agonisten in suboptimalen Konzentrationen bemerkbar machen oder mit einer erhöhten Grundexpression der Aktivierungsmarker im Sinne einer Voraktivierung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Blut von fünf Patienten mit SCA im Alter von 5-17 Jahren mittels Basismodul und Mepacrin-Assay analysiert. Die Thrombozyten weisen ein deutlich vermindertes Signal sowohl im Vorwärts- als auch im Seitwärtsscatter auf (Abb. 29A). Ein erhöhter Anteil an Aggregaten kann nicht nachgewiesen werden. Die Expression des Kollagen- und Fibronektinrezeptors ist signifikant vermindert, die Anzahl aller anderen Rezeptoren ist, bis auf ein gering vermindertes CD41a, normal.

Die Expression der Aktivierungsmarker von unstimulierten Plättchen ist nur bei CD62P geringfügig erhöht. Die Reaktion auf eine Stimulation mit den verschiedenen Agonisten ist nicht überschießend sondern eher etwas vermindert (Abb. 29B). Im Mepacrin-Assay fällt eine verminderte Anfärbbarkeit der Thrombozyten mit Mepacrin auf, die Degranulierung verläuft aber immer ungestört. Die verminderte Anfärbbarkeit ist vermutlich mit den sehr kleinen Thrombozyten zu erklären, welche weniger Granula enthalten.

3.4.3. Chronische Immuntrombozytopenie (cITP)

Die Immuntrombozytopenie ist die häufigste Thrombozytopenie und ist auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen verschiedene Glykoproteine der Thrombozytenmembran zurückzuführen. Da im klinischen Umfeld immer wieder die Frage nach der Funktion der Blutplättchen von ITP Patienten im Sinne einer Hyperreaktivität im Raum steht, wurde im Rahmen dieser Arbeit Blut von drei Patienten mit chronischer ITP im Alter von 15-17 Jahren und Thrombozytenzahlen zwischen 34-75/nL mit dem Basismodul und dem Mepacrin-Assay analysiert.

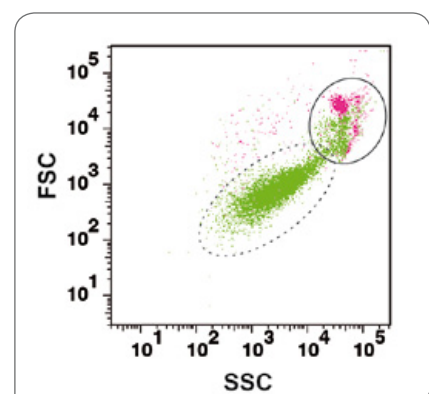


Abb. 28 Leukozyten-Plättchen-Aggregate bei cITP. Cofärbung der Thrombozyten eines Patienten mit ITP mit CD41a und CD45. grün: CD41a+/CD45-; rot: CD41a+/CD45+, durchgezogener Kreis: Aggregate, gestrichelter Kreis: einzelne Thrombozyten.

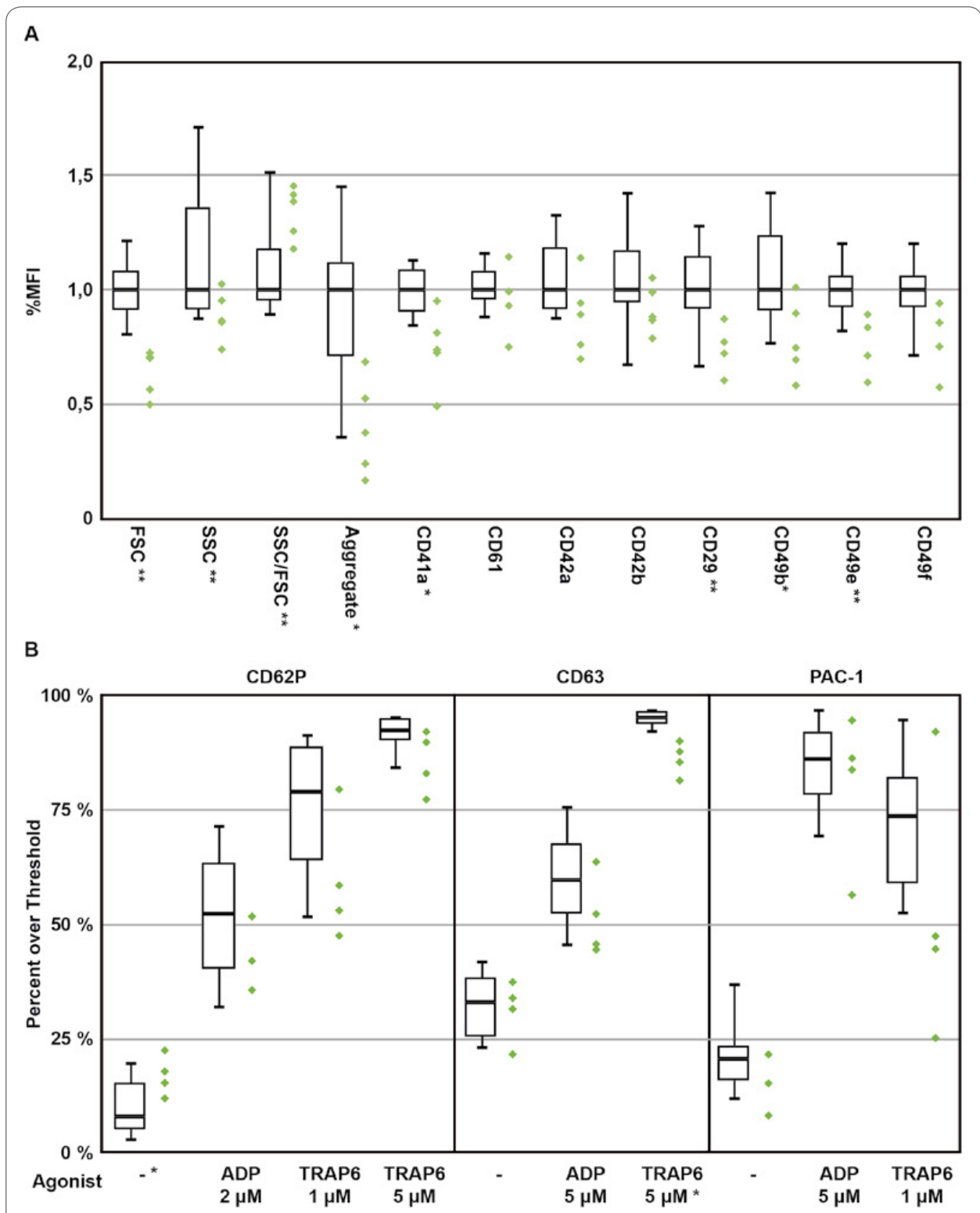


Abb. 29 Rezeptorexpression und Thrombozytenfunktion bei SCA-Patienten. **A** Insgesamt wurde die Rezeptorexpression von n=5 SCA-Patienten untersucht (♦) und die MFIs mit der Gesunderpopulation verglichen (Box: 25.-75. Perzentile, Whisker: 5.-95. Perzentile, Balken: Median). Die Thrombozyten sind sehr klein (verminderter FSC) und fallen mit einem verminderten Kollagen- (CD29, CD49b) und Fibronectinrezeptor (CD29, CD49e) auf. **B** Insgesamt wurde die Thrombozytenfunktion von n=4 SCA-Patienten untersucht (♦) und der „Percent over Threshold“ mit der Gesunderpopulation verglichen (Box: 25.-75. Perzentile, Whisker: 5.-95. Perzentile, Balken: Median). Die Thrombozytenfunktion ist weitgehend unauffällig, neigt aber zur Hyporeaktivität.

Die Thrombozyten der Patienten sind im Vorwärtsscatter groß, während der Seitwärtsscatter gegenüber der Gesundspenderpopulation nicht verändert ist. In der Gesamtpopulation fällt ein relativ hoher Anteil an Aggregaten auf, welcher sich hauptsächlich aus Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten zusammensetzt. In Abbildung 28 wird diese Beobachtung durch eine Cofärbung mit dem Pan-Leukozyten-Marker CD45 deutlich. Die Expression der Rezeptoren ist weitgehend unauffällig bis auf eine gering verminderte Anzahl des Fibronektinrezeptors (Abb. 30A). Die Reaktion auf die Stimulation mit den verschiedenen Agonisten ist von Fall zu Fall unterschiedlich, tendiert aber eher zur Hyporeaktivität (Abb. 30B). Auch der Mepacrin-Assay ergibt keine auffälligen Befunde.

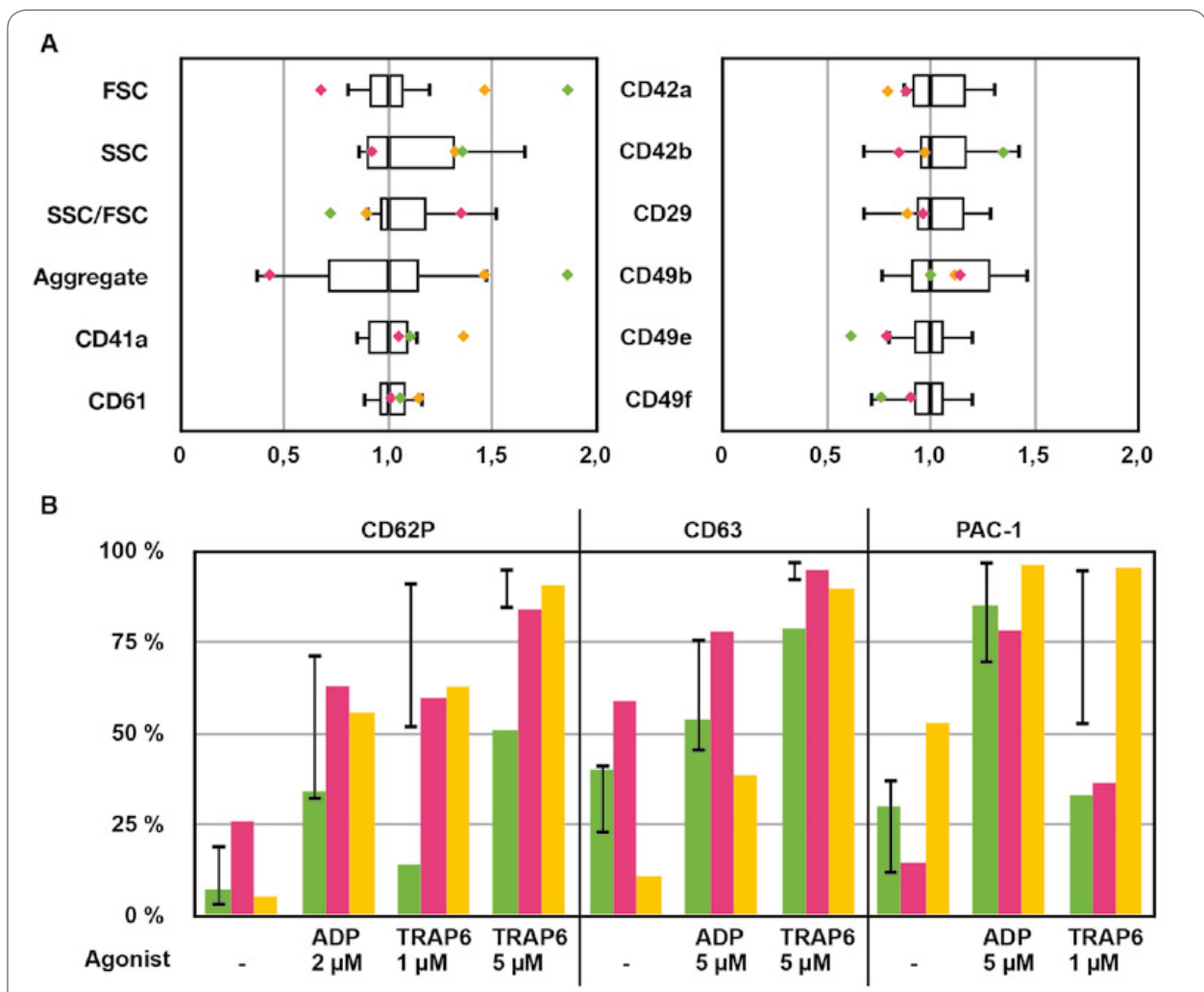


Abb. 30 Rezeptorexpression und Thrombozytenfunktion bei ITP-Patienten. **A** Insgesamt wurde die Rezeptorexpression von n=3 ITP-Patienten untersucht (◆ Patient A, ◆ Patient B, ◆ Patient C) und die MFIs mit der Gesundspenderpopulation verglichen (Whisker: 5.-95. Perzentile, Balken: Median). Die Thrombozyten sind in zwei Fällen sehr groß (erhöhter FSC) und zeigen eine verminderte Expression des Fibronektinrezeptors (CD49e). **B** Insgesamt wurde die Thrombozytenfunktion von n=3 ITP-Patienten untersucht (◆ Patient A, ◆ Patient B, ◆ Patient C) und der „Percent over Threshold“ mit der Gesundspenderpopulation verglichen (Whisker: 5.-95. Perzentile). Die Thrombozyten zeigen unterschiedliche Reaktivitätsmuster.

3.5. Zusammenfassung aller Ergebnisse des Basismoduls

Im Folgenden sind noch einmal alle Ergebnisse der Messungen des Basismoduls dargestellt (Tabelle 11). Zusammenfassend ist festzustellen, dass nicht nur die Störung spezieller Rezeptorfunktionen, beispielsweise des Fibrinogenrezeptors bei der LAD-III in dem neuen Basismodul der 4-Farben-Analyse bestätigt wurde, sondern generell bei den meisten Erkrankungen eine verminderte Expression des Fibronektin- und Lamininrezeptors vorlag.

Tabelle 11 Zusammenfassung aller Ergebnisse des Basismoduls

Krankheitsbild	LAD-III	WAS	AML	TAR	SCA	cITP
Patientenzahl	2	2	15	7	5	3
FSC	n	↓	(↓)	↓	↓	↑
SSC	(↓)	↓	n	↓	↓	n
SSC/FSC	n	n	n	n	↑	(↓)
Anteil Aggregate	n	n	n	(↑)	(↓)	↑
CD41a	↓	(↓)	↓	n	(↓)	n
CD61	↓	(↓)	↓	↓	n	n
CD42a	n	n	n	↓	n	(↓)
CD42b	n	n	n	(↓)	n	n
CD29	(↓)	n	(↓)	↓	↓	n
CD49b	n	n	(↓)	n	(↓)	n
CD49e	↓	(↓)	↓	↓	↓	↓
CD49f	↓	↓	↓	↓	n	(↓)
CD62P / unstimuliert	n	n	(↑)	n	(↑)	n
CD63 / unstimuliert	n	n	(↑)	↑	n	n
PAC-1 / unstimuliert	n	n	n	n	n	n
CD62P / ADP 2 µM	(↓)	n	(↓)	n	n	n
CD62P / TRAP6 1 µM	(↓)	↓	↓	n	n	n
CD62P / TRAP6 5 µM	(↓)	↓	↓	n	n	n
CD63 / ADP 5 µM	(↓)	n	↓	(↑)	n	n
CD63 / TRAP6 5 µM	(↓)	↓	↓	↓	(↓)	n
PAC-1 / ADP 5 µM	↓↓↓	n	↓	n	n	n
PAC-1 / TRAP6 1 µM	↓↓↓	↓	↓	(↓)	n	n

3.6. Analyse unklarer Thrombozytopenien und Thrombozytopathien im klinischen Kontext

Da das Basismodul zur Thrombozytenfunktionsdiagnostik in Zukunft zur besseren Diagnostik bei unklaren Blutungsneigungen führen soll, wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Proben von Patienten mit unklaren Thrombozytopenien, -pathien und Blutungsneigung untersucht, zwei Fälle sind hier beispielhaft dargestellt.

3.6.1. Fall 1

Ein reifes männliches Neugeborenes war seit Geburt mit einer Thrombozytopenie von 20 Thrombozyten/nL und einem erhöhtem IPF von 18% auffällig. Bei der Mutter des Neugeborenen war ebenfalls eine Thrombozytopenie von um die 100 Thrombozyten/nL bekannt. Die Eltern türkischer Abstammung sind nicht konsanguin, der Vater ist gesund.

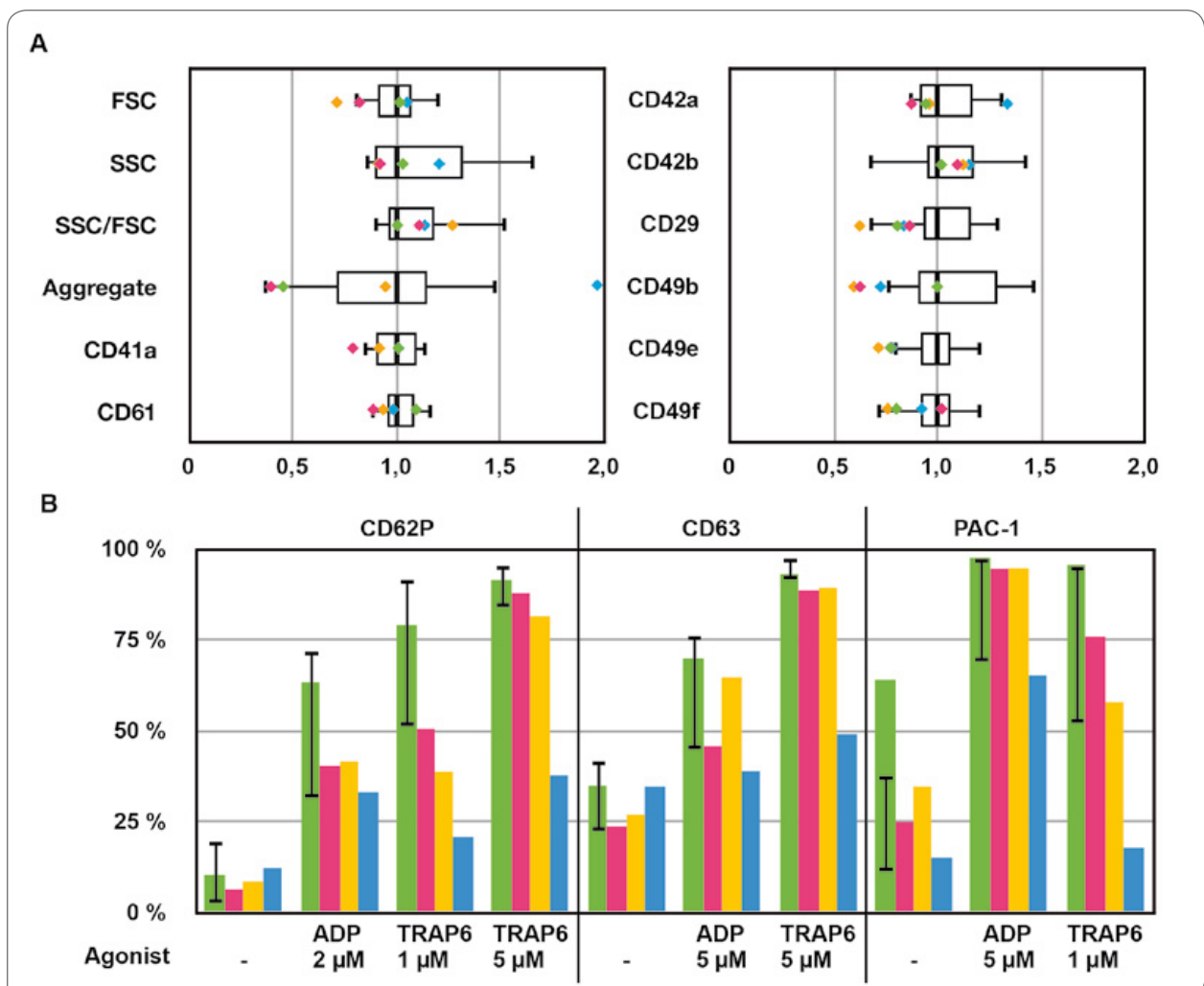


Abb. 31 Rezeptorexpression und Thrombozytenfunktion einer Familie mit Thrombozytopenie unklarer Genese. **A** Insgesamt wurde die Rezeptorexpression von n=3 Familienmitgliedern untersucht (◆ Kontrolle, ◆ Vater, ◆ Mutter, ◆ Kind) und die MFIs mit der Gesundspenderpopulation verglichen (Whisker: 5.-95. Perzentile, Balken: Median). Die Thrombozyten der Eltern sind eher klein. Das Kind zeigt einen sehr hohen Anteil an Aggregaten. **B** Insgesamt wurde die Thrombozytenfunktion von n=3 Familienmitgliedern untersucht (◆ Kontrolle, ◆ Vater, ◆ Mutter, ◆ Kind) und der „Percent over Threshold“ mit der Gesundspenderpopulation verglichen (Whisker: 5.-95. Perzentile). Die Eltern zeigen keine Auffälligkeiten in der Reaktivität. Die Thrombozyten des Kindes zeigen eine Hyporeaktivität.

Mutter und Kind zeigen trotz der Thrombozytopenie keine Blutungsneigung. Zum Ausschluss einer immunvermittelten Thrombozytopenie fiel eine Antikörperdiagnostik bei der Mutter im Vorfeld negativ aus. Im Ausstrich des Neugeborenen wurden Riesenthrombozyten gefunden. Zur Abklärung der Thrombozytopenie wurde die gesamte Familie mittels Basismodul und Mepacrin-Assay analysiert. Alle Familienmitglieder zeigen keine Veränderungen im Vorwärts- und Seitwärtsscatteer im Vergleich zur Gesunderpopulation, wobei das Neugeborene einen sehr hohen Anteil an Aggregaten aufweist. Die Expression der Rezeptoren ist, bis auf eine Reduktion der Anzahl an Kollagen- und Fibronectinrezeptoren, bei allen Familienmitgliedern unauffällig (Abb. 31A). Die Thrombozytenfunktion war bei Vater und Mutter unauffällig (Abb. 31B). Das Neugeborene hingegen zeigt keine adäquate CD63-Expression nach TRAP6 oder ADP-Stimulation. Auch die Degranulierung der α -Granula und die Integrinaktivierung ist nach Stimulation mit TRAP6 nur unzureichend. Die Integrinaktivierung und Degranulierung der α -Granula ist hingegen ungestört. Auch im Mepacrin-Assay zeigte das Neugeborene fast keine Reaktion auf die Stimulation mit TRAP6. Außerdem fällt auf, dass die Thrombozyten der Mutter und des Kindes schwächer mit Mepacrin anzufärben sind als die Gesunderpopulation. Der Mepacrin-Assay des Vaters ist unauffällig. Die Interpretation der Ergebnisse ist aufgrund fehlender Normwerte in diesem Fall schwierig, da für Neugeborene eine Hyporeaktivität der Thrombozyten beschrieben ist (siehe Kapitel 4.1.3). Eine Thrombozytopenie, Riesenthrombozyten, Hyporeaktivität auf Thrombinstimulation und vermehrte Aggregatbildung wurden aber auch im Zusammenhang mit dem Montreal-Plättchen-Syndrom, welches später als vWS Typ 2B identifiziert wurde, gefunden und sollte bei Riesenthrombozyten auch immer in Erwägung gezogen werden.⁵³ Deshalb wurde eine Multimerenanalyse des vWF und eventuell eine molekulargenetische Untersuchung des Neugeborenen empfohlen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lagen bisher noch nicht vor.

3.6.2. Fall 2

Bei Fall 2 handelt es sich ebenfalls um ein frühgeborenes Kind, das mit einer schweren Thrombozytopenie von minimal 5 Thrombozyten/nL auffällig war. Das Kind wurde wegen einer CMV-Infektion mit Valganciclovir behandelt. Auch die Mutter leidet unter einer Makrothrombozytopenie, thrombozytäre Antikörper wurden aber bereits ausgeschlossen. Mutter und Kind zeigten keine Blutungsneigung.

Die Analyse im Basismodul zeigt einen hohen Anteil an Thrombozyten-Aggregaten im Blut des Kindes. Besonders auffällig ist die verminderte Expression des Fibronectin- und Lamininrezeptors v.a. bei Mutter und Kind (Abb. 32A). Wie auch im ersten Fall, sind die Thrombozyten des Kindes hyporeaktiv (Abb. 32B). Aufgrund der sehr ähnlichen Befunde wurde die gleiche Empfehlung wie im Fall 1 gestellt.

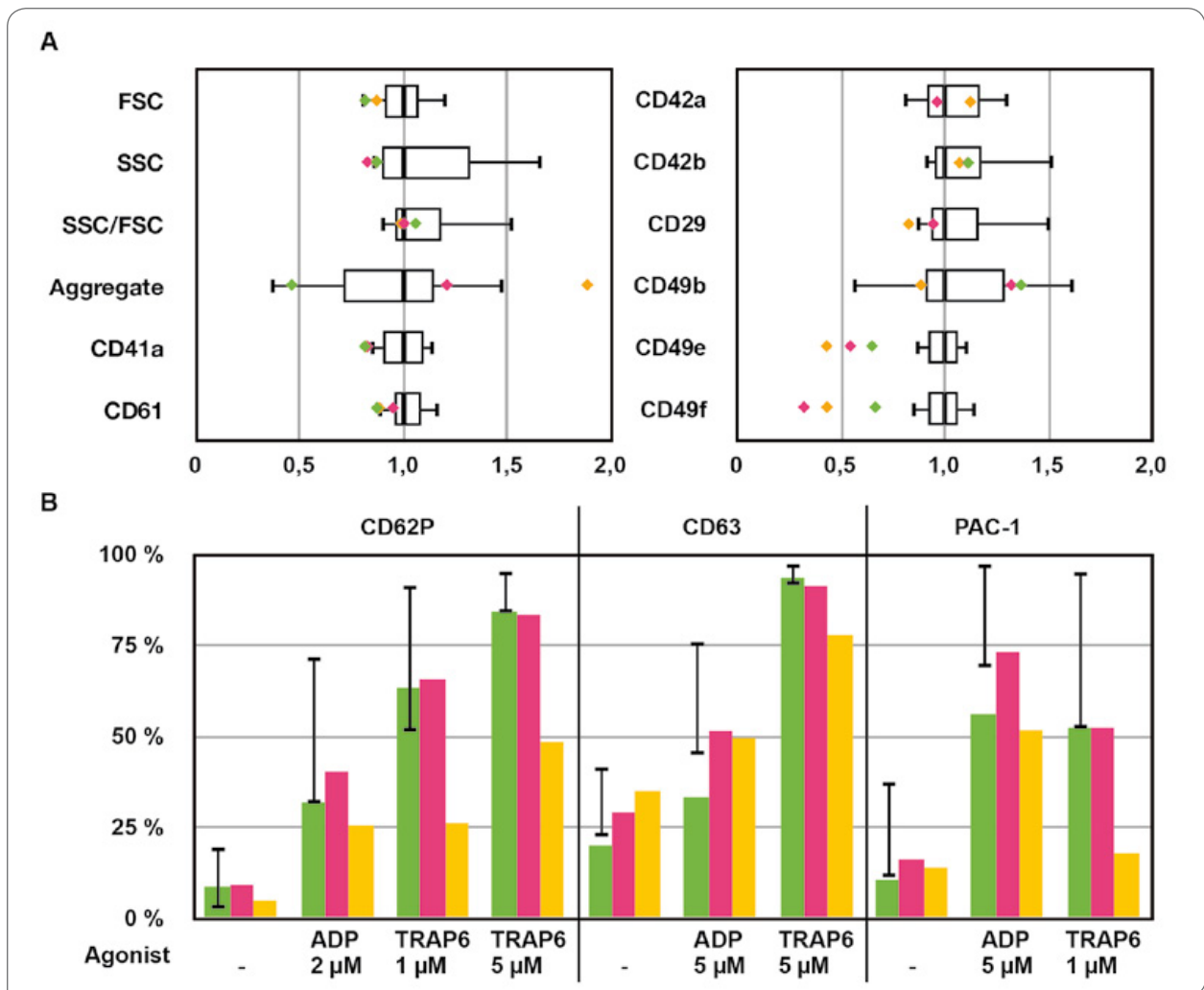


Abb. 32 Rezeptorexpression und Thrombozytenfunktion einer Familie mit unklarer Thrombozytopenie. **A** Insgesamt wurde die Rezeptorexpression von n=3 Familienmitgliedern untersucht (◆ Vater, ◆ Mutter, ◆ Kind) und die MFIs mit der Gesunderpopulation verglichen (Whisker: 5.-95. Perzentile, Balken: Median). Die Thrombozyten zeigen bei allen Familienmitgliedern eine stark verminderte Expression des Fibronektin- (CD49e) und Lamininrezeptors (CD49f). Das Kind fällt mit einem sehr hohen Anteil an Aggregaten auf. **B** Insgesamt wurde die Thrombozytenfunktion von n=3 Familienmitgliedern untersucht (◆ Kontrolle, ◆ Patient A, ◆ Patient B) und der „Percent over Threshold“ mit der Gesunderpopulation verglichen (Whisker: 5.-95. Perzentile). Die Thrombozyten des Kindes zeigen eine Hyporeaktivität v.a. bei suboptimalen TRAP6-Konzentrationen.

Die beiden hier dargestellten Fälle zeigen, dass das Basismodul kombiniert mit dem Mepacrin-Assay dazu geeignet ist, häufige Erkrankungen wie den MG, das BSS und SPDs bei Patienten mit unklaren Thrombozytopenien/-pathien auszuschließen. Schwierig war die Interpretation der Thrombozytenfunktion von Neugeborenen, sowie der Reduktion der β 1-Integrine.

4. Diskussion

4.1. Verbesserte Diagnostik bei unklaren Blutungsneigungen durch die Multi-Farben-Durchflusszytometrie

Rationale

Die durchflusszytometrische Analyse der Thrombozytenfunktion im Vollblut ist ein geeignetes Instrument, um diese in einer möglichst physiologischen Umgebung zu beurteilen.³⁶ Durch ein Minimum an Arbeitsschritten werden Artefakte durch in vitro Stimulation reduziert, und Subpopulationen, wie z.B. sehr große Thrombozyten, die sonst durch Zentrifugation verloren gehen würden, bleiben erhalten. Zudem kann bei einem nur sehr geringen Probenvolumen eine große Anzahl an Zellen in kürzester Zeit gemessen und beurteilt werden. Durch die moderne Multi-Farben-Durchflusszytometrie ist es möglich, mehrere Antikörper simultan anzuwenden, was den Zeit- und Materialaufwand nochmal herabsetzt. Im klinischen Alltag kommt es immer wieder vor, dass für den „Goldstandard“, die Aggregometrie, nicht genügend Material zur Verfügung gestellt werden kann und so die Abklärung unklarer Blutungsneigungen, vor allem in der Neonatologie, Pädiatrie und bei Patienten mit ausgeprägter Thrombozytopenie, unbefriedigend verläuft. Die Multi-Farben-Durchflusszytometrie ist in diesen Fällen die ideale Alternative, um auch mit wenig Probenvolumen eine Aussage zur Krankheitsursache treffen zu können. Trotz der vielen Vorteile ist die durchflusszytometrische Analyse bei der Abklärung von Blutungsneigungen aber immer noch zweitrangig und kommt in vielen Kliniken nur bei besonderen Fragestellungen zur Anwendung.^{42,54,55} Einheitliche Standards für die Thrombozytenfunktionsanalyse gibt es bisher nicht, was u.a. dazu führt, dass in den verschiedenen Laboratorien unterschiedliche Agonisten in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt werden.^{42,54,55,29} Beispielsweise wird der Agonist ADP in der Durchflusszytometrie im deutschen Sprachraum mit Konzentrationen zwischen 0,1 und 20 μM eingesetzt;⁴² in Nordamerika ist das Intervall mit 0,5 bis 1000 μM sogar noch weiter.⁵⁴ Aus diesem Grund können Testergebnisse verschiedener Laboratorien unter- und miteinander nicht gut verglichen werden.

Ziel dieser Arbeit war es, mittels Multi-Farben-Durchflusszytometrie ein Verfahren zu entwickeln, welches durch den Einsatz verschiedener Module zur Abklärung unklarer Blutungsneigungen beiträgt und außerdem die Testergebnisse durch standardisierte Prüfmethode auch von verschiedenen Messtagen vergleichbar zu machen.

4.1.1. Optimierung der Methode

Voraussetzungen

Zu Beginn dieser Arbeit war es nötig, die bis dato im Labor eingesetzten Verfahren zur durchflusszytometrischen Diagnostik der Thrombozytenfunktion zu beurteilen, anzupassen und zu standardisieren. Bisher wurden die Messungen an einem FACScan mit 2 Farben durchgeführt und die Analyse konzentrierte sich auf die wichtigsten Thrombozytenantigene CD41a und CD42a, sowie die Analyse der Expression des aktivierten Fibrinogenrezeptors mittels PAC-1 Bindung und den Aktivierungsmarker CD62P nach Stimulation mit ADP oder TRAP6. Die Messungen erfolgten wenn möglich im Vollblut; häufig war es aber technisch notwendig, die Messungen im PRP durchzuführen. Begleitend wurde bei jeder Messung immer eine Gesunderkontrollenkontrolle mitgeführt. Das Aufbereiten der Proben und die Messung war vor allem bei Patienten mit Thrombozytopenien bisher sehr zeitaufwendig. Die Messungen sollten deshalb in Zukunft an einem FACSCanto II mit simultaner Analyse mehrerer Farben durchgeführt werden. Das bisher gut funktionierende Färbeprotokoll für die Immunphänotypisierung der Thrombozyten veränderte sich dahingehend nur durch den simultanen Einsatz von direkt markierten Antikörpern in 4 anstatt 2 Farben. Um Artefakte durch in vitro-Stimulation zu vermeiden und die Analyse in einem möglichst physiologischen Milieu durchzuführen, wurden alle Untersuchungen im Vollblut und ohne vorherige Fixierung durchgeführt. Die verwendeten Fluorophore FITC, PE, PerCP oder PE-Cy 5 und APC ergaben sich aus der Verfügbarkeit von direkt markierten Antikörpern der Firma BD. Um die für die Multi-Farben-Analyse typische Überstrahlung der eingesetzten Fluorophore zu reduzieren, wurde zu Beginn der Arbeit eine Kompensation anhand hochexprimierter Antigene durchgeführt.^{56,57,58} Die einzusetzenden Volumina für ein optimales Färbeergebnis wurden austitriert.⁴³ Durch die Umstellung von einem 2-Farben- auf ein 4-Farben-System können nun mehr Antikörper als bisher bei weniger experimentellem Aufwand simultan analysiert werden. Würde man alle mit dem Basismodul erfassten Informationen durch ein 2-Farben-System abbilden, wären anstatt 7 Proben ca. 17 Proben notwendig. Darüber hinaus ist es möglich, mit dem FACS Canto II 10.000 Ereignisse/s zu analysieren, während das FACScan nur maximal 5.000 Ereignisse/s aufzeichnen kann. Für die Messung wird also weniger Zeit als bisher benötigt, was sich vor allem bei der Messung von Proben von Patienten mit Thrombozytopenie bemerkbar macht.

Wahl der Kontrollen

Zum Ausschluss unspezifischer Bindung von Antikörpern z.B. an Fc-Rezeptoren werden in der durchflusszytometrischen Analytik häufig Isotypenkontrollen, d.h. ein in seiner

Spezifität irrelevanter Antikörper des gleichen Isotyps, eingesetzt.⁵⁶ Da der Einsatz von Isotypenkontrollen teuer ist und zudem die Aufbereitung zusätzlicher Proben notwendig macht, wurde hier darauf verzichtet. Dies wird auch in der Literatur so vorgeschlagen.^{56,43} Stattdessen kommen in der Multi-Farben-Analyse FMO-Kontrollen zum Einsatz, welche hauptsächlich Fehler durch Überstrahlung aus anderen Kanälen identifizieren.^{56,58,59} Diese Kontrollen wurden für die Fluorophore FITC, PE und APC in das Basismodul integriert (Tabelle 6). Anhand der FMO-Kontrollen ist später außerdem die genaue Abgrenzung positiver von negativen Ereignissen möglich.^{56,58} Da im Kanal für PE-Cy5 hauptsächlich hochexprimierte Antigene gemessen werden, ist für diesen Kanal keine FMO-Kontrolle notwendig.

4.1.2. Probenvorbereitung und Messbedingungen

Abnahmebedingungen

Die Analyse der Thrombozytenfunktion kann von verschiedenen äußeren Faktoren beeinflusst, wie z.B. den Blutabnahme- und Lagerungsbedingungen oder der Zeit zwischen Abnahme und Analyse. Im Allgemeinen wird empfohlen, das Blut für die Analyse aus einer Armvene unter möglichst geringer Stauung mit einer 21-G Nadel abzunehmen. Die ersten 2 ml sollten verworfen werden.^{60,61} Durch Einhaltung dieser Regeln, soll die Aktivierung der Thrombozyten durch Gewebefaktoren und Hämolyse möglichst gering gehalten werden. Bei einem Erwachsenen mit guten Venenverhältnissen ist dies möglich, aber in der Klinikrealität sind diese Bedingungen häufig nicht einzuhalten. Vor allem bei Kleinkindern, Säuglingen und Neugeborenen ist die Blutabnahme ohne eine adäquate Stauung nicht möglich. Auch das Verwerfen der ersten 2 ml ist beispielsweise in der Neugeborenenmedizin wenig praktikabel. Außerdem ist man in manchen Fällen, wie z.B. bei Patienten mit Skelettanomalien wie TAR-Patienten, gezwungen, an ungewöhnlichen Stellen Blut abzunehmen. Eine für die Voraktivierung typische erhöhte Expression des P-Selektin im unstimulierten Zustand konnte auf Thrombozyten von TAR-Patienten aber nicht nachgewiesen werden (Abb. 27B). Ebenso konnte allenfalls ein gering höherer Anteil an Thrombozytenaggregaten nachgewiesen werden. Die Abnahmebedingungen hatten demnach keinen großen Einfluss auf die Verwertbarkeit der Ergebnisse. *Die Funktionsdiagnostik im Basismodul kann also generell auch nach erschwelter Blutentnahme durchgeführt werden.*

Wahl des Antikoagulans

Auch die Wahl des Antikoagulans hat einen Einfluss auf die Ergebnisse der Thrombozytenfunktion. Üblicherweise wird für die Thrombozytenfunktionsanalyse Blut mit 10,6 mM des Calciumchelator Citrat versetzt. Die durchflusszytometrische Beurteilung der Bindung von PAC-1 an das aktivierte Integrin $\alpha\text{IIb}\beta_3$ ist nur mit Citrat

als Antikoagulans durchführbar.⁶² Durch erschwerte Bedingungen bei der Blutentnahme und die Verwendung handelsüblicher Vakutainer oder Monovetten kommt es außerdem vor, dass das Verhältnis von Antikoagulans zu Blut nicht eingehalten werden kann. *Die Analyse solcher Proben war auch bei nur halb oder sogar noch weniger gefüllten Monovetten problemlos möglich und es zeigten sich keine Einbußen bei der Funktionsanalyse im Basismodul (Daten nicht gezeigt).* Eine genauere Untersuchung z.B. im Rahmen einer Verdünnungsreihe wurde im Rahmen dieser Arbeit aber nicht durchgeführt. Um eine falsche Verdünnung zu umgehen, könnte man das Antikoagulans dem Blut erst kurz nach der Blutentnahme in der richtigen Konzentration zufügen. Im Klinikalltag wäre dies wenig praktikabel; stattdessen sollte man versuchen, Citrat-Röhrchen mit einem möglichst kleinen Volumen zu verwenden (z.B. kleine Röhrchen aus der Neonatologie).

Lagerungsdauer

Für die Aggregometrie ist bekannt, dass die Lagerungsdauer einen Einfluss auf die Thrombozytenfunktion hat. Die Plättchen sind ca. 15-30 min nach der Zentrifugation für die Herstellung des PRP hyporeaktiv und zeigen nach dieser Zeit und innerhalb der ersten 3 h eine gleichbleibend gute Thrombozytenfunktion.³⁴ Deshalb soll bei dieser Methode eine maximale Lagerungszeit von 3 h nach Blutentnahme eingehalten werden.³⁴ Um eine solch kurze Lagerungsdauer einzuhalten, wäre es notwendig, die Blutentnahme direkt vor Ort durchzuführen. Da es aber nicht immer möglich ist, dass die Patienten direkt ins Spezial-Labor kommen können und wollen, sondern das Blut durch einen Boten oder die Post ins Labor transportiert wird, ist es wichtig, den Einfluss der Lagerungsdauer auf die Thrombozytenfunktion genau zu kennen.

Im Langzeitexperiment konnte eine kontinuierliche Zunahme der Expression von CD62P und CD63 mit der Lagerungszeit nachgewiesen werden (Abb. 17). Mody et al.⁶³ führten dies auf die Antikoagulation mit Citrat zurück. Die Thrombozyten zeigen bei der Funktionsdiagnostik außerdem nach 3h Lagerungsdauer einen Peak in der Reaktion auf suboptimale Agonistenstimulation. Das heißt, die für die Aggregometrie beschriebene Hyporeaktivität in den ersten 15-30 min nach Blutentnahme kann auch in der Durchflusszytometrie nachvollzogen werden. Es könnte aber auch sein, dass die Thrombozyten zum Zeitpunkt 0 nicht hyporeaktiv sind, sondern nach 3 h hyperreaktiv. Die Reaktivität der Thrombozyten auf eine optimale Thrombozytenstimulation zeigt keinen solchen Peak und ist auch noch 30 h nach Blutentnahme adäquat. Wie auch Mody et al. zeigten, hat die Lagerungsdauer auf die Expression der Oberflächenrezeptoren ruhender Plättchen keinen Einfluss (Abb. 16). *Die Untersuchung der Thrombozytenfunktion und der Expression der Oberflächenrezeptoren ist also auch einen Tag nach Blutentnahme noch aussagekräftig und sogar der Versand von*

Proben über Nacht bei Raumtemperatur möglich. Dadurch erschließt sich für jedes Labor ein wesentlich größerer Patientenkreis. Um die Beurteilung der Ergebnisse der diagnostischen Thrombozytenfunktionsanalyse zu sichern, sollte dennoch immer eine zeitgleich abgenommene Gesundspenderkontrolle mit analysiert werden. Außerdem muss neben dem genauen Abnahmedatum und -zeit auch die Analysezeit dokumentiert werden. Beides wird im entwickelten Anforderungsschein für die Thrombozytenfunktionsanalyse erfasst (Abb. 37, Seite 75).

4.1.3. Wahl der Kontroll- und Patientenpopulationen

Kontrollpopulation

Die Etablierung des neuen 4-Farben-Systems sollte an einer geeigneten Kontrollpopulation durchgeführt werden. Anhand dieser Population sollen später außerdem physiologische von pathologischen Ergebnissen abgegrenzt werden. In dieser Arbeit wurde hauptsächlich nicht mehr benötigtes Citrat-Blut von anonymen Gesundspendern für die Stammzelltransplantation verwendet, welches bis zur Analyse sicher bei Raumtemperatur gelagert wurde. Das Alter und das Geschlechterverhältnis der Gesundspender verteilte sich ausgeglichen. Die Auswahl von Stammzellspendern unterliegt strengen Ausschlusskriterien, sodass davon auszugehen ist, dass es sich um Blut von gesunden Erwachsenen handelt. Eine Einnahme von Medikamenten mit Einfluss auf die Thrombozytenfunktion wie z.B. ASS innerhalb der letzten 10 Tage vor Blutentnahme kann in diesem Kollektiv allerdings nicht sicher ausgeschlossen werden. Die aus der Gesundspenderpopulation gebildeten Normwerte sind somit als vorläufig zu betrachten.

Experimente zur Agonisten- und Antikörpertitration, sowie dem Einfluss der Lagerungsdauer wurden ausschließlich an Gesundspendern durchgeführt, bei denen eine Blutungsneigung als auch die Einnahme von Medikamenten sicher ausgeschlossen werden konnte.

Patienten mit bekannten Thrombozytenfunktionsstörungen

Um zu evaluieren, inwiefern das entwickelte Basismodul und die verschiedenen Zusatzmodule wie die Analyse der Calciummobilisierung und der Mepacrin-Assay in der Lage sind, pathologische von physiologischen Ergebnissen zu unterscheiden, sollten Blutproben von Patienten mit bereits bekannten Thrombozytenfunktionsstörungen untersucht werden.

An erster Stelle wurden zwei Patienten mit einer **LAD-III** im Basismodul analysiert. Durch einen Defekt des Kindlin-3 Proteins¹⁸ kann dieses nicht mehr an den zytoplasmatischen Teil der β 3- und der β 1-Integrine binden und die Transformation des Rezeptors mit Hilfe

des Bindungsparameters Talin in einen hochaffinen Zustand nach Aktivierung bleibt aus (Abb. 33).¹⁹ Im Sinne dieses Defektes konnte bei beiden Patienten keine PAC-1 Bindung an aktiviertes Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{III}$ sowohl nach Stimulation mit TRAP6 als auch mit ADP nachgewiesen werden (Abb. 21B). Weiterhin konnte durch den Nachweis einer ungestörten Calciummobilisierung (Abb. 22) und einer normalen Degranulierung (Abb. 21B) gezeigt werden, dass die frühen Signalwege von diesem Defekt nicht beeinflusst werden. *Es ist also möglich durch die Kombination des Basismoduls mit der Analyse der Calciummobilisierung die Ebene des Defekts genauer einzugrenzen.*

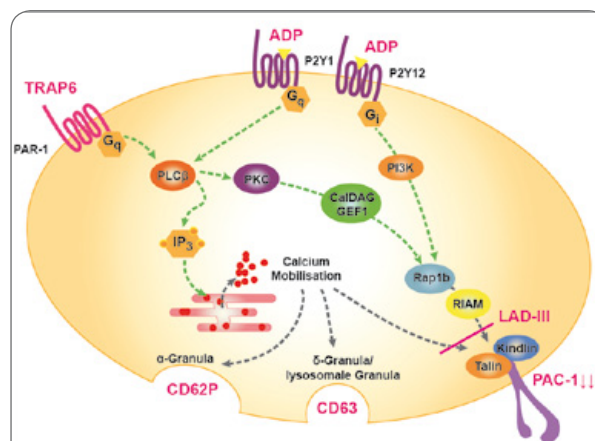


Abb. 33 Defekt des KINDLIN-3 Proteins bei Patienten mit LAD-III.

Als zweites wurde Blut von zwei Patienten mit bekanntem **WAS** nach HSCT untersucht. Bei beiden Patienten besteht trotz der Transplantation eine Mikrothrombozytopenie, d.h. die Bildung der Thrombozyten geht nicht vollständig aus den Stammzellen des Spenders hervor. Diese Mikrothrombozytopenie konnte auch deutlich anhand des verminderten FSC nachvollzogen werden (Abb. 23A). Der Nachweis einer größtenteils normalen Expression der Oberflächenrezeptoren zeigt, dass der Einfluss der Größe der Thrombozyten durch das gewählte enge Analysefenster keine falschen Ergebnisse in Bezug auf die Rezeptorexpression liefert. Wie Semple et al. zeigten, ist die Expression der Aktivierungsmarker CD62P und CD63 nach Stimulation mit TRAP6 vermindert, während sie nach Stimulation mit ADP normal erscheint (Abb. 23B).⁵⁰ Auch die beschriebene verminderte Expression des Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{III}$ konnte bei einem Patienten nachvollzogen werden.

Um diese noch sehr kleine Gruppe von Patienten mit bekannten Thrombozytenfunktionsstörungen zu erweitern, wurde außerdem Blut von Patienten mit **AML** analysiert. Für diese Patienten sind ebenfalls Defekte der Thrombozytenreaktivität in der Literatur beschrieben. In den 70er Jahren untersuchten Cowan und Mitarbeiter Thrombozyten von an AML und chronischen Leukämien erkrankten Patienten während der Blastenkrise.⁶⁴ Sie fanden damals starke Variationen in der Größe der Plättchen, sowie in der Anzahl der α -Granula. Außerdem war die Konzentration von intrazellulären ATP und ADP bei den Patienten stark vermindert. 2004 charakterisierten Leinoe et al. die bisher bekannten Thrombozytendefekte mittels Durchflusszytometrie an 50 Patienten mit AML bei Diagnosestellung und fanden eine verminderte Expression von CD62P, CD63 und PAC-1 nach Stimulation mit hohen Dosen TRAP und ADP. Eine Voraktivierung der

Thrombozyten konnte ausgeschlossen werden.^{65,64} Die in der Literatur beschriebenen Funktionsdefekte konnten mit dem entwickelten Basismodul und den Zusatzmodulen genau wie beschrieben nachvollzogen werden, was wiederum für die Sensitivität der hier entwickelten Methoden spricht. Das analysierte Blut von Probanden dieser Gruppe ist nicht mehr benötigtes Material aus der HLA-Analyse und Gewebetypisierung für die Suche nach einem Stammzellspender. Wie bei den Gesundspendern auch, wurde Alter, Geschlecht und Abnahmedatum dokumentiert. Es besteht allerdings keine Information über die genaue medikamentöse Therapie, sodass nicht genau geklärt werden kann, ob die gefundenen Defizite der Thrombozytenfunktion ihre Ursache in der medikamentösen Therapie oder in der Erkrankung an sich haben. Außerdem kann keine Aussage über eine Assoziation der nachgewiesenen Defekt mit den FAB-Subtyp der AML gemacht werden, da hierfür keine ausreichenden Angaben zu den untersuchten Patienten verfügbar waren. Dies sollte aber auch nicht Gegenstand dieser Arbeit sein. In Zukunft wäre es interessant, ob es Unterschiede in der Thrombozytenfunktion von Patienten mit unterschiedlichen FAB-Subtypen gibt, da es vor allem bei den FAB-Subtypen M3 und M5 vermehrt zu Blutungskomplikationen kommt.^{66,67}

Anhand der gewählten Patientengruppen mit bekannten Störungen der Thrombozytenfunktion konnte gezeigt werden, dass das entwickelte Basismodul unabhängig von einer Thrombozytopenie und einer veränderten Thrombozytenmorphologie in der Lage ist, diese Störungen nachzuvollziehen. Die gute Abgrenzbarkeit pathologischer von physiologischen Ergebnissen in dieser Gruppe spricht außerdem für eine gleichmäßig gute Qualität der Proben aus der gewählten Gesundspenderpopulation.

Patientengruppen mit vermuteter Thrombozytenfunktionsstörungen

In der Klinik und der Literatur werden für verschiedene Erkrankungen wie z.B. für das TAR-Syndrom, die SCA oder die ITP immer wieder Thrombozytenfunktionsstörungen diskutiert. Nachdem im Kapitel 3.3 gezeigt wurde, dass das entwickelte Basismodul grundsätzlich in der Lage ist, Störungen der Thrombozytenfunktion zu erkennen, sollte Blut von Patienten mit diesen Erkrankungen analysiert und so die bisherigen Vermutungen objektiviert werden.

Chirurgen berichten immer wieder, dass Blutungen während und nach operativen Eingriffen zur Radiusrekonstruktion bei **TAR**-Patienten häufig nicht allein durch die Thrombozytenzahl zu erklären ist. Ein zusätzlicher Funktionsdefekt der Thrombozyten ist somit anzunehmen. Eine systematische Analyse der Thrombozytenfunktion mittels Durchflusszytometrie ist derzeit in der Literatur nicht beschrieben. Für diese Patienten ist bisher lediglich eine verminderte Aggregationsfähigkeit nach Stimulation mit Kollagen, sowie eine fehlende sekundäre Aggregationswelle nach Stimulation mit ADP

und Adrenalin bekannt. Die fehlende Aggregation könnte durch das Vorliegen eines SPD erklärt werden.⁶⁸ Während der Aktivierungsmarker CD62P und die Bindung von PAC-1 keine signifikanten Veränderungen zeigten, ergab sich für CD63 ein ungewöhnliches Expressionsmuster (Abb. 27B). Das Antigen ist auf ruhenden Thrombozyten im Vergleich zur Gesunderpopulation wesentlich höher exprimiert, während die Stimulation mit einer optimalen Dosis TRAP6 nicht zum optimalen Ergebnis führte. Auch die Aktivierung des Fibrinogenrezeptors nach Stimulation mit suboptimalen Dosen TRAP6 war vermindert. Dies könnte durch eine fehlende ADP-Ausschüttung aus den δ -Granula bedingt sein. Beide Ergebnisse unterstützen die Vermutung eines zusätzlichen SPD. Dies müsste in Zukunft durch den Einsatz des Mepacrin-Assays, der zum Zeitpunkt der Analyse noch nicht verfügbar war, weiter evaluiert werden. Neben den Funktionsdefekten zeigten sich auch verminderte Werte im FSC und SSC als Hinweis auf eine Mikrothrombozytopenie (Abb. 27A). Diese konnte bei den wenigen Patienten, für die MPV-Werte verfügbar waren, aber nicht nachvollzogen werden. Dabei ist allerdings zu beachten, dass der MPV ein Mittelwert ist und somit anfällig für Ausreißer, während für die Analyse des FSC der robustere Median gewählt wurde. Beide Parameter bilden aber nicht die Verteilungsbreite des Thrombozytenvolumens ab. Mikrothrombozytopenien sind häufig im Rahmen von Bildungsstörungen zu beobachten; da auch beim TAR-Syndrom eine Bildungsstörung vorliegt, ist eine gewisse Mikrothrombozytopenie also durchaus zu erwarten.

Für Patienten mit **SCA** wird aufgrund der erhöhten Thromboseneigung eine überschießende Thrombozytenfunktion vermutet. Wun et al. fanden 1997 eine erhöhte Anzahl an Mikropartikeln und Plättchen-Erythrozyten-Aggregaten im Blut von SCA-Patienten.⁶⁹ Es konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass die Thrombozyten von Patienten mit SCA eher klein und wenig granuliert sind (Abb. 29A). Da diese Patienten nicht unter einer Thrombozytopenie leiden, waren MPV-Werte verfügbar, welche erniedrigt waren und somit dieses Ergebnis unterstützen. Dies spricht ebenfalls für die Sensitivität des Vorwärtsscatters in Bezug auf die Größe der Thrombozyten. Außerdem wurde eine erhöhte Expression der Aktivierungsmarker CD63, CD62P und Bindung von PAC-1 auf unstimulierten Plättchen beschrieben.⁶⁹ Diese Beobachtung konnte bei den analysierten Patienten so nicht nachvollzogen werden; die Thrombozytenfunktion war unauffällig und tendierte entgegen den Erwartungen eher zur Hyporeaktivität (Abb. 29B). Eine Hyperreaktivität, welche die erhöhte Thromboseneigung der Patienten erklären könnte, konnte mit den durchgeführten Untersuchungen nicht gefunden werden.

Als letzte Gruppe wurde Blut von Patienten mit **cITP** analysiert. Die häufig von Ärzten geäußerte Vermutung, die Thrombozyten dieser Patienten seien hyperreaktiv, konnte hier nicht bestätigt werden. Die Thrombozytenfunktion zeigte bei den untersuchten

Patienten unterschiedliche Muster (Abb. 30B). Um eine genaue Aussage über die Thrombozytenfunktion machen zu können, müsste also ein größeres Patientenkollektiv untersucht werden. Auffällig war ein deutlich erhöhter FSC bei zwei Patienten, welcher bei cITP-Patienten vermutlich aus einem erhöhten Anteil an großen, RNA reichen Thrombozyten, also einen erhöhten Anteil der „Immature Platelet Fraction“ resultiert.⁷⁰

Anhand der analysierten Patientengruppen konnte gezeigt werden, dass das entwickelte Basismodul in der Lage ist, neue Erkenntnisse in Bezug auf die Thrombozytenfunktion zu liefern. Es zeigte sich außerdem, dass die mitunter deutlich veränderten Werte im FSC und SSC nicht in allen Fällen mit pathologischen MPV-Werten korrelieren. In Zukunft müsste untersucht werden, ob FSC und SSC ggf. sensitiver für Veränderungen der Thrombozytenmorphologie sind als das MPV.

Patienten mit unklarer Blutungsneigung

Um die Praktikabilität der entwickelten Methoden im klinischen Alltag zu testen, wurde Blut von Patienten mit unklarer Blutungsneigung und Thrombozytopenien analysiert und zwei Fälle in dieser Arbeit beispielhaft dargestellt. Durch die Analyse war es möglich, verschiedene Erkrankungen auszuschließen und jeweils eine Verdachtsdiagnose zu äußern, bzw. Anregungen zur weiteren Diagnostik zu geben. Als schwierig erwies sich jedoch die Auswertung der Thrombozytenfunktion von Neu- und Frühgeborenen. Es ist bekannt, dass Thrombozyten von Neugeborenen und vor allem Frühgeborenen hyporeaktiv sind und die Thrombozytenzahl sowie -funktion in den ersten Lebenstagen variiert.^{71,72} Da die Gesundspenderkontrollen aber ausschließlich von Erwachsenen Probanden stammen, war es hier schwierig physiologische von pathologischen Ergebnissen abzugrenzen. Um eine gute Auswertbarkeit der Analysen auch bei diesen Patienten zu gewährleisten, müssen unbedingt Normwerte für diese Patientengruppe etabliert werden.

4.2. Einsatz von Basis- und erweiterten Diagnostikmodulen

Um eine umfassende Diagnostik bei Störungen der primären Hämostase mittels Multi-Farben-Durchflusszytometrie zu gewährleisten, wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere Module entwickelt. Diese Module sollen später selektiv nach einem bestimmten Algorithmus durchgeführt werden, um möglichst schnell und effizient zu einem aussagekräftigen Ergebnis zu gelangen (Abb. 36, Seite 74).

4.2.1. Aussagekraft des Basismoduls

Das Basismodul sollte als erster diagnostischer Grundstein (1) schnell und einfach von jedem ausführbar sein und (2) die wichtigsten Störungen der primären Hämostase wie das BSS, den MG und SPDs identifizieren können. Um Punkt 1 zu erfüllen, wurden für

das Basismodul ausschließlich direkt gekoppelte Antikörper gewählt, die ein möglichst breites Spektrum der Fluoreszenzkanäle abdecken. Aufwendige Färbeschritte fallen so weg und die Anzahl der Proben wird gering gehalten. Die Zeit und der Aufwand für die Vorbereitung und Messung konnte so auf ein Minimum reduziert werden. Die Verfügbarkeit direkt gekoppelter Antikörper war dabei aber auch einschränkender Faktor. So konnten anstatt der möglichen 8 „nur“ 4 Fluoreszenzen simultan gemessen werden. Hier besteht also noch Optimierungspotential, z.B. durch Verwendung von Fluorophoren die vom bisher nicht genutzten blauen Laser angeregt werden.

Thrombozytenmorphologie

Viele Störungen der primären Hämostase gehen auch mit einer veränderten Thrombozytenmorphologie einher. Obwohl nicht allein die Größe der Zelle einen Einfluss auf den Vorwärtsscatter hat,⁷³ ist es trotzdem möglich, im Basismodul z.B. eine Mikro- oder Makrothrombozytopenie anhand des FSC zu identifizieren und somit erste Hinweise auf die Entität der Erkrankung zu bekommen. Beispielhaft konnte bei beiden Patienten mit WAS, welches mit einer Mikrothrombozytopenie einher geht,⁵⁰ eine Verminderung des FSC gegenüber der Gesunderpopulation nachgewiesen werden (Abb. 23B). Für die Patienten mit SCA kann außerdem eine gute Korrelation zwischen verminderten MPV und FSC beobachtet werden. Bei einem Patienten mit bekannter Makrothrombozytopenie (MPV erhöht) konnte hingegen eine deutliche Erhöhung des FSC nachgewiesen werden (Daten nicht dargestellt). *Es ist also anzunehmen, dass der FSC gut mit dem Thrombozytenvolumen korreliert.*

Eine Verminderung des SSC als Maß für die Granulierung des Thrombozyten kann außerdem auf eine Verminderung der α -, δ - oder lysosomalen Granula hinweisen. Die Reduktion des FSC geht allerdings in allen Fällen auch mit einer Verminderung des SSC einher. Darum sollen diese beiden Werte im Verhältnis betrachtet werden (SSC/FSC).

Zu beachten ist außerdem, dass die Gatingstrategie ein begrenzender Faktor bei der Beurteilung der Scatereigenschaften ist (Abb. 12). Durch die Abgrenzung von Aggregaten und einzelnen Thrombozyten kann es passieren, dass ganz besonders große Thrombozyten bei der Berechnung des MFI für die Scatereigenschaften nicht berücksichtigt werden. Allerdings sollte eine Makrothrombozytopenie trotzdem erkennbar sein.

Das Integrin α IIb β 3 (CD41a/CD61)

Der MG wird verursacht durch einen Defekt des Integrinrezeptors α IIb β 3,^{74,75} und wird typischerweise durch die Durchflusszytometrie oder Aggregometrie nachgewiesen.^{76,77} Eine Verminderung des Rezeptors wird im Basismodul durch den Antikörper CD41a, welcher sich gegen den gesamten Rezeptorkomplex richtet und den Antikörper

CD61 welcher sich ausschließlich gegen die β 3-Untereinheit richtet, untersucht. Der Integrinrezeptor α IIb β 3 ist auf Thrombozyten der Patienten residual noch nachzuweisen, jedoch beträgt die maximale Expression ca. 20%,⁷⁴ sodass die Erkrankung in einer deutlichen Reduktion der MFIs für die beiden Rezeptoren resultieren sollte. Auch bei Patienten, welche heterozygot für die Erkrankung sind, ist die Expression des Rezeptors noch reduziert.^{78,77} Neben der Reduktion (Typ 1) und dem Fehlen des Integrinrezeptors (Typ 2) ist allerdings noch eine dritte Variante der Glanzmann Thrombasthenie bekannt, bei dem ein Funktionsdefekt des Integrinrezeptors vorliegt, die Expression aber nur wenig vermindert oder sogar normal ist.¹³ Der Antikörper CD41a wird im Basismodul für die Funktionsdiagnostik zur eindeutigen Identifizierung der Thrombozyten verwendet, da der Rezeptor ausschließlich auf Thrombozyten exprimiert wird. Beim Vorliegen eines MG ist dieser Antikörper natürlich für die Identifizierung ungeeignet und muss ersetzt werden. Um das Vorliegen einer Glanzmann Thrombasthenie zu erkennen, werden die Thrombozyten in Probe 2 (Tabelle 6) alternativ über den Antikörper CD42b identifiziert und die Expression von CD61 untersucht (eine isolierte Reduktion des Integrin α IIb ist für diese Patienten bisher nicht beschrieben). Zu beachten ist, dass sich der Antikörper CD61 gegen das Integrin β 3 richtet, welches auch Teil des Vitronectin-Rezeptors α V β 3 ist, welcher auf Thrombozyten aber im Vergleich zum Fibrinogen-Rezeptor mit nur wenigen 100 Kopien zu vernachlässigen ist.⁹

GPIb-IX-V (CD42a/b/c/d)

Das BSS ist ein autosomal-rezessiv vererbter Defekt des GPIb-IX-V-Komplexes und wird ebenfalls an erster Stelle durch die Durchflusszytometrie nachgewiesen.^{76,77} Es sind verschiedene Mutationen in den Genen für die Untereinheiten GPIb α (CD42b), GPIb β (CD42c) und GPIX (CD42a) beschrieben. Der Defekt einer Untereinheit führt zumeist zur Reduktion der Expression des gesamten Komplexes.⁷⁹ Zur Identifizierung der Reduktion werden im Basismodul die Antikörper CD42a und CD42b eingesetzt. Die MFIs sind beim Vorliegen eines BSS deutlich reduziert.⁸⁰ Diese beiden Antikörper zählen zu den am häufigsten eingesetzten Antikörpern zur Identifizierung eines BSS.⁴² In Probe 1 (Tabelle 6) des Basismoduls werden die Thrombozyten über CD42b identifiziert. Ist die Expression von CD42b reduziert, so fällt dies bereits bei der Messung auf und die Identifizierung muss dann anhand von CD61 vorgenommen werden. CD61 wird z.B. auch auf Osteoklasten oder Endothelzellen exprimiert, diese sind aber normalerweise nicht im Blut lokalisierbar, sodass der Antikörper zur alternativen Identifizierung verwendet werden kann.

β 1-Integrine (CD29/CD49b,e,f)

Obwohl direkt gekoppelte Fluorophor-Antikörper gegen alle auf Thrombozyten exprimierte β 1-Integrine verfügbar sind, ist bisher wenig über deren Expression im Zusammenhang mit Störungen der primären Hämostase bekannt. In der durchflusszytometrischen Routine-Diagnostik werden bisher nur, und das auch nur selten, Antikörper gegen die β 1-Untereinheit und gegen die α 2-Untereinheit zur Diagnostik berücksichtigt. Die Expression der Integrine α 5 und α 6 wird von keinem Labor im deutschen Sprachraum untersucht.⁴² Um diese Lücke in der durchflusszytometrischen Diagnostik zu schließen, wurden die Integrine α 2 β 1, α 5 β 1 und α 6 β 1 in das Basismodul aufgenommen und ihre Expression bei den unterschiedlichen Krankheitsentitäten untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des β 1-Integrin (CD29) bei einem Großteil der Patienten zwischen der 5. und 25. Perzentile der Gesunderpopulation und teilweise auch darunter liegt. Die Integrine α 5 und α 6 sind bei allen thrombozytopenen Patienten vermindert, während bei der SCA eher die α 2-Untereinheit (CD49b) des Kollagenrezeptors reduziert zu finden ist.

Die β 1-Integrine sind im Rahmen der primären Hämostase verantwortlich für die Adhäsion der Thrombozyten an die subendothelialen Matrixproteine und bilden Rezeptoren für Kollagen (α 2 β 1), Laminin (α 6 β 1) und Fibronectin (α 5 β 1). Obwohl in der Literatur Fallbeschreibungen zu finden sind, bei denen eine vollständige oder teilweise Reduktion des α 2 β 1-Integrin zu milden Blutungsneigungen und einer fehlenden Aggregation nach Kollagenstimulation führt,⁸¹ zeigten Holtkotter et al. 2002,⁸² dass α 2-defiziente Mäuse normal entwickelt sind. Sie zeigen keine Thrombozytopenie und keine verlängerte Blutungszeit. Die α 2-reduzierten Patienten mit SCA zeigen ebenfalls keine verminderten Plättchenzahlen und neigen anstatt zu Blutungen eher zu Thrombosen, was die Ergebnisse von Holtkotter et al. unterstützt.

Inwiefern die reduzierte Expression der Laminin- und Fibronectinrezeptoren bei den untersuchten thrombozytopenen Erkrankungen für eine Blutungsneigung relevant ist, kann aus der aktuellen Literatur nicht eindeutig geklärt werden. Piotrowicz und Mitarbeiter konnten bereits 1988 zeigen, dass der Integrinrezeptor α 5 β 1 die Adhäsion an Fibronectin vermittelt, und zwar im Gegensatz zum Fibrinogenrezeptor α IIb β 3 unabhängig vom Aktivierungsstatus der Thrombozyten.⁸³ Außerdem unterstützt der Fibronectinrezeptor auch die Ausbildung von Filopodien im Rahmen des Thrombozyten spreading. Die Arbeitsgruppe von Bernhard Nieswandt untersuchte 2002 die Thrombozyten von Mäusen mit einem Knockout des β 1-Integrins in Megakaryozyten.⁸⁴ Der Knockout hatte zur Folge, dass auch die Integrine α 2, α 5 und α 6 nicht mehr auf der Oberfläche der Thrombozyten nachgewiesen werden konnte. Die β 1-defizienten Mäuse zeigten normale Plättchenzahlen und Blutungszeiten. Wie Holtkotter auch zeigte, ist die Aggregation nach Stimulation mit fibrillärem Kollagen unbeeinträchtigt. Die Mäuse

wurden zusätzlich mit einem Antikörper gegen den zweiten Kollagenrezeptor GPVI behandelt, was dazu führte, dass die Thrombozyten die Aggregationsfähigkeit nach Stimulation für fibrilläres Kollagen verloren. Diese Studie zeigte auch, dass der Kollagenrezeptor $\alpha 2\beta 1$ eine eher unterstützende Rolle bei der Thrombozytenadhäsion an Kollagen einnimmt und GPVI die eigentliche essentielle Hauptrolle spielt. Auch Steve Watsons Arbeitsgruppe zeigte 2006,⁸⁵ dass der Lamininrezeptor $\alpha 6\beta 1$ nach Adhäsion an Laminin das „spreading“ der Thrombozyten, also die Ausbildung von Filopodien und Lamellopodien, durch die Aktivierung des GPVI-Rezeptors initiiert; der GPVI-Rezeptor ist aber allein nicht ausreichend für die Adhäsion an Laminin. Patienten mit einem Defizit des GPVI-Rezeptors zeigen in diesem Sinne auch eine milde Blutungsneigung. Die $\beta 1$ -Integrine spielen also insgesamt eine eher supportive als essentielle Rolle bei der Thrombusentstehung. Aufgrund dieser Ergebnisse ist eine Blutungsneigung wahrscheinlich nicht durch eine Verminderung der $\beta 1$ -Integrine zu erklären.

Es bleibt die Frage, warum bei den untersuchten Thrombozytopenien unterschiedlicher Ätiologie die Expression des Laminin- und Fibronektinrezeptors vermindert ist, während die Expression des Kollagenrezeptors normal ist. Die Rezeptoren spielen nicht nur bei der primären Hämostase eine Rolle, sondern sind auch von wichtiger Bedeutung für die Thrombopoese. Megakaryozyten kommen bei ihrer Differenzierung in den verschiedenen Knochenmarknischen hauptsächlich mit den Matrixproteinen Kollagen, Laminin und Fibronektin in Kontakt. Dabei steht die Adhäsion an Fibronektin im Vordergrund,⁸⁶ welche in den frühen Stadien der Ausreifung von VLA-4 (Integrin $\alpha 4\beta 1$) vermittelt wird. Dieser Rezeptor ist auf der Oberfläche von reifen Thrombozyten nicht mehr exprimiert. Das VLA-4 wird im späteren Stadium der Reifung von VLA-5, also dem Integrin $\alpha 5\beta 1$, ersetzt. Die Adhäsion an Laminin wird durch das VLA-6 (Integrin $\alpha 6\beta 1$) vermittelt. Die Expression des Laminin-, sowie auch des Kollagenrezeptors nimmt mit der Megakaryozyten-Differenzierung zu. Aus diesen Ergebnissen könnte man zu der Vermutung gelangen, dass die Expression der $\beta 1$ -Integrine den Megakaryozyten als Navigationssystem durch das Knochenmark dient. Dem widerspricht aber die Beobachtung von Holtkotter, dass $\beta 1$ -defiziente Mäuse nicht unter einer Thrombozytopenie leiden. Außerdem zeigen cITP-Patienten, bei denen die Thrombozytopenie durch einen vermehrten Umsatz bedingt ist, ebenfalls eine verminderte Expression des Fibronektinrezeptors. Es ist also wahrscheinlicher, dass nicht die Reduktion der $\beta 1$ -Integrine die Thrombozytopenie bedingt, sondern, dass eine Thrombozytopenie eine reduzierte Expression der $\beta 1$ -Integrine zur Folge hat und dass für die Migration der Megakaryozyten in die vaskuläre Nische auch andere Mechanismen verantwortlich sind.

Da die Relevanz der $\beta 1$ -Integrine bislang noch nicht ausreichend geklärt werden konnte, ist eine Analyse dieser Rezeptoren im Basismodul nicht unbedingt notwendig und kann bei Bedarf weggelassen werden. Um die bisherigen Beobachtungen weiter zu evaluieren

und zu quantifizieren, sollte die Analyse dieser Rezeptoren in Pilotstudien allerdings mit höheren Fallzahlen durchgeführt werden.

Grenzen bei der Beurteilung der Oberflächenrezeptoren

Aufgrund fehlender kommerziell erhältlicher primär gekoppelter Antikörper konnten einige Rezeptoren, für die aber Störungen beschrieben sind, nicht in das Basismodul integriert werden (Abb. 34). Hierzu zählt u.a. der schon im voran gegangenen Abschnitt diskutierte zweite, und eigentlich wichtigere Kollagenrezeptor GPVI.⁸⁴ Dieser sollte aufgrund seiner essentiellen Funktion bei der Thrombozytenadhäsion, sobald verfügbar, in das Basismodul integriert werden. Außerdem wird die Expression der ADP-Rezeptoren P2Y1 und P2Y12 nicht direkt analysiert. Deren Funktion wird aber durch die Stimulation der Thrombozyten mit ADP in der Funktionsdiagnostik indirekt evaluiert. Auch die Expression der Thrombinrezeptoren PAR1 und PAR4 wird nicht direkt analysiert. Indirekt wird die Funktion von PAR1 aber über die Stimulation mit TRAP6 beurteilt. Nicht primär analysiert werden außerdem der Thromboxan-Rezeptor und der adrenerge Rezeptor. Auch deren Funktion kann aber indirekt durch die Stimulation mit U46619 (Abb. 36 Modul IIc) und Epinephrin evaluiert werden.

Des Weiteren wurde auch die Expression des TPO-Rezeptors c-Mpl bisher nicht analysiert. Für diesen Rezeptor waren bereits direkt-gekoppelte Primärantikörper kommerziell erhältlich, wurden aber wegen einer nicht ausreichenden Spezifität wieder vom Markt genommen. Deshalb ist die Analyse des Rezeptors aktuell nur durch den Einsatz von unkonjugierten Primär mit Fluorophor-markierten Sekundärantikörpern möglich. Eine Reduktion von c-Mpl ist z.B. für die CAMT beschrieben, während z.B. für das TAR-Syndrom unterschiedliche Angaben in Bezug auf die Rezeptorexpression zu finden sind. Mitunter wäre es außerdem hilfreich, neben der c-Mpl-Expression auch den TPO-Spiegel im Blut zu analysieren.⁸⁷

Allgemein ist zur Beurteilung der Oberflächenrezeptoren außerdem zu sagen, dass durch die eingesetzte Methode keine Aussage über die genaue Anzahl der Rezeptoren möglich ist. Dazu wäre der Einsatz von „Beads“ mit einer definierten Anzahl spezifischer Maus-Immunglobulin-Bindungsstellen notwendig. Dies wäre mit einem höheren Kosten- und Zeitaufwand verbunden. Der

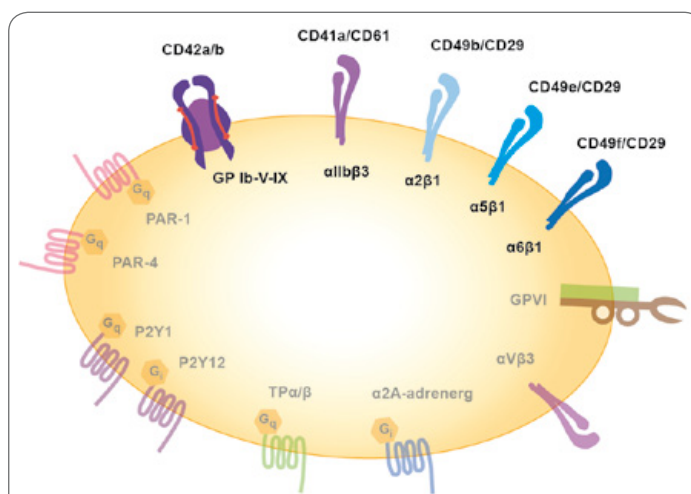


Abb. 34 Untersuchte und bisher nicht untersuchte Rezeptoren im Basismodul.

Mehrwert der genauen Bestimmung der Rezeptoranzahl ist in diesem Zusammenhang fraglich.

Funktionsanalyse - Stimulation mit ADP und TRAP6

Der Schwerpunkt des zweiten Teils des Basismoduls (Probe 3 bis 7) liegt auf der Analyse der Thrombozytenfunktion (Abb. 35). Die Stimulation der Thrombozyten mit verschiedenen Agonisten und die anschließende Analyse verschiedener Aktivierungsmarker ist eine lang bekannte Methode zur Evaluation der Thrombozytenfunktion.^{88,43} Eine klare Empfehlung, welche Agonisten in welchen Konzentrationen für die Funktionsdiagnostik verwendet werden sollen, wurde allerdings bisher nicht gegeben.^{88,43} Im Basismodul kommen die Agonisten ADP und TRAP6 zur Anwendung, diese werden in Deutschland am häufigsten zur Thrombozytenstimulation bei durchflusszytometrischen Verfahren eingesetzt.⁴² Die Verwendung von Kollagen, U46619 oder Epinephrin spielen hier eine eher untergeordnete Rolle. ADP und TRAP6 kommen jeweils in einer suboptimalen und einer optimalen Konzentration zum Einsatz. Die Titration korreliert dabei nicht immer mit den wenigen Konzentrationsangaben in der Literatur. 20 μM ADP entsprechen in der Literatur beispielsweise häufig einer optimalen Konzentration,⁶⁰ während die Titration im Rahmen dieser Arbeit schon bei 5 μM eine maximale Stimulation ergab. Durch die Verwendung einer optimalen und einer suboptimalen Konzentration lässt sich die Dynamik der Thrombozytenfunktion und damit eine Hyper- oder Hyporeaktivität der Thrombozyten abbilden. Hyporeaktive Thrombozyten konnten z.B. bei AML-Patienten gefunden werden. ADP und TRAP6 stoßen außerdem jeweils einen anderen Signalweg im Thrombozyten an; dies ist bei der Auswertung der Ergebnisse zu beachten. Folgt beispielsweise auf die Stimulation mit ADP keine adäquate Expression der Aktivierungsmarker, während die Stimulation mit TRAP6 normale Ergebnisse zeigt, so ist von einem Defekt auf Ebene der

Signalübermittlung auszugehen. Dies kann z.B. durch einen Defekt der ADP-Rezeptoren ausgelöst sein, wobei hier vor allem Defekte für den P2Y12-Rezeptor bekannt sind.⁸⁹ Die Einnahme von Clopidogrel, welches den P2Y12-Rezeptor irreversibel blockiert, würde ebenfalls zu diesem Ergebnis führen. Aus diesem Grund ist es wichtig,

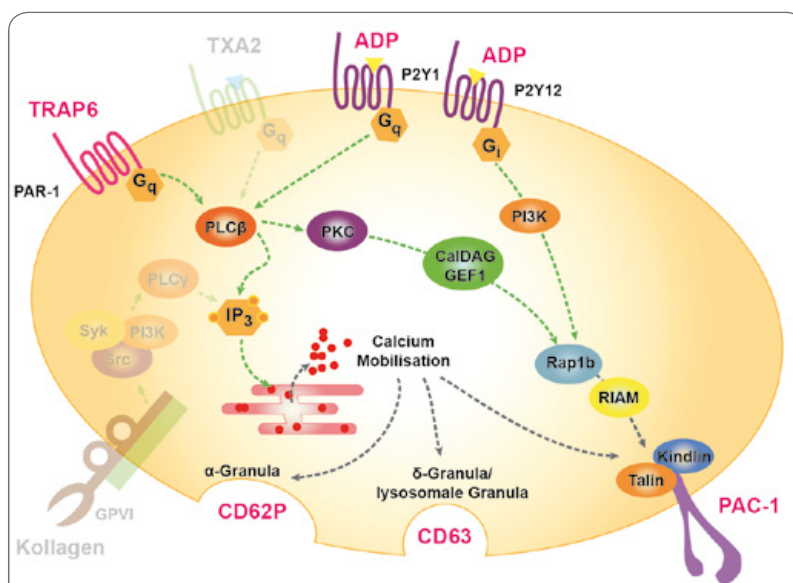


Abb. 35 Übersicht der analysierten Signalwege im Basismodul.

die genaue Medikamenten-Anamnese der Patienten zu kennen. Umgekehrt funktioniert es mit TRAP6: ist die Reaktion auf ADP normal, aber die Reaktion auf TRAP6 fehlt, so ist die Signalübermittlung gestört. Bei beiden Fällen empfiehlt sich die Analyse der Calciummobilisierung (Abb. 36 Modul IIb), um den Defekt weiter einzugrenzen (siehe Kapitel 4.2.2.). Nicht betrachtet wird im Basismodul die Reaktivität auf das Thromboxan-Analoga U46619, Epinephrin oder z.B. Kollagen.

Aussagekraft der Aktivierungsmarker

Neben der Evaluierung der Signalwege werden über die Aktivierungsmarker im Basismodul außerdem verschiedene essentielle Funktionen der Thrombozyten überprüft. Als Aktivierungsmarker kommen Antikörper gegen CD62P, CD63 und die Bindung von PAC-1 an den aktivierten Fibrinogenrezeptor zur Anwendung. Die Analyse der CD62P-Expression wird in Deutschland häufig für die durchflusszytometrische Diagnostik von α -SPD eingesetzt.⁴² Ist die Expression von CD62P nach Stimulation mit ADP und TRAP6 nicht adäquat, so sind entweder keine α -Granula vorhanden oder die Degranulierung ist gestört. Verminderte α -Granula finden sich beim Quebec-Syndrom und beim $\alpha\delta$ -SPD. Beim „Gray-platelet“-Syndrom kann die Expression von P-Selektin nach Stimulation hingegen auch normal sein.⁹⁰

CD63 ist ein lysosomales Glykoprotein und ist teilweise auch in den δ -Granula enthalten.⁹¹ Ein fehlender Nachweis von CD63 nach Stimulation ist beispielsweise mit dem Hermansky-Pudlak-Syndrom assoziiert.⁹¹ Eine Verminderung der CD63-Expression kann aber auch auf ein fehlen der δ -Granula hinweisen. In diesem Fall ist es sinnvoll, einen Mepacrin-Test (Abb. 36 Modul IIa) anzuschließen (siehe Kapitel 4.2.2.).

Als letztes wird der Aktivierungsmarker PAC-1 im Basismodul analysiert. Dieser Klonantikörper bindet an ein mit dem aktiven Integrin α IIb β 3 assoziiertes Epitop.⁹² Wird der Fibrinogenrezeptor nicht aktiviert, wie das z.B. bei der LAD-III der Fall ist, so kann dieser Aktivierungsmarker nach Thrombozytenstimulation nicht nachgewiesen werden (Abb. 21B). Es ist davon auszugehen, dass der Nachweis der PAC-1-Bindung nach Stimulation auch bei Patienten mit MG ausbleibt. Dies wurde zu einem früheren Zeitpunkt in unserem Labor auch gezeigt werden.

Weiterhin kann nach einer effektiven Aktivierung der Thrombozyten eine erhöhte Expression von CD41a auf der Oberfläche nachgewiesen werden. Fehlt der Anstieg, könnte dies ein Hinweis für eine Störung der α -Granula oder deren Ausschüttung sein. Der CD41a-Anstieg wurde in dieser Arbeit nicht primär mit analysiert. Da die Identifizierung der Thrombozyten aber auf diesem Marker beruht, wäre eine Verwendung dieses Parameters grundsätzlich möglich und in bestimmten Fällen auch sinnvoll.

Ein weiterer Marker für die Thrombozytenaktivierung ist die Analyse des GPIIb/IIIa (CD42b). Dieses GP wird im Rahmen der Thrombozytenaktivierung durch die Metalloprotease ADAMS10 und ADAMS17 „gesheddet“ und die Verminderung kann in der Durchflusszytometrie mittels Epitop-spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Gleichzeitig kann das freie Glykocalicin im Blut nachgewiesen werden.⁹³ In dieser Arbeit wurde auf diesen Marker aber verzichtet.

Einsatz weiterer Agonisten

Besteht der Verdacht auf einen Defekt der Thromboxan-Generierung, also einen sogenannten „Aspirin-like Defekt“, ist es sinnvoll, zunächst einmal die Reaktivität der Thrombozyten auf eine Stimulation mit dem Thromboxan-Analogen U46619 (Abb. 36 Modul IIc) zu testen (Abb. 21B). Ist diese normal, so ist ein Defekt des TXA₂-Rezeptors gewissermaßen ausgeschlossen. Inwiefern sich ein Defekt der Thromboxan-Synthese in der durchflusszytometrischen Funktionsanalyse der Plättchen bemerkbar macht ist bisher nicht beschrieben. In der Literatur findet man aber verschiedene Studien, in denen der Einfluss von Acetylsalicylsäure, welche die für die Thromboxan-Synthese wichtige Cyclooxygenase hemmt, auf die Thrombozytenfunktion durchflusszytometrisch untersucht wird. Gurbel et al. untersuchten die Expression der Aktivierungsmarker CD41, CD62P und die PAC-1 Bindung nach Stimulation mit Arachidonsäure oder ADP auf mit Acetylsalicylsäure inkubierten Thrombozyten.⁹⁴ Die Reaktivität auf Arachidonsäure war wie zu erwarten vermindert, die Reaktivität auf die Stimulation mit ADP war wider erwarten sogar gesteigert.⁹⁴ Chronos et al. wiederum untersuchten die Expression der Aktivierungsmarker CD62P und CD63 nach Stimulation mit ADP und Thrombin und konnten keinen Effekt von Aspirin nachweisen.⁹⁵ Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass zumindest das Basismodul auch bei Patienten, welche Aspirin einnehmen, aussagekräftig ist und dass Defekte der Thromboxan-Generierung durch eine Funktionsanalyse mit Arachidonsäure evaluiert werden können. Dieser Agonist wurde bisher noch nicht in die Methodenetablierung aufgenommen und der Einsatz muss zu gegebenen Zeitpunkt nachgeholt werden.

Des Weiteren sollte bei einer Hyporeaktivität der Thrombozyten auf die Stimulation mit ADP im Basismodul, die Expression entsprechender Rezeptoren (P2Y₁₂, P2Y₁) untersucht werden. Da vor allem für den P2Y₁₂-Rezeptor Defekte bekannt sind,⁸⁹ wäre es wünschenswert, wenigstens hierfür einen für die Durchflusszytometrie entwickelten Antikörper zur Verfügung zu haben. Dies ist aber aktuell nicht der Fall und man ist somit gezwungen auf alternative Nachweismethoden wie z.B. den ELISA auszuweichen. Mittels Durchflusszytometrie kann also aktuell nur die Verdachtsdiagnose ADP-Rezeptordefekt gestellt werden, es sei denn, man arbeitet mit sekundären Antikörpern.

Bereits diskutiert wurde die Notwendigkeit der Analyse des Kollagenrezeptors GPVI, für den aktuell auch nur für den ELISA geeignete Antikörper verfügbar sind. In diesem Zusammenhang wäre in der erweiterten Diagnostik die Untersuchung der Thrombozytenreaktivität auf Kollagen wünschenswert. Eine große Herausforderung stellt die Vielfalt der angebotenen Kollagene und Kollagenanaloge wie CRP oder Convulxin dar. Wird Kollagen zur durchflusszytometrischen Diagnostik verwendet, so fehlen in Publikationen häufig genaue Angaben welcher Typ verwendet wurde. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurden die Thrombozyten mit verschiedenen Kollagenen stimuliert, die Ergebnisse waren aber bisher unbefriedigend, sodass hier für die Zukunft noch eine Lösung gefunden werden muss.

4.2.2. Einsatz und Aussagekraft erweiterter Diagnostikmodule

Neben dem einfach und schnell durchzuführenden Basismodul wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere Diagnostikmodule etabliert, welche bei speziellen Fragestellungen zum Einsatz kommen.

Der Mepacrin-Assay (Abb. 36 Modul IIa)

Als erstes ist hier der Mepacrin-Assay zu nennen. Dieser Test wird in deutschsprachigen Laboratorien häufig zur Diagnostik von δ -SPD eingesetzt und beruht auf der Einlagerung des Fluoreszenzfarbstoffes Mepacrin in die dichten Granula.⁴² Zur Etablierung des Tests wurden die zwei in der Literatur vorhandenen Protokolle von Wall et al.⁴⁷ und Ramström et al.⁴⁶ modifiziert und ein Verfahren entwickelt, welches ermöglicht, die Degranulierung der δ -Granula als Kinetik-Kurve darzustellen (Abb. 10). Der Standardagonist TRAP6 wurde gewählt, weil dieser Agonist unter physiologischen Bedingungen zu einer maximalen Degranulierung führt. Anhand von 3 AML-Patienten konnte gezeigt werden, dass die Methode in der Lage ist, einen Defekt der δ -Granula nachzuweisen (Abb. 26). *Da CD63 ein relativ unspezifischer Marker für die δ -Granula darstellt und der Mepacrin-Assay sehr schnell und einfach auch zusätzlich zum Basismodul durchführbar ist, sollte dieser auch großzügig zur Anwendung kommen.* Auf jeden Fall sollte er bei einer Verminderung der CD63-Expression oder des Seitwärtsscatters durchgeführt werden. Da SPD zu den 5 häufigsten Diagnosen der Thrombozytopathien gehören,⁹⁶ ist die Aufnahme des Tests in das Basismodul zu erwägen.

Die Calciummobilisierung (Abb. 36 Modul IIb)

Der zweite etablierte Test ist die Analyse der intrazellulären Calciummobilisierung nach Stimulation der Thrombozyten mit einem Agonisten. Dieser Test zeigte sich als sehr zeitaufwendig, weshalb er nur bei speziellen Fragestellungen zur Anwendung kommen sollte. Durch die Messung des Calciumfluxes ist es möglich, Defekte sehr

früher Signalwege, also z.B. Rezeptordefekte, zu identifizieren. Trotzdem kommt er in der Thrombozytenfunktionsdiagnostik bisher nicht zum Einsatz. Führt beispielsweise die Stimulation der Thrombozyten mit TRAP6 im Basismodul nicht zu einer adäquaten Reaktion, so kann man durch den Nachweis einer ungestörten Calciummobilisation einen Rezeptordefekt von PAR1 ausschließen. Der Defekt tritt dann also zu einem späteren Zeitpunkt auf, z.B. bei der Generierung von Thromboxan. Bei der LAD-III konnte beispielsweise sehr gut die Ebene des Defektes in der Signaltransduktion lokalisiert werden.

4.2.3. Algorithmus zur Abklärung unklarer Blutungsneigungen mittels Durchflusszytometrie

In der Einleitung wurden unter Punkt 1.4.1 bereits einige Diagnostikalgorithmien vorgestellt. Diese Algorithmen beziehen sich auf die Abklärung unklarer Blutungsneigungen mittels verschiedenster Untersuchungsverfahren. Hier steht in den meisten Fällen die Aggregometrie im Vordergrund und die Durchflusszytometrie wird nur marginal betrachtet. Damit sind diese Algorithmen in der Neonatologie, der Pädiatrie sowie bei thrombozytopenen Patienten häufig nicht anwendbar. Auch in Publikationen, welche sich speziell mit der Thrombozytenfunktionsdiagnostik beschäftigen, ist nur eine Aufzählung der verschiedenen diagnostischen Möglichkeiten zu finden.⁸⁸ Keine der Publikationen setzt diese Möglichkeiten im Sinne eines Algorithmus zusammen. Die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Module, sowie auch zukünftig noch zu entwickelnde Module wurden in Abbildung 36 zu einem Algorithmus, der sich ausschließlich auf die durchflusszytometrische Diagnostik bezieht, zusammengesetzt.

Dokumentation und Auswertung

Der vorgeschlagene Algorithmus, soll in Zukunft nicht nur einen klaren Weg in der durchflusszytometrischen Diagnostik vorgeben, sondern auch zur Orientierung bei der Interpretation der Ergebnisse dienen. Bisher zeigte die Praxis, dass die Analyse von Patienten mit unklaren Blutungsneigungen nicht immer ein eindeutiges Ergebnis lieferte. Um so wichtiger ist es, die Ergebnisse im Zusammenhang mit der Klinik der jeweiligen Patienten und deren Angehörigen zu interpretieren. Um einen guten Überblick über die Anamnese und die klinischen Auffälligkeiten des Patienten zu bekommen, soll in Zukunft der in Abbildung 37 vorgestellte Anforderungsschein durch den behandelnden Arzt ausgefüllt werden. In diesem Anforderungsschein werden nahezu alle Daten, die für die Interpretation der Ergebnisse notwendig sind, erfasst. Da die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Thrombozytenfunktionsdiagnostik nicht immer eindeutig sind und die Beurteilung eine genaue Kenntnis der biochemischen Prozesse der Thrombozyten voraussetzt, bleibt die Auswertung der Ergebnisse letztendlich weiterhin dem Experten vorbehalten. Um so wichtiger ist es für die Befundübermittlung an den

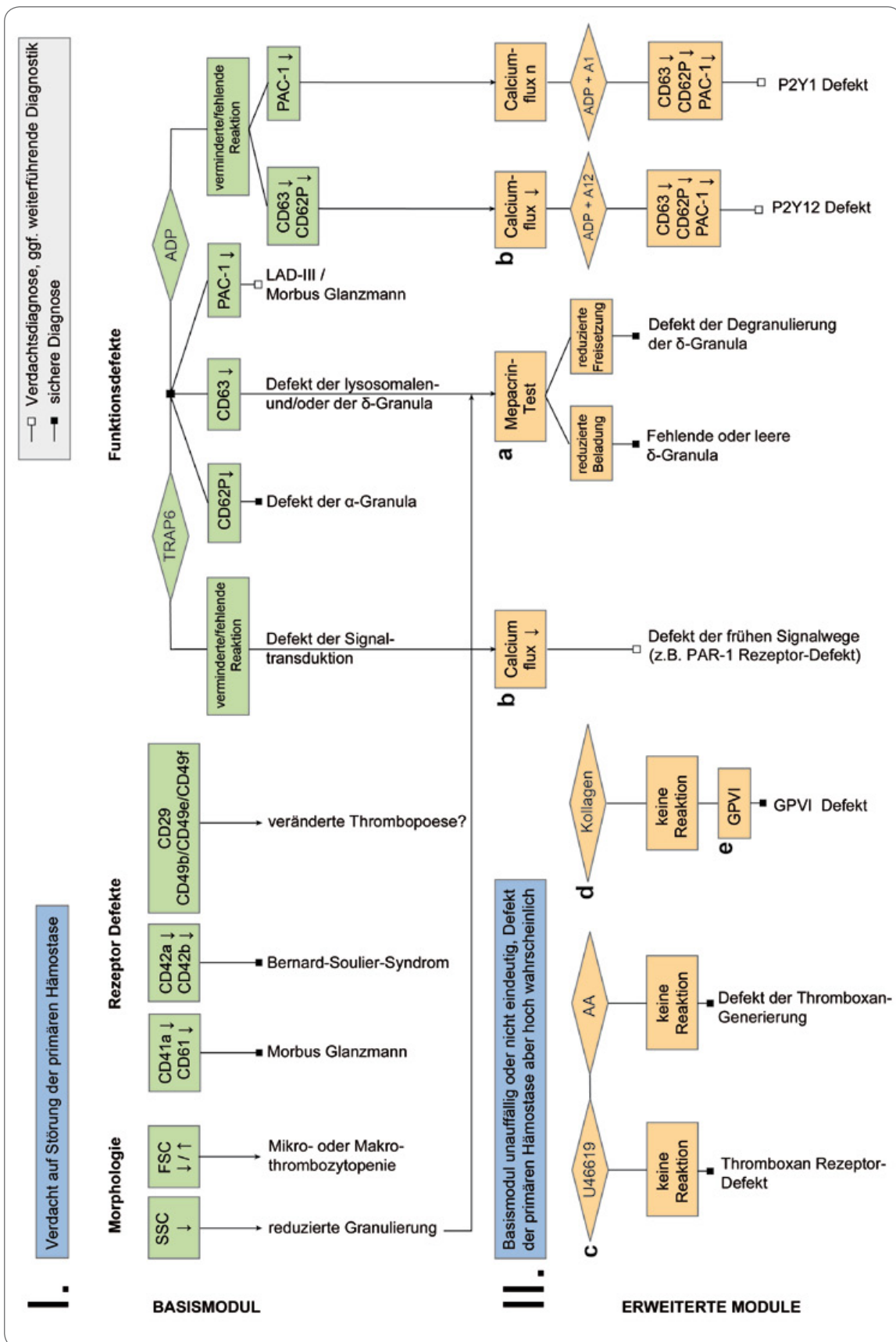


Abb. 36 Algorithmus zur durchflusszytometrischen Abklärung bei Verdacht auf eine Störung der primären Hämostase. Details siehe Text. AA Arachidonsäure, A1 P2Y1-Antagonist, A12 P2Y12-Antagonist. In der erweiterten Diagnostik kommen außerdem andere Agonisten wie Epinephrin und Serotonin zum Einsatz, auf deren Darstellung hier verzichtet wurde.

Anforderung zur durchflusszytometrischen Thrombozytenfunktionsanalyse bei unklarer Thrombozytopenie oder Blutungsneigung

Angaben zum Patienten

Name, Vorname: _____

Geburtsdatum: _____

Geschlecht: m w unbekannt

bei Neugeborenen: reif geboren Frühgeborenes der ____ SSW SGA

Abnahmedatum und -zeit: _____, _____ Uhr

Blutentnahmebedingung: problemlos ohne Stauung mit kurzer Stauung problematisch mit langer Stauung

Vorerkrankungen: _____

Medikamente: _____

Aktuelle Laborparameter: Thrombozytenzahl _____ /nl nicht transfundiert letzte Transfusion am _____ MPV _____ fl

IPF _____ % Vorhandensein von Riesenthrombozyten Vermehrt Plättchenaggregate im Blutausstrich

Blutungsanamnese: keine Blutungszeichen Pelechien und Hämatome milde Schleimhautblutungen wie leichtes Nasenbluten Blutungskomplikationen perioperativ exzessive Schleimhautblutungen, z.B. Menorrhagien lebensbedrohliche Blutungen, Hirnblutungen

Familienanamnese: Ethnität: _____ Eltern konsanguin

Relevante Erkrankungen: _____ Thrombozytopenie bekannt bei: _____ Blutungsneigung bekannt bei: _____

Relevante Vorfunde: _____ (vgl. in Kopie mitschicken)

Bemerkungen/Fragestellung: _____

Angaben zur Gesunderkennung

Alter: _____ Jahre _____ Monate _____ Tage

Geschlecht: _____ m _____ w _____ unbekannt

Abnahmedatum und -zeit: _____, _____ Uhr

Blutentnahmebedingung: problemlos ohne Stauung mit kurzer Stauung problematisch mit langer Stauung

Absender (an diese Adresse wird der Befund geschickt!)

Behandelnder Arzt: _____

Station: _____

Adresse: _____

Telefonnummer: _____

e-Mail: _____

Einverständniserklärung

Hiermit erkläre ich mich damit einverstanden, dass die Analyseergebnisse zum Zwecke der Methodenevaluierung, zur Erhebung epidemiologischer Daten und zur Erforschung neuer Ursachen für unklare Blutungsneigungen und Thrombozytenfunktionsstörungen in anonymisierter Form gespeichert und verarbeitet werden dürfen. Außerdem dürfen anhand des eingesendeten Materials auch Analysen zum Zwecke der Erforschung neuer Krankheitsursachen durchgeführt werden.

Unterschrift des Patienten _____ Unterschrift des Erziehungsberechtigten _____

Abb. 37 Anforderungsschein für die Thrombozytenfunktionsdiagnostik.

anfordernden Arzt, eine geeignete Form der Darstellung und Interpretation zu finden. Aus einigen Gesprächen mit Ärzten unterschiedlicher Fachrichtungen ging hervor, dass das Wissen um Thrombozytopathien und deren Diagnostik im Klinikalltag meist gering ist. Deswegen ist es notwendig, die Befunde nicht nur in reiner Zahlenform, sondern zusätzlich auch immer ausformuliert zu übermitteln. Zudem sollte der Befund neben der Diagnose oder Verdachtsdiagnose auch Vorschläge für das weitere diagnostische Vorgehen oder die Therapie beinhalten.

4.3. Ausblick

In Zukunft sollten durch die Analyse einer größeren Gesunderpopulation Normwerte für Erwachsene, Kinder und Neugeborene definiert werden, um so physiologische Ergebnisse genauer von pathologischen Ergebnissen abgrenzen zu können. Die Sensitivität und die Spezifität der Module sollte weiterhin durch die Analyse von Patienten mit bekannten Thrombozytopathien wie z.B. dem MG, aber auch mit unklaren Thrombozytopathien noch besser evaluiert werden. Interessant wäre in diesem Sinne auch, inwiefern die Durchflusszytometrie die Aggregometrie zumindest teilweise ersetzen kann. Dabei ist zu beachten, dass bei der Durchflusszytometrie der Fokus auf die Analyse spezifischer biochemischer Meilensteine während der Thrombozytenaktivierung gelegt wird, während die Aggregometrie die reale Aggregatbildung der Thrombozyten betrachtet.

Außerdem sollten die erweiterten Diagnostikmodule weiter ausgebaut und essentielle Antikörper gegen GPVI sobald verfügbar integriert werden.

Durch die Etablierung des Basismoduls und verschiedener erweiterter Module für die durchflusszytometrische Analyse der Thrombozytenfunktion ist es möglich, dass in unserem Labor Blut von Patienten mit unklaren Thrombozytopenien und Thrombozytopathien in Zukunft weitgehend standardisiert analysiert werden kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden derzeit auch bei der Erstellung der Leitlinie „Diagnostik bei Thrombozytopathien“ der Ständigen Kommission Pädiatrie der GTH berücksichtigt. Durch eine Vereinheitlichung der durchflusszytometrischen Diagnostik auf diesem Gebiet soll so in Zukunft auch der Vergleich von Ergebnissen unterschiedlicher Laboratorien erleichtert werden. Es wäre denkbar, dass das einfach gehaltene Basismodul auch in weniger spezialisierten Laboratorien zur Anwendung kommt und so der Zugang zu einer guten Diagnostik bei Verdacht auf Thrombozytopathie erleichtert wird.

5. Zusammenfassung

Thrombozyten spielen die wichtigste Rolle beim Wundverschluss im Rahmen der primären Hämostase. Bei einer Verletzung des Blutgefäßes adhären sie an das Subendothel, bilden durch Aggregation einen Thrombus und führen so zum Verschluss des verletzten Gefäßes. Patienten mit einer Störung der primären Hämostase leiden häufig unter Petechien, Hämatomen, Epistaxis, Menorrhagien oder können durch Blutungskomplikationen bei chirurgischen Interventionen auffällig werden. Die Störung der primären Hämostase kann durch eine verminderte Thrombozytenzahl (Thrombozytopenie) oder durch einen Defekt der Thrombozytenfunktion (Thrombozytopathie) bedingt sein. In diesem Zusammenhang sind zahlreiche Krankheitsentitäten bekannt. Zur Abklärung einer gestörten primären Hämostase stehen verschiedene Diagnostikinstrumente zur Verfügung. Trotzdem ist der Anteil unklarer Blutungsdiathesen hoch. Neben dem klassischen Blutausschlag sowie der Bestimmung von Thrombozytenzahl und MPV, gilt die Aggregometrie und der PFA-100® als Goldstandard. Bei Patienten mit Thrombozytopenien, Kindern und Neugeborenen steht jedoch oft nicht genügend Material zur Verfügung um eine Aggregometrie durchzuführen. Für durchflusszytometrische Analysen wird nur wenig Blut benötigt, trotzdem nimmt diese Methode bisher in der Praxis einen untergeordneten Stellenwert ein.

In der vorliegenden Arbeit sollten die Vorteile der Durchflusszytometrie genutzt werden und ein aus mehreren Modulen bestehender Diagnostikalgorithmus entwickelt werden. Hierzu wurden im Labor bereits vorhandene Protokolle für die basale Analyse der Thrombozytenfunktion im 2-Farben-System, auf ein modernes Multi-Farben-System umgestellt. Durch die simultane Messung von 4-Farben konnten im Basismodul die wichtigsten Rezeptordefekte, wie der Morbus Glanzmann (CD41a/CD61) und das Bernard-Soulier-Syndrom (CD42a/b), sowie häufige Storage-Pool-Defekte mit geringen Zeit- und Materialaufwand diagnostiziert werden. Außerdem wurden auch die bisher wenig untersuchten β 1-Integrine (CD29/CD49b,e,f) im Basismodul betrachtet. Zur Stimulation der Thrombozyten wurden im Basismodul die Agonisten ADP und TRAP6 verwendet und die Reaktivität der Thrombozyten anhand der Aktivierungsmarker CD62P, CD63 und der Bindung von PAC-1 evaluiert. Für die erweiterte Diagnostik wurden die Analyse der Calciummobilisierung, zur Beurteilung der Funktionalität früher Signalwege wie z.B. die Signaltransduktion über Rezeptoren, sowie der Mepacrin-Assay, zur Beurteilung der δ -Granula, etabliert. Die Funktionalität der Methode wurde anhand von Gesundspendern, als auch anhand verschiedener Patienten mit Störungen der primären Hämostase evaluiert. Durch die Analyse der Gesundspender konnten vorläufige Normwerte gebildet werden. In den Patientengruppen konnten mit den Methoden bereits bekannte Thrombozytopathien bestätigt werden und neue Defekte nachgewiesen

werden. Außerdem zeigte sich eine generelle Verminderung des Fibronectin- und Lamininrezeptors bei allen untersuchten Patienten mit Thrombozytopenie.

Durch die Etablierung der durchflusszytometrischen Thrombozytenfunktionsanalyse im Multi-Farben-System ist es nun möglich, Blut von Patienten mit unklaren Blutungsdiathesen und Thrombozytopenien in einem standardisierten Rahmen zu analysieren. Das schnell und einfach durchzuführende Basismodul kann je nach Bedarf durch verschiedene Module ergänzt werden. In Zukunft soll so die Zahl der unklaren Blutungsdiathesen verringert werden. Weiterhin soll Patienten mit Thrombozytopenien und Neugeborenen eine hinreichende Diagnostik möglich gemacht werden, um auch hier schneller zu einer gesicherten Diagnose zu kommen.

6. Abstract

Platelets are the main actors in primary hemostasis. In injured vessels, platelets adhere to newly exposed subendothelial matrix proteins and form wound sealing aggregates. Patients with defects in primary hemostasis suffer from petechia, hematoma, epistaxis, menorrhagia or show overall prolonged bleeding tendencies especially after surgery. These defects are typically caused by reduced platelet numbers (thrombocytopenia) or platelet function defects (thrombocytopathy). In this context many etiologies are known and the availability of several distinct diagnostic tools help to find the underlying cause of disease. However, patients often present with an unclear bleeding diathesis. Gold standard in diagnostics are among blood smear analysis and platelet number determination the measurement of the mean platelet volume (MPV), aggregometry and platelet function tests like PFA-100®. In case of thrombocytopenic patients, infants and neonates material is too limited to perform aggregometry. Flow cytometry, in contrast, requires only small amounts of blood, but this method still plays a secondary role.

In this thesis the advantages of multi-color flow cytometry have been exploited to develop a multiple module diagnostic algorithm for thrombocytopenia and thrombocytopathy. Due to the simultaneous measurement of four fluorophores in the basic module we are able to evaluate the most significant platelet defects like Morbus Glanzmann (CD41a/CD61), Bernard-Soulier-Syndrom (CD42a/b) and frequent Storage Pool Diseases in a material- and time-saving manner. Additionally, less well characterized β 1-integrins (CD29/CD49b, e, f) were analyzed. Platelet reactivity was measured in response to agonists ADP and TRAP6 by neo-expression of activation markers CD62P, CD63 and binding of PAC-1 antibody to the high affinity fibrinogen receptor. For advanced diagnostics several additional modules were implemented: (i) early signal transduction by analysis of intracellular calcium concentration, (ii) a time-resolved mepacrine assay for the evaluation of δ -granules release and (iii) a module to measure additional agonists like U46619 or collagen. The methods was validated by analysis of blood withdrawn from healthy controls and patients with known defects of primary hemostasis. Preliminary standard values for all parameters were determined by analysis of blood withdrawn from healthy donors. Both already or newly diagnosed defects were examined and confirmed by multi-color-analysis. Unexpectedly, a general reduction of fibronectin- and laminin receptors in nearly all thrombocytopenic patients was found. By establishing the multi-color-flow-cytometry-analysis for platelet function tests we are now able to analyze minimal amounts of blood from patients suffering from bleeding diathesis and thrombocytopenia in a standardized manner. If needed the fast and easy basic module can be combined with the advanced modules. We hope that the number of patients with unclear bleeding diathesis can be reduced to some extent in the foreseeable future by this approach.

7. Literaturverzeichnis

1. White JG. Platelet structure. In: Alan DM and Md. Platelets (Second Edition). Burlington: Academic Press, 2007:45-73.
2. Hartwig JH. The platelet cytoskeleton. In: Alan DM and Md. Platelets (Second Edition). Burlington: Academic Press, 2007:75-97.
3. Knight CJ. Antiplatelet treatment in stable coronary artery disease. *Heart* 2003;89:1273-8.
4. Kaushansky K. Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. *Blood* 1995;86:419-31.
5. Patel SR, Hartwig JH and Italiano JE, Jr. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest* 2005;115:3348-54.
6. Schulze H. Gegenwärtige Modelle der Thrombozytopoese. *Der Pathologe* 2010;31:183-7.
7. George JN. Platelets. *Lancet* 2000;355:1531-9.
8. Clemetson KJ and Clemetson JM. Platelet receptors. In: Alan DM and Md. Platelets (Second Edition). Burlington: Academic Press, 2007:117-43.
9. Kasirer-Friede A, Kahn ML and Shattil SJ. Platelet integrins and immunoreceptors. *Immunol Rev* 2007;218:247-64.
10. King SM and Reed GL. Development of platelet secretory granules. *Semin Cell Dev Biol* 2002;13:293-302.
11. Wei AH, Schoenwaelder SM, Andrews RK and Jackson SP. New insights into the haemostatic function of platelets. *Br J Haematol* 2009;147:415-30.
12. Lopez JA, Andrews RK, Afshar-Kharghan V and Berndt MC. Bernard-Soulier syndrome. *Blood* 1998;91:4397-418.
13. George JN, Caen JP and Nurden AT. Glanzmann's thrombasthenia: the spectrum of clinical disease. *Blood* 1990;75:1383-95.
14. Othman M. Platelet-type Von Willebrand disease: Three decades in the life of a rare bleeding disorder. *Blood Rev* 2011;25:147-53.
15. Poon MC, Rand ML and Jackson SC. 2B or not to be - the 45-year saga of the Montreal Platelet Syndrome. *Thromb Haemost* 2010;104:903-10.

16. Sandrock K and Zieger B. Current Strategies in Diagnosis of Inherited Storage Pool Defects. *Transfus Med Hemother* 2010;37:248-58.
17. Jurk K, Schulz AS, Kehrel BE, et al. Novel integrin-dependent platelet malfunction in siblings with leukocyte adhesion deficiency-III (LAD-III) caused by a point mutation in FERMT3. *Thromb Haemost* 2010;103:1053-64.
18. Mory A, Feigelson SW, Yarali N, et al. Kindlin-3: a new gene involved in the pathogenesis of LAD-III. *Blood* 2008;112:2591.
19. Moser M, Nieswandt B, Ussar S, Pozgajova M and Fassler R. Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nat Med* 2008;14:325-30.
20. Koscielny J, Ziemer S, Radtke H, et al. A practical concept for preoperative identification of patients with impaired primary hemostasis. *Clin Appl Thromb Hemost* 2004;10:195-204.
21. Letestu R, Vitrat N, Masse A, et al. Existence of a differentiation blockage at the stage of a megakaryocyte precursor in the thrombocytopenia and absent radii (TAR) syndrome. *Blood* 2000;95:1633-41.
22. Fiedler J, Strauss G, Wannack M, et al. Two patterns of thrombopoietin signaling suggest no coupling between platelet production and thrombopoietin reactivity in thrombocytopenia-absent radii syndrome. *Haematologica* 2011. DOI10.3324/haematol.2011.049619
23. Germeshausen M, Schulze H, Gaudig A, et al. Congenital amegakaryocytic thrombocytopenia (CAMT) - a defect of the thrombopoietin receptor c-Mpl. *Klin Padiatr* 2001;213:155-61.
24. Ochs HD. The Wiskott-Aldrich syndrome. *Springer Semin Immunopathol* 1998;19:435-58.
25. Matzdorff A, Giagounidis A, Greinacher A, et al. [Diagnosis and therapy of autoimmune thrombocytopenia. Recommendations of a joint Expert Group of DGHO, DGTI, DTH]. *Onkologie* 2010;33 Suppl 3:2-20.
26. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, 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;113:2386-93.
27. Kelton JG. The pathophysiology of heparin-induced thrombocytopenia: biological basis for treatment. *Chest* 2005;127:9S-20S.

28. Schneppenheim R, Kremer Hovinga JA, Becker T, et al. A common origin of the 4143insA ADAMTS13 mutation. *Thromb Haemost* 2006;96:3-6.
29. Schambeck CM. Blutungsneigung: Diagnostische Strategie zur Abklärung einer Thrombozytendysfunktion. Consensus-Papier der DGKL-Arbeitsgruppe „Hämostaseologische Labordiagnostik“. *LaboratoriumsMedizin* 2004;28:453-62.
30. Bizzaro N. EDTA-dependent pseudothrombocytopenia: a clinical and epidemiological study of 112 cases, with 10-year follow-up. *Am J Hematol* 1995;50:103-9.
31. Briggs C, Kunka S, Hart D, Oguni S and Machin SJ. Assessment of an immature platelet fraction (IPF) in peripheral thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2004;126:93-9.
32. Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, et al. Description of an in vitro platelet function analyzer--PFA-100. *Semin Thromb Hemost* 1995;21 Suppl 2:106-12.
33. Favaloro EJ, Lippi G and Franchini M. Contemporary platelet function testing. *Clin Chem Lab Med* 2010;48:579-98.
34. Cattaneo M. Light transmission aggregometry and ATP release for the diagnostic assessment of platelet function. *Semin Thromb Hemost* 2009;35:158-67.
35. Michelson AD. Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2006;35:67-82.
36. Shattil SJ, Cunningham M and Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood* 1987;70:307-15.
37. Mani H, Wolf Z and Lindhoff-Last E. [Progress in diagnostic evaluation of platelet function disorders]. *Hamostaseologie* 2010;30:217-29.
38. Kottke-Marchant K and Duncan A. Antithrombin deficiency: issues in laboratory diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2002;126:1326-36.
39. Balduini CL, Cattaneo M, Fabris F, et al. Inherited thrombocytopenias: a proposed diagnostic algorithm from the Italian Gruppo di Studio delle Piastrine. *Haematologica* 2003;88:582-92.
40. Bolton-Maggs PH, Chalmers EA, Collins PW, et al. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO. *Br J Haematol* 2006;135:603-33.
41. Israels SJ, Kahr WH, Blanchette VS, et al. Platelet disorders in children: A diagnostic approach. *Pediatr Blood Cancer* 2011;56:975-83.

42. Streif W, Oliveri M, Martin O, et al. Testing for inherited platelet defects in clinical laboratories in Germany, Austria and Switzerland. Results of a survey carried out by the Permanent Paediatric Group of the German Thrombosis and Haemostasis Research Society (GTH). *Platelets* 2010;21:470-8.
43. Schmitz G, Rothe G, Ruf A, et al. European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. *Thromb Haemost* 1998;79:885-96.
44. Noris P, Pecci A, Di Bari F, et al. Application of a diagnostic algorithm for inherited thrombocytopenias to 46 consecutive patients. *Haematologica* 2004;89:1219-25.
45. Quiroga T, Goycoolea M, Panes O, et al. High prevalence of bleeders of unknown cause among patients with inherited mucocutaneous bleeding. A prospective study of 280 patients and 299 controls. *Haematologica* 2007;92:357-65.
46. Ramström AS, Fagerberg IH and Lindahl TL. A flow cytometric assay for the study of dense granule storage and release in human platelets. *Platelets* 1999;10:153-8.
47. Wall JE, Buijs-Wilts M, Arnold JT, et al. A flow cytometric assay using mepacrine for study of uptake and release of platelet dense granule contents. *Br J Haematol* 1995;89:380-5.
48. Monteiro MD, Gonçalves MJ, Sansonetty F and O'Connor JE. Flow cytometric analysis of calcium mobilization in whole-blood platelets. *Curr Protoc Cytom* 2003;Chapter 9:Unit 9.20.
49. Ochs HD. The Wiskott-Aldrich syndrome. *Semin Hematol* 1998;35:332-45.
50. Semple JW, Siminovitch KA, Mody M, et al. Flow cytometric analysis of platelets from children with the Wiskott-Aldrich syndrome reveals defects in platelet development, activation and structure. *Br J Haematol* 1997;97:747-54.
51. Yamaguchi K, Ariga T, Yamada M, et al. Mixed chimera status of 12 patients with Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) after hematopoietic stem cell transplantation: evaluation by flow cytometric analysis of intracellular WAS protein expression. *Blood* 2002;100:1208-14.
52. Klopocki E, Schulze H, Strauss G, et al. Complex inheritance pattern resembling autosomal recessive inheritance involving a microdeletion in thrombocytopenia-absent radius syndrome. *Am J Hum Genet* 2007;80:232-40.
53. Loffredo G, Baronciani L, Noris P, et al. von Willebrand disease type 2B must be always considered in the differential diagnosis of genetic thrombocytopenias with giant platelets. *Platelets* 2006;17:149-52.

54. Moffat KA, Ledford-Kraemer MR, Nichols WL and Hayward CP. Variability in clinical laboratory practice in testing for disorders of platelet function: results of two surveys of the North American Specialized Coagulation Laboratory Association. *Thromb Haemost* 2005;93:549-53.
55. Jennings I, Woods TA, Kitchen S and Walker ID. Platelet function testing: practice among UK National External Quality Assessment Scheme for Blood Coagulation participants, 2006. *J Clin Pathol* 2008;61:950-4.
56. Baumgarth N and Roederer M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J Immunol Methods* 2000;243:77-97.
57. Maecker HT, Frey T, Nomura LE and Trotter J. Selecting fluorochrome conjugates for maximum sensitivity. *Cytometry A* 2004;62:169-73.
58. Roederer M. Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry* 2001;45:194-205.
59. Herzenberg LA, Tung J, Moore WA and Parks DR. Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nat Immunol* 2006;7:681-5.
60. Krueger LA, Barnard MR, Frelinger AL, Furman MI and Michelson AD. Immunophenotypic analysis of platelets. *Curr Protoc Cytom* 2002;Chapter 6:Unit 6.10.
61. Linden MD, Frelinger AL, 3rd, Barnard MR, et al. Application of flow cytometry to platelet disorders. *Semin Thromb Hemost* 2004;30:501-11.
62. Hagberg IA and Lyberg T. Blood platelet activation evaluated by flow cytometry: optimised methods for clinical studies. *Platelets* 2000;11:137-50.
63. Mody M, Lazarus AH, Semple JW and Freedman J. Preanalytical requirements for flow cytometric evaluation of platelet activation: choice of anticoagulant. *Transfus Med* 1999;9:147-54.
64. Cowan DH, Graham RC and Baunach D. The platelet defect in leukemia. Platelet ultrastructure, adenine nucleotide metabolism, and the release reaction. *J Clin Invest* 1975;56:188-200.
65. Leino EB, Hoffmann MH, Kjaersgaard E and Johnsen HE. Multiple platelet defects identified by flow cytometry at diagnosis in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2004;127:76-84.

66. Creutzig U, Ritter J, Riehm H, et al. Improved treatment results in childhood acute myelogenous leukemia: a report of the German cooperative study AML-BFM-78. *Blood* 1985;65:298-304.
67. Jones ME and Saleem A. Acute promyelocytic leukemia. A review of literature. *Am J Med* 1978;65:673-7.
68. Day HJ and Holmsen H. Platelet adenine nucleotide „storage pool deficiency“ in thrombocytopenic absent radii syndrome. *Jama* 1972;221:1053-4.
69. Wun T, Paglieroni T, Tablin F, et al. Platelet activation and platelet-erythrocyte aggregates in patients with sickle cell anemia. *J Lab Clin Med* 1997;129:507-16.
70. Kaito K, Otsubo H, Usui N, et al. Platelet size deviation width, platelet large cell ratio, and mean platelet volume have sufficient sensitivity and specificity in the diagnosis of immune thrombocytopenia. *Br J Haematol* 2005;128:698-702.
71. Michelson AD. Platelet function in the newborn. *Semin Thromb Hemost* 1998;24:507-12.
72. Israels SJ, Rand ML and Michelson AD. Neonatal platelet function. *Semin Thromb Hemost* 2003;29:363-72.
73. Shapiro HM. Parameters and Probes. *Practical Flow Cytometry*. John Wiley & Sons, Inc., 2005:273-410.
74. Nurden AT, Didry D, Kieffer N and McEver RP. Residual amounts of glycoproteins IIb and IIIa may be present in the platelets of most patients with Glanzmann's thrombasthenia. *Blood* 1985;65:1021-4.
75. Nurden AT. Glanzmann thrombasthenia. *Orphanet J Rare Dis* 2006;1:10.
76. Streif W, Olivieri M, Weickardt S, Eberl W and Knoefler R. Thromkid - a Competence Network for Functional Platelet Abnormalities. *Transfus Medicine* 2007;34:56-62.
77. Jennings LK, Ashmun RA, Wang WC and Dockter ME. Analysis of human platelet glycoproteins IIb-IIIa and Glanzmann's thrombasthenia in whole blood by flow cytometry. *Blood* 1986;68:173-9.
78. Coller BS, Seligsohn U, Zivelin A, et al. Immunologic and biochemical characterization of homozygous and heterozygous Glanzmann thrombasthenia in the Iraqi-Jewish and Arab populations of Israel: comparison of techniques for carrier detection. *Br J Haematol* 1986;62:723-35.
79. Lanza F. Bernard-Soulier syndrome (hemorrhagiparous thrombocytic dystrophy). *Orphanet J Rare Dis* 2006;1:46.

80. Beltrame MP, Malvezzi M, Zanis J and Pasquini R. Flow cytometry as a tool in the diagnosis of Bernard-Soulier syndrome in Brazilian patients. *Platelets* 2009;20: 229-34.
81. Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Houdijk WP and Sixma JJ. Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. *Nature* 1985;318:470-2.
82. Holtkotter O, Nieswandt B, Smyth N, et al. Integrin alpha 2-deficient mice develop normally, are fertile, but display partially defective platelet interaction with collagen. *J Biol Chem* 2002;277:10789-94.
83. Piotrowicz RS, Orzechowski RP, Nugent DJ, Yamada KY and Kunicki TJ. Glycoprotein Ic-IIa functions as an activation-independent fibronectin receptor on human platelets. *J Cell Biol* 1988;106:1359-64.
84. Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, et al. Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *Embo J* 2001;20:2120-30.
85. Inoue O, Suzuki-Inoue K, McCarty OJ, et al. Laminin stimulates spreading of platelets through integrin alpha6beta1-dependent activation of GPVI. *Blood* 2006;107: 1405-12.
86. Mossuz P, Schweitzer A, Molla A and Berthier R. Expression and function of receptors for extracellular matrix molecules in the differentiation of human megakaryocytes in vitro. *Br J Haematol* 1997;98:819-27.
87. Dame C. Thrombopoietin in thrombocytopenias of childhood. *Semin Thromb Hemost* 2001;27:215-28.
88. Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 1996;87: 4925-36.
89. Cattaneo M. Bleeding manifestations of congenital and drug-induced defects of the platelet P2Y12 receptor for adenosine diphosphate. *Thromb Haemost* 2011;105 Suppl 1:S67-74.
90. Hayward CP. Inherited disorders of platelet alpha-granules. *Platelets* 1997;8: 197-209.
91. Nishibori M, Cham B, McNicol A, et al. The protein CD63 is in platelet dense granules, is deficient in a patient with Hermansky-Pudlak syndrome, and appears identical to granulophysin. *J Clin Invest* 1993;91:1775-82.

92. Shattil SJ, Hoxie JA, Cunningham M and Brass LF. Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *J Biol Chem* 1985;260: 11107-14.
93. Gardiner EE, Karunakaran D, Shen Y, et al. Controlled shedding of platelet glycoprotein (GP)VI and GPIb-IX-V by ADAM family metalloproteinases. *J Thromb Haemost* 2007;5:1530-7.
94. Gurbel PA, Bliden KP, DiChiara J, et al. Evaluation of dose-related effects of aspirin on platelet function: results from the Aspirin-Induced Platelet Effect (ASPECT) study. *Circulation* 2007;115:3156-64.
95. Chronos NA, Wilson DJ, Janes SL, et al. Aspirin does not affect the flow cytometric detection of fibrinogen binding to, or release of alpha-granules or lysosomes from, human platelets. *Clin Sci (Lond)* 1994;87:575-80.
96. Knofler R, Olivieri M, Weickardt S, Eberl W and Streif W. First results of the THROMKID study: a quality project for the registration of children und adolescents with hereditary platelet function defects in Germany, Austria, and Switzerland. *Hamostaseologie* 2007;27:48-53

Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Katja Henning, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Entwicklung einer erweiterten Diagnostik von Thrombozytopenien und Thrombozytopathien mittels Multi-Farben-Durchflusszytometrie selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Ort, Datum

Unterschrift

Curriculum Vitae

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

Publikationen

Fiedler J, Strauss G, Wannack M, Schwiebert S, Seidel K, Henning K, Klopocki E, Schmugge M, Gaedicke G and Schulze H. Two patterns of thrombopoietin signaling suggest no coupling between platelet production and thrombopoietin reactivity in thrombocytopenia-absent radii syndrome. *Haematologica* 2011. DOI10.3324/haematol.2011.049619.

Henning K, Fiedler J, Strauss G, Holzhauer S, Schulze H. Altered platelet surface receptor expression in several thrombocytopenias identified by standardized 4-color-flow cytometry. Manuscript in preparation.