

Aus dem  
Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin  
der Universität Tübingen

**Inaugural-Dissertation**  
**Untersuchungen zu Signaltransduktionsdefekten bei  
thrombozytären Erkrankungen**

**zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Wagner, Miriam Kristin**

**2025**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Bakchoul

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. S. Hörber

Tag der Disputation: 15.10.2024

Für meine Familie

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis:	I
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Physiologie der Thrombozyten	1
1.1.1 Aufbau der Thrombozyten	1
1.1.2 Thrombozytenaktivierung, -adhäsion und -aggregation	5
1.1.3 Verschiedene Signalwege in Thrombozyten	7
1.1.4 Der AKT- Signalweg	12
1.2 Thrombozytäre Erkrankungen	17
1.2.1 Angeborene Thrombozytopathien	17
1.2.2 Angeborene Thrombozytopenien	26
1.2.3 Erworbene Thrombozytopathien	29
1.2.4 Erworbene Thrombozytopenien	31
1.3 Die Rolle des AKT-Signalings in Thrombozytenerkrankungen	39
1.4 Diagnostik von Thrombozytenfunktionsstörungen	41
1.5 Ziele der Arbeit und Ausblick	46
2 Material und Methoden	50
2.1 Materialien und Geräte	50
2.1.1 Verwendete Chemikalien	50
2.1.2 Verwendete Antikörper	51
2.1.3 Verwendete Labormaterialien	52
2.1.4 Verwendete Puffer und Lösungen	53
2.1.5 Verwendete Geräte	56
2.2 Methoden	57
2.2.1 Patienten und Spender	57
2.2.2 Durchflusszytometrische Analysen- Grundlagen der Durchflusszytometrie	58
2.2.3 Herstellung von PRP	59

2.2.4	Verdünnung der Agonisten _____	60
2.2.5	Inhibierung der AKT-Kinase _____	60
2.2.6	Thrombozytenaktivierung und CD62P-Messung _____	60
2.2.7	Analyse CD62P-Messung im FACS-Protokoll _____	63
2.2.8	pAKT/AKT-Messungen _____	65
2.2.9	Analyse der pAKT/AKT-Messungen _____	66
2.2.10	IgG-Isolation _____	68
2.2.11	Inhibierung des Fcγ-Rezeptors II _____	69
2.2.12	Messung der Aktivierung durch HIT-IgG _____	69
2.2.13	Analyse der Messung der Aktivierung durch HIT-IgG _____	70
2.2.14	Standardmethoden für Methodenvergleich _____	75
2.3	Statistische Analysen _____	80
2.4	Ethische Hintergründe _____	81
3	Ergebnisse _____	81
3.1	Messungen der pAKT- sowie CD62P-Expression nach Inkubation mit verschiedenen Agonisten _____	81
3.1.1	pAKT-Messungen _____	81
3.1.2	CD62P-Messungen _____	86
3.2	Vergleich der pAKT-Messungen mit weiteren Standardmethoden ____	89
3.2.1	Westernblot _____	89
3.2.2	Vollblutaggregometrie _____	91
3.3	Klinische Anwendung des pAKT/AKT-Protokolls: Messung der pAKT- und CD62P-Expression nach Inkubation von Spender-PRP mit HIT-IgG ____	95
3.4	Korrelation der pAKT-Messungen mit den CD62P-Werten, dem 4-T- Score, der optischen Dichte im ELISA sowie der time to aggregation im HIPA _____	111
4	Diskussion _____	118
4.1	Zielsetzung der Arbeit _____	118
4.2	Bewertung der Ergebnisse _____	120
4.3	Wissenschaftliche Bedeutung und Einordnung der Ergebnisse ____	127
4.4	Schlussfolgerung _____	136
5	Zusammenfassung _____	137

6	Literaturverzeichnis _____	139
7	Erklärung zum Eigenanteil _____	149
8	Veröffentlichungen _____	150
9	Danksagung _____	151

## **Abbildungsverzeichnis:**

<b>Abbildung 1:</b> Aufbau eines Thrombozyten.....	2
<b>Abbildung 2:</b> Thrombozytenaktivierung und Thrombusformation .....	6
<b>Abbildung 3:</b> Übersicht über Signaltransduktionswege der Thrombozytenaktivierung .....	9
<b>Abbildung 4:</b> Kollagenrezeptoren und ihre Signalweiterleitung.....	11
<b>Abbildung 5:</b> Aktivierung der AKT-Kinase durch die PI3-Kinase .....	13
<b>Abbildung 6:</b> Downstream-Effektoren der AKT-Kinase.....	16
<b>Abbildung 7:</b> Übersicht über die Diagnostik von angeborenen Thrombozytopenien.....	28
<b>Abbildung 8:</b> Pathophysiologie der Heparin-induzierten Thrombozytopenie Typ 2 .....	33
<b>Abbildung 9:</b> Pathophysiologie der ITP.....	39
<b>Abbildung 10:</b> Diagnostikalgorithmus von Thrombozytenfunktionsstörungen.	42
<b>Abbildung 11:</b> Prinzip der Durchflusszytometrie .....	59
<b>Abbildung 12:</b> Darstellung des Versuchsaufbau für die Thrombozytenaktivierung und CD62P-Messung.....	62
<b>Abbildung 13:</b> Darstellung der CD41-positiven Events.....	63
<b>Abbildung 14:</b> Darstellung der CD62P-positiven Events nach Aktivierung mit TRAP-6 .....	64
<b>Abbildung 15:</b> Versuchsaufbau der pAKT/AKT-Messungen.....	66
<b>Abbildung 16:</b> Darstellung der FACS-Messung einer Negativkontrolle. ....	67
<b>Abbildung 17:</b> Darstellung der FACS-Messung einer Probe nach Aktivierung mit TRAP-6.....	68
<b>Abbildung 18:</b> Darstellung der CD62P-Messung einer Negativkontrolle. ....	71
<b>Abbildung 19:</b> Darstellung der CD62P-Messung nach Inkubation mit HIT-IgG und Heparin 0,3 U/ml. ....	72
<b>Abbildung 20:</b> Darstellung der CD62P-Messung nach Inkubation mit HIT-IgG und Heparin 100 U/ml .....	72
<b>Abbildung 21:</b> Darstellung der pAKT/AKT-Messung der Negativkontrolle .....	73

<b>Abbildung 22:</b> Darstellung der pAKT/AKT-Messung nach Inkubation mit HIT-IgG und Heparin 0,3 U/ml.....	74
<b>Abbildung 23:</b> Darstellung der pAKT/AKT-Messung nach Inkubation mit HIT-IgG und hoch konzentriertem HeparinT. ....	74
<b>Abbildung 24:</b> Beispielmessung des Multiplate®-Analyzers nach Zugabe von TRAP-6 .....	75
<b>Abbildung 25:</b> Prozentuale Werte der pAKT-positiven Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Agonisten (TRAP-6, Arachidonsäure, Kollagen, ADP) im Vergleich zur Negativkontrolle mit Puffer .....	82
<b>Abbildung 26:</b> Durchflusszytometrische Darstellung der pAKT-positiven Events, A: nach Inkubation mit Puffer (PBS), dient als Negativkontrolle; B: nach Inkubation mit TRAP-6; C: nach Inkubation mit TRAP-6 und vorheriger AKT-Inhibition.....	84
<b>Abbildung 27:</b> Darstellung des prozentualen Anteils der pAKT-positiven Zellen nach Inkubation mit Puffer bzw. den verschiedenen Agonisten im Vergleich mit und ohne vorherige Hemmung der AKT-Kinase durch Bay1125976 (=AKT-I) .	85
<b>Abbildung 28:</b> Darstellung des FI der prozentualen CD62P-Expression nach Inkubation von PRP fünf verschiedener Spender mit TRAP-6, Arachidonsäure, Kollagen sowie ADP .....	86
<b>Abbildung 29:</b> Darstellung der CD62P-Expression im Vergleich zwischen Puffer und TRAP-6 (A) sowie TRAP-6 und TRAP-6 mit AKT-Inhibitor (B) .....	87
<b>Abbildung 30:</b> Darstellung des FI der prozentualen Anteile der CD62P-Expression nach Inkubation von PRP fünf verschiedener Spender mit TRAP-6, Arachidonsäure, Kollagen oder ADP im Vergleich mit und ohne vorheriger Inhibition der AKT-Kinase durch Bay1125976 (=AKT-I) .....	88
<b>Abbildung 31:</b> Darstellung der Proteinlevel von AKT und pAKT nach Stimulation der Proben mit verschiedenen Agonisten, jeweils mit und ohne vorherige Präinkubation mit dem AKT-Inhibitor BAY1125976.....	90
<b>Abbildung 32:</b> Darstellung Vergleich der Aggregation mit und ohne vorherige AKT-Inhibition durch Bay1125976.....	92
<b>Abbildung 33:</b> Multiplate-Messungen eines Spenders unter Zugabe verschiedener Agonisten, jeweils im Vergleich mit und ohne AKT-Inhibition ...	94

<b>Abbildung 34:</b> Durchflusszytometrische Darstellung des Anteils der pAKT-exprimierenden Zellen nach Inkubation mit positiven HIT-IgG .....	96
<b>Abbildung 35:</b> Darstellung der prozentualen Anteile der pAKT-exprimierenden Thrombozyten nach Inkubation mit den jeweiligen IgG unter verschiedenen Bedingungen .....	97
<b>Abbildung 36:</b> Darstellung des prozentualen Anteils der pAKT-exprimierenden Zellen nach Inkubation mit HIPA-positiven Puffer-positiven, HIPA-positiven Puffer-negativen und HIPA-negativen IgG unter verschiedenen Bedingungen .....	101
<b>Abbildung 37:</b> Darstellung des prozentualen Anteils der pAKT-exprimierenden Zellen nach Inkubation mit HIPA-positiven Puffer-positiven, HIPA-positiven Puffer-negativen und HIPA-negativen IgG unter verschiedenen Bedingungen .....	103
<b>Abbildung 38:</b> Darstellung der prozentualen Anteile der pAKT-positiven Zellen nach Inkubation von mit HIPA-positiven IgG und PBS (Pufferkontrolle), gering konzentriertem (Hep 0,3), hoch konzentriertem Heparin (Hep 100), IV.3-Inhibitor + Hep 0,3 oder AKT-Inhibitor + Hep 0,3 .....	105
<b>Abbildung 39:</b> Darstellung des FI der prozentualen CD62P-Expression nach Inkubation von PRP mit HIPA-positiven (n=6) bzw. HIPA-negativen (n=3) IgG .....	106
<b>Abbildung 40:</b> Darstellung der prozentualen CD62P-Expression im Vergleich unter versch. Bedingungen.....	109
<b>Abbildung 41:</b> Darstellung des FI der prozentualen CD62P-Expression im Verhältnis zur Negativkontrolle (nur PBS) nach Inkubation mit HIPA-positiven IgG, Vergleich der Aktivierung unter IgG+Hep 0,3 mit den anderen Bedingungen .....	110
<b>Abbildung 42:</b> Korrelation der prozentualen Werte der pAKT-Expression nach Inkubation mit den HIT-IgG und Hep 0,3 mit den jeweiligen CD62P-Werten der Patienten. ....	111
<b>Abbildung 43:</b> Korrelation der prozentualen Werte der pAKT-Expression nach Inkubation mit den HIT-IgG und Hep 0,3 mit dem klinischen 4-T-Score der Patienten .....	113

<b>Abbildung 44:</b> Korrelation der prozentualen Werte der pAKT-Expression nach Inkubation mit den HIT-IgG und Hep.0,3 mit den Werten der optischen Dichte (OD) im ELISA der jeweiligen HIT-Antikörper.....	115
<b>Abbildung 45:</b> Korrelation der prozentualen Werte der pAKT-Expression nach Inkubation mit den HIT-IgG und Hep.0,3 mit Werten der time to aggregation im HIPA.....	116

## **Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1:</b> Übersicht über die Inhaltsstoffe, Marker und Funktion der verschiedenen Granula .....	4
<b>Tabelle 2:</b> Übersicht über die Isoformen der PI3-Kinase und ihre Rolle bei der Signalweiterleitung in Thrombozyten.....	14
<b>Tabelle 3:</b> Übersicht über die verschiedenen Thrombozytendefekte sowie ihre Diagnostik.....	19
<b>Tabelle 4:</b> Mögliche Ursachen erworbener Thrombozytenfunktionsdefekte ....	29
<b>Tabelle 5:</b> 4-T-Score.....	34
<b>Tabelle 6:</b> Überblick über verschiedenen Thrombozytenfunktionstests mit ihren Vor- und Nachteilen.....	43
<b>Tabelle 7:</b> Übersicht über die verwendeten Chemikalien.....	50
<b>Tabelle 8:</b> Übersicht über die verwendeten Antikörper .....	51
<b>Tabelle 9:</b> Übersicht über die verwendeten Labormaterialien.....	52
<b>Tabelle 10:</b> Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen .....	53
<b>Tabelle 11:</b> Übersicht über die verwendeten Geräte .....	56
<b>Tabelle 12:</b> Verwendete Agonisten und jeweilige Verdünnung.....	60
<b>Tabelle 13:</b> Zusammensetzung der Antikörpermixe für die Permeabilisierung und Färbung.....	65
<b>Tabelle 14:</b> Inkubationsansätze für die Messung der Effekte der HIT-IgG .....	70
<b>Tabelle 15:</b> Pipettierschema der Patientenproben im HIPA.....	80
<b>Tabelle 16:</b> Pipettierschema der Kontrollen im HIPA.....	80
<b>Tabelle 17:</b> Prozentuale Werte der pAKT-Expression von 13 verschiedenen Spendern nach Inkubation mit verschiedenen Agonisten (TRAP-6, Arachidonsäure (=ARA), Kollagen, ADP) mit und ohne vorherige Inkubation des PRP mit dem AKT-Inhibitor Bay1125976 (=AKT-I).....	83
<b>Tabelle 18:</b> FI der prozentualen Anteile der CD62P-Expression nach Inkubation mit verschiedenen Agonisten (TRAP-6, Arachidonsäure, Kollagen oder ADP), Vergleich mit und ohne AKT-Inhibitor.....	88
<b>Tabelle 19:</b> Werte der Vollblutaggregometrie: Aggregation gemessen in der Fläche unter der Kurve nach Aktivierung von Vollblut sechs verschiedener	

Spender durch die Agonisten, TRAP-6, ASPI-Test Kollagen oder ADP, jeweils im Vergleich mit und ohne AKT-Inhibition mittels Bay1125976 .....	94
<b>Tabelle 20:</b> Prozentualer Anteil der pAKT-exprimierenden Thrombozyten nach Inkubation mit HIPA-positiven (12 Patienten), HIPA-negativen (n=8) IgG und gesunden Seren (AB-IgG) (n=4) unter verschiedenen Bedingungen .....	98
<b>Tabelle 21:</b> Prozentualer Anteil der pAKT-exprimierenden Zellen nach Inkubation mit HIPA-positiven Puffer-positiven, HIPA-positiven Puffer-negativen und HIPA-negativen IgG unter verschiedenen Bedingungen .....	100
<b>Tabelle 22:</b> Prozentualer Anteil der pAKT-positiven Zellen nach Inkubation von PRP mit HIPA-positiven IgG und PBS (Pufferkontrolle) bzw. gering konzentriertem, hoch konzentriertem Heparin, IV.3-Inhibitor + Hep 0,3 oder AKT-Inhibitor + Hep 0,3.....	104
<b>Tabelle 23:</b> Werte der prozentualen CD62P-Expression nach Inkubation von PRP mit HIPA-positiven (n=6) bzw. HIPA negativen (n=3) IgG im Verhältnis zur Negativkontrolle (nur PBS).....	107
<b>Tabelle 24:</b> FI der prozentualen CD62P-Expression nach Inkubation von PRP mit HIPA-positiven IgG unter gering konzentriertem Heparin, hoch konzentriertem Heparin, IV.3-Inhibition und AKT-Inhibition im Verhältnis zur Pufferkontrolle .....	108
<b>Tabelle 25:</b> Vergleich des prozentualen Anteils der pAKT-Expression der jeweiligen HIT-IgG mit den jeweiligen CD62P-Werten nach Inkubation mit HIT-IgG unter Hep 0,3.....	112
<b>Tabelle 26:</b> Vergleich des prozentualen Anteils der pAKT-Expression der jeweiligen HIT-IgG mit dem klinischen 4-T-Score der Patienten .....	113
<b>Tabelle 27:</b> Vergleich der pAKT-Expression nach Inkubation mit den HIT-IgG und Heparin 0,3 U/ml mit den jeweiligen Werten der optischen Dichte (OD) der Antikörper im ELISA .....	114
<b>Tabelle 28:</b> Vergleich der pAKT-Expression nach Inkubation mit den HIT-IgG und Heparin 0,3 mit der jeweiligen Time to Aggregation im HIPA .....	115

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACD	Acid-Citrate-Dextrose
<b>AKT</b>	<b>Proteinkinase B</b>
APTT	Aktiviert partielle Thromboplastinzeit (engl. „activated partial thromboplastin time“)
AUC	Fläche unter der Kurve (engl. „area under the curve“)
ATP	Adenosintriphosphat
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BDUC	Blutungsstörung unbekannter Ursache (engl. „bleeding disorder of unknown cause“)
BSS	Bernard Soulier Syndrom
Bzw.	beziehungsweise
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CLEC-2	C-type lectin-like receptor 2
COX-1	Cyclooxygenase 1
CPB	Kardiopulmonaler Bypass (engl. „cardiopulmonary bypass“)
CXCL	Chemokin(CXC-Motiv)-Liganden
DAG	(1,2-) Diacylglycerin
ECMO	Extrakorporale Membranoxygenierung (engl. „extracorporeal membrane oxygenation“)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (engl. „epidermal growth factor“)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Durchflusszytometrie (engl. „fluorescence activated cell sorting“)
FcγRII	Fcγ-Rezeptor II
FLI1	Friend leukemia integration 1
FSC	Forward Scatter

GDP	Guanosindiphosphat
GP	Glykoprotein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor (engl. „G protein-coupled receptor“)
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GSK $\beta$	Glykogensynthase-Kinase $\beta$
GTP	Guanosintriphosphat
HIPA	Heparin-induzierter Plättchen-Aktivierungsassay
HIT	Heparin-induzierte Thrombozytopenie
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
IB	Immunoblot (Westernblot)
IF	Immunfluoreszenz-Mikroskopie
IgG	Immunglobulin G
IGF1	Insulin-like growth factor 1
IP <sub>3</sub>	Inositol(-1,4,5-)triphosphate
ITAM	Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes Aktivierungs-Motiv
ITP	Immunthrompozytopenie
IVIG	Intravenöse Immunglobuline
kDa	Kilodalton
LTA	Lichttransmissionsaggregometrie
M	Molar (mol/l)
MAP4K	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase-Kinase-Kinase-Kinase 4
MPV	Mittleres Thrombozytenvolumen (engl. „mean platelet volume“)
mTORC2	Cytosolic mammalian target of rapamycin complex2
MYH9	Myosin Heavy Chain 9
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NSAID	Nicht-steroidales Antirheumatikum (engl. „non-steroidal anti-inflammatory drug“)
<b>pAKT</b>	<b>Phosphorylierte Form der AKT-Kinase</b>
PAR	Protease-aktivierender Rezeptor

PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. „phosphate-buffered saline“)
PDE3A	Phosphodiesterase 3a
PDK1	3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase-1 (engl. „3-phosphoinositide-dependent protein kinase“)
PFA100	Platelet Function Analyzer 100
PF4	Plättchenfaktor 4
PGG <sub>2</sub> /PGH <sub>2</sub> /PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin G <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> /I <sub>2</sub>
PH	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
<b>PKB</b>	<b>Proteinkinase B (=AKT)</b>
PLC	Phospholipase C
PRP	Thrombozytenreiches Plasma (engl. „platelet rich plasma“)
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (engl. „standard error of the mean“)
SRA	Serotoninfreisetzungstest (engl. „serotonin-release assay“)
Syk	Milztyrosinkinase (engl. „spleen tyrosine kinase“)
Tab.	Tabelle
TM	Thrombomodulin
TRAP	Thrombin-Rezeptor-Aktivator-Peptid
TTP	Thrombotisch-thrombozytopenie Purpura
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
VAD	Ventricular Assist Device
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (engl. „vascular endothelium growth factor“)
vWF	von-Willebrand-Faktor
WBA	Impedanzaggregometrie (engl. „whole blood aggregometry“)
z.B.	Zum Beispiel

# 1 Einleitung

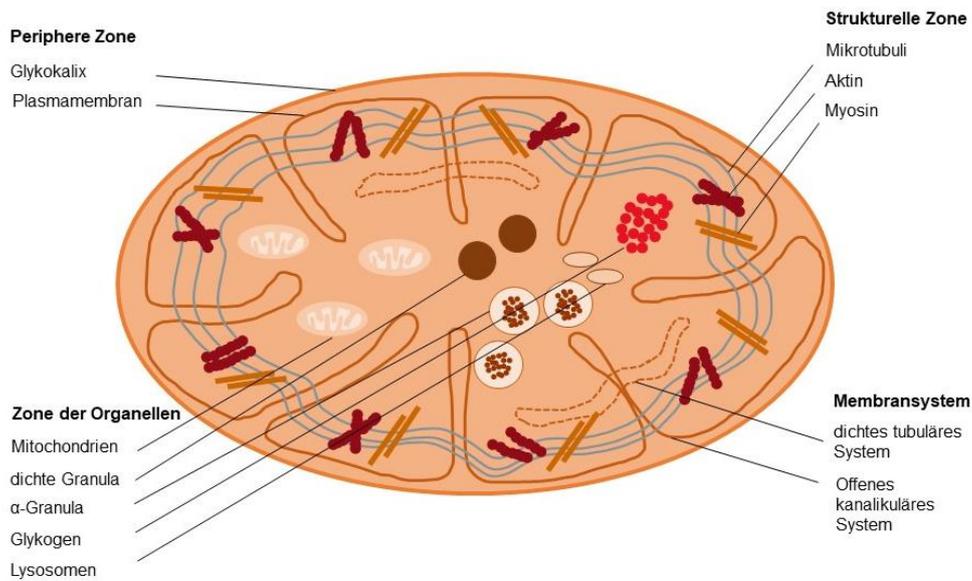
## 1.1 Physiologie der Thrombozyten

### 1.1.1 Aufbau der Thrombozyten

Thrombozyten sind mit einem Durchmesser von 2 bis 5  $\mu\text{m}$ , einer Dicke von 0.5  $\mu\text{m}$  und einem mittleren Zellvolumen von 6 bis 10 fl die kleinsten Blutzellen des menschlichen Körpers (Gremmel et al., 2016). Ihnen kommt eine zentrale Rolle zu, nicht nur bei der Thrombose und Hämostase, sondern auch bei anderen Prozessen im Körper wie der Atherogenese, Embryogenese, Entzündungen, antimikrobieller angeborener und erworbener Abwehr, Tumorwachstum und Metastasenbildung (Gremmel et al., 2016; Scharf, 2018a). Ein gesunder Mensch besitzt im Durchschnitt  $150\text{-}350 \times 10^9$  Thrombozyten pro Liter Blut (Gremmel et al., 2016). Thrombozyten stellen zirkulierende, kernlose Abschnürungen von Megakaryozyten aus dem Knochenmark dar (Jurk & Kehrel, 2005) mit einer Lebensdauer von circa 9 bis 10 Tagen (Moroi & Watson, 2015). Wie in Abbildung 1 dargestellt, lässt sich der Aufbau der Thrombozyten grob untergliedern in eine periphere Zone, eine Zone der Organellen, eine strukturelle Zone sowie Membransysteme. Die periphere Zone besteht aus einer glatten Plasmamembran, gebildet durch eine zweischichtige Lipidschicht. Sie weist viele Falten und Öffnungen des kanalikulären Systems auf, welche der Erweiterung der Membranoberfläche bei Bedarf dienen (Gremmel et al., 2016).

Die Plasmamembran setzt sich hauptsächlich aus verschiedenen Phospholipiden, Cholesterol und Glykolipiden zusammen (Jurk & Kehrel, 2005). Durch die asymmetrische Anordnung dieser Phospholipide kommt der Plasmamembran eine bedeutende Rolle bei der Hämostase zu (Gremmel et al., 2016; Jurk & Kehrel, 2005). Im Ruhezustand befinden sich negativ geladene Phospholipide in der endoplasmatischen Lipidschicht, wohingegen Sphingomyelin und Phosphatidylcholin in der äußeren Lipidschicht zu finden sind (Gremmel et al., 2016; Jurk & Kehrel, 2005). Nach Aktivierung findet eine Migration der sich in der inneren Membran befindenden anionischen Phospholipide in die exoplasmatische Lipidschicht statt. Diese kann so den zuvor aus Mikropartikeln freigesetzten Tissue

Factor sowie Gerinnungsfaktoren wie Faktor Va, VIIa und X binden und stellt eine katalytische Oberfläche für den Prothrombinasekomplex (FXa-FVa-Ca<sup>2+</sup>) sowie den Tenasekomplex (FIX-FVIIIa-Ca<sup>2+</sup>) dar, was zu einer starken Thrombingeneration und damit dem Anstoßen der Gerinnungskaskade führt (Reid & Webster, 2012; Scharf, 2018a).



**Abbildung 1: Aufbau eines Thrombozyten**, adaptiert nach (Hach-Wunderle, 2012). Der Aufbau gliedert sich in eine periphere Zone mit Glykokalix und Plasmamembran, ein Membransystem mit einem dichten tubulären und einem offenen kanalikulärem System, eine strukturelle Zone sowie eine Zone der Organellen.

Die Plasmamembran wird von einer Glykokalix umgeben, einer dynamischen Struktur, an welcher der erste Kontakt der Blutplättchen mit ihrer Umgebung stattfindet. Die Glykokalix beinhaltet zahlreiche Glykoproteine und Rezeptorkomplexe. Diese sind wichtig für die Interaktion der Thrombozyten mit subendothelialen Strukturen verletzter Gefäße, für die Plättchenaktivierung, Adhäsion, Aggregation und Gerinnelretraktion. Direkt unterhalb der Plasmamembran liegt die Submembranzone, welche ein System dünner Aktinfilamente, das kontraktile Zytoskelett der Zellmembran, beinhaltet. Dieses ist erforderlich für eine Formänderung und die Pseudopodienbildung der Thrombozyten sowie die Translokation von Partikeln und Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Die strukturelle Zone besteht aus einer durchsichtigen, viskösen Matrix, die Mikrotubuli, Mikrofilamente

wie Aktin und Myosin, Glykogen, Vesikel und sekretorische Organellen beinhaltet. Die Aktinfilamente in der strukturellen Zone formen ein zytoplasmatisches Zytoskelett, in das die Zellorganellen eingebettet sind. Infolge einer Thrombozytenaktivierung zieht das Aktinskelett an den Mikrotubuli, wodurch  $\alpha$ -Granula sowie dichte Granula in das Zentrum lokalisiert und anschließend sekretiert werden (Gremmel et al., 2016).

Das Membran-System besteht aus dem mit der Oberfläche verbundenen offenen kanalikulären System, einem dichten tubulären System sowie gelegentlich rauem endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Komplexen. Das offene kanalikuläre System ist Teil der Plättchenoberfläche, welche sich nach innen zieht und so tubuläre Strukturen formt. Dadurch kommen dem System mehrere Funktionen zu: Die Kanäle können dem Transport von Plasmabestandteilen wie Fibrinogen in die  $\alpha$ -Granula dienen sowie als Route für die Freisetzung von Granulabestandteilen nach der Aktivierung der Thrombozyten. Außerdem fungiert das System als Erweiterung der Plasmamembran. Diese Erweiterung ist bei einer Formänderung der Thrombozyten infolge von Plättchenadhäsion an ein verletztes Gefäß erforderlich. So können Thrombozyten im aktivierten Zustand ihre Oberfläche um mehr als ein Vierfaches vergrößern (Gremmel et al., 2016).

In der Zone der Organellen befinden sich hauptsächlich drei Arten von Granula ( $\alpha$ -Granula, dichte Granula und Lysosomen), Mitochondrien, Glykosomen sowie elektronendichte Ketten und Cluster (Gremmel et al., 2016). Die verschiedenen Granula unterscheiden sich in ihrer Größe, der Anzahl und den Inhaltsstoffen, wodurch ihnen unterschiedliche Bedeutungen zukommen, wie in Tabelle 1 dargestellt. Die Granulasekretion kann auf zwei Arten erfolgen; durch Degranulation infolge einer Verschmelzung mit dem offenen kanalikulären System oder direkt mit der Plasmamembran (Estevez & Du, 2017; Gremmel et al., 2016).

**Tabelle 1: Übersicht über die Inhaltsstoffe, Marker und Funktion der verschiedenen Granula**, adaptiert nach (Flaumenhaft, 2013) sowie (Gremmel et al., 2016)

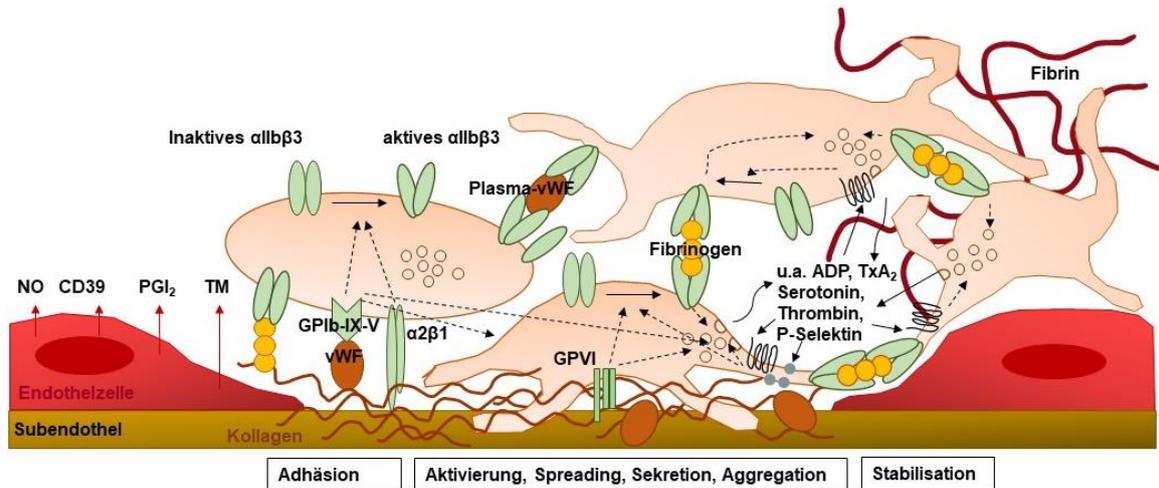
<b>Granula</b>	<b>Generelle Marker</b>	<b>Funktion</b>	<b>Inhaltsstoffe</b>
<b><math>\alpha</math>-Granula</b>	P-Selektin vWF CXCL4 (PF4)	Thrombose/ Hämostase, Entzündungs- prozesse, Abwehrfunk- tion, Angiogenese, Mitogenese	Membranproteine wie $\alpha$ IIb $\beta$ 3, GPIIb-III-V, GPVI oder P-Se- lektin, Adhäsionsmoleküle wie Fibrino- gen, Thrombospondin und vWF Wachstumsfaktoren wie EGF, Chemokine wie CXCL1, CXCL4, Immunmediatoren, Mikrobizide Proteine, Proangiogenetische Faktoren wie VEGF und Inhibitoren wie Angiostatin
<b>Dichte Granula</b>	CD63, Serotonin	Thrombose/ Hämostase, Entzündungs- prozesse	Kationen wie $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{K}^{+}$ Phosphatasen, Nukleotide wie ADP und ATP, Amine wie Serotonin und His- tamin
<b>Lysoso- men</b>	Saure Phosphatase	Endosomale Verdauung	Abbauende Enzyme wie Elastasen, Kollagenasen, Cathepsine, Glucosidasen, Galaktasen, saure Phospha- tase

### **1.1.2 Thrombozytenaktivierung, -adhäsion und -aggregation**

Thrombozyten tragen wesentlich zum Erhalt und der Wiederherstellung der Integrität des vaskulären Systems nach einer Verletzung bei, indem sie adhären, aggregieren und schließlich einen hämostatischen Thrombus bilden. Sie spielen jedoch nicht nur bei der physiologischen Hämostase eine Rolle, sondern auch bei der pathologischen arteriellen Thrombogenese, welche zu Myokardinfarkten, Schlaganfällen und anderen Organinfarkten führen kann (Scharf, 2018a). Der Prozess der Thrombusbildung und folglich Blutstillung nach einer Gefäßverletzung ist komplex und vielschichtig, siehe Abbildung 2. Er besteht aus einer Plättchenadhäsion zwischen den Thrombozyten und der Gefäßwand sowie eine Aggregation zwischen den Blutplättchen (Jurk & Kehrel, 2005). Außerdem lässt er sich in eine Initiation, Extension und Stabilisation einteilen. Initial erfolgt nach einer Gefäßläsion unter hohem Scherstress eine Plättchenadhäsion und damit Verlangsamung der Flussrate durch Bindung von freigelegten Strukturen wie Kollagen über den im Plasma zirkulierenden und aus Endothelzellen sowie später endogen aus den  $\alpha$ -Granula freigesetzten Von-Willebrand-Faktor (vWF) an den GPIb-IX-V-Komplex der Thrombozyten (Gremmel et al., 2016; Jurk & Kehrel, 2005; Scharf, 2018a, 2018b; Stalker et al., 2012). Unter statischen oder langsameren Flussbedingungen und geringerem Scherstress findet eine Bindung des freigelegten Kollagens an den  $\alpha 2\beta 1$ -Rezeptor (Ia/IIa) sowie den GPVI-Rezeptor statt. Diese Rezeptoren werden an der Thrombozytenoberfläche exprimiert (Jurk & Kehrel, 2005).

Die Stimulierung der Thrombozyten über die Rezeptoren als Folge der Plättchenadhäsion führt zu einem Spreading der Thrombozyten, was in der Bildung einer Schicht aus adhärenenden Thrombozyten resultiert. Dieser Prozess wird auch als Extension bezeichnet (Jurk & Kehrel, 2005). Durch die Aktivierung der Thrombozyten kommt es zudem zu einer Granulasekretion und folglich einer weiteren Aktivierung, Immobilisierung und Stimulation weiterer Thrombozyten (Jurk & Kehrel, 2005). Es erfolgt eine Sekretion der sekundären Agonisten Serotonin (5-HT) und Adenosindiphosphat (ADP) aus den dichten Granula sowie die Generation von Thromboxan A<sub>2</sub> durch die thrombozytäre COX-1 (Cyclooxygenase),

was auch als zweite Welle der Aktivierung bezeichnet wird (Jurk & Kehrel, 2005; Scharf, 2018b).



**Abbildung 2: Thrombozytenaktivierung und Thrombusformation**, modifiziert nach (Balduini et al., 2003; Estevez & Du, 2017; Jurk & Kehrel, 2005; Scharf, 2018a). Im Zuge der Adhäsion erfolgt die Bindung des freigesetzten Kollagens über den vWF an den GPIb-IX-Rezeptor sowie später direkt an den  $\alpha 2\beta 1$ - und den GPVI-Rezeptor. Dies führt zu einer Aktivierung der Thrombozyten mit konsekutiver Granulasekretion und Konformationsänderung des Fibrinogenrezeptors  $\alpha II\beta 3$ . Es kommt zur Aggregation, Bildung eines Fibrinnetzes und schließlich zur Thrombusformation. Abkürzungen: NO= Stickstoffmonoxid,  $PGI_2$ = Prostaglandin  $I_2$ , TM= Thrombomodulin, vWF= Von-Willebrand-Faktor, ADP= Adenosindiphosphat,  $TxA_2$ = Thromboxan  $A_2$

Die Agonisten binden an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) an der Zelloberfläche und führen synergistisch zur Plättchenaktivierung durch Signalamplifikation und Calciummobilisation, zur Formänderung und zur Rekrutierung weiterer Thrombozyten. Über intrazelluläre Signalwege kommt es zu einer Aktivierung des Integrins  $\alpha II\beta 3$  (GPIIb/IIIa) via Inside-Out-Signaling. Dies führt durch eine Affinitätssteigerung zur Bindung von vWF und Fibrinogen an den aktivierten Rezeptor, wodurch eine Aggregation zwischen den Thrombozyten und dadurch eine Thrombusbildung zustande kommt. Durch das Outside-In-Signaling nach der Ligandenbindung am  $\alpha II\beta 3$ -Rezeptor wird außerdem die Aktivierung weiterer Thrombozyten angestoßen sowie die Aktivierung weiterer Integrine, Veränderungen des Zytoskeletts, Granulasekretion sowie die Entwicklung einer prokoagulanten Aktivität der Thrombozyten (Jurk & Kehrel, 2005; Scharf, 2018a, 2018b; Stalker et al., 2012).

Aktivierte Thrombozyten stellen durch Änderungen der Membranoberfläche wie oben beschrieben eine katalytische, prokoagulante Oberfläche für die Bindung und Aktivierung von Gerinnungsfaktoren dar. So wird die sekundäre Hämostase angestoßen und dadurch Thrombin generiert, welches wiederum durch die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren PAR (Protease-Activated-Receptor)-1 und PAR-4 sowie GPIb-IX-V zu einer weiteren Aktivierung der Thrombozyten führt. So laufen die primäre Hämostase, bestehend aus einer Thrombozytenadhäsion, -aggregation und -aktivierung sowie die Initiation der sekundären Hämostase, der Koagulation, Hand in Hand ab (Jurk & Kehrel, 2005; Scharf, 2018a, 2018b). Im Zuge der Stabilisation kommt es durch Outside-In-Signaling über verschiedene Integrine sowie kontaktabhängige Rezeptoren zur Festigung des Thrombus und zur Clotretraktion. Dadurch entsteht ein stabiler Thrombus aus aggregierten Thrombozyten und einem Fibrinnetz, welcher den Kräften des arteriellen Systems standhält (Scharf, 2018a, 2018b; Stalker et al., 2012).

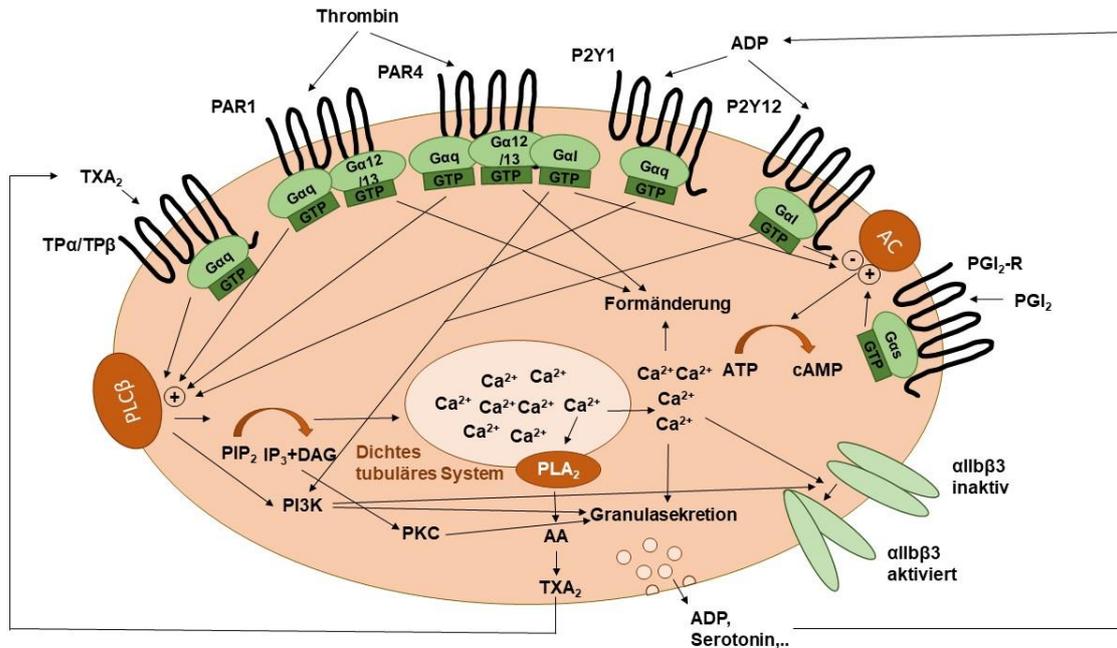
### **1.1.3 Verschiedene Signalwege in Thrombozyten**

Nach der Initiation durch die Bindung der Thrombozyten an die vWF-Kollagen-Komplexe werden zentrale Signalwege angestoßen über die Rezeptoren für Kollagen (GPVI), vWF (GPIb $\alpha$ ), Thrombin (PAR 1 und PAR4), ADP (P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub>), Serotonin (5-HT<sub>2A</sub>), Epinephrin ( $\alpha$ 2-Adrenorezeptor) und Thromboxan A<sub>2</sub> (TP) für die Plättchenaktivierung (Stalker et al., 2012). Mit Ausnahme von Kollagen und vWF binden diese Agonisten an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR). Dabei handelt es sich um spezifische Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen, die jeweils mit verschiedenen heterotrimeren G-Proteinen (Guanosintriphosphat-bindende Proteine) gekoppelt sind. Die G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten, einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit. Durch die Agonistenbindung an die GPCRs kommt es zu einem Austausch des im Ruhezustand an die  $\alpha$ -Untereinheit gebundenen GDP mit GTP, wodurch die  $\alpha$ -Untereinheit von der  $\beta\gamma$ -Untereinheit und dem Rezeptor dissoziiert. Hierdurch werden verschiedene Signalwege angestoßen (Estevez & Du, 2017; Jurk & Kehrel, 2005), welche in Abbildung 3 dargestellt sind. Da diese Rezeptoren ihre Agonisten mit einer

hohen Affinität binden, dies zu einer Aktivierung multipler G-Proteine und damit einer Signalamplifikation führt und sich die Plättchenaktivierung durch die Rezeptoren sehr gut steuern lässt, ist diese Gruppe von Rezeptoren besonders gut für die Signalübertragung in Thrombozyten geeignet (Stalker et al., 2012).

Basierend auf der  $\alpha$ -Untereinheit können G-Proteine in vier Klassen eingeteilt werden:  $G_q$ ,  $G_{12/13}$ ,  $G_{i/z}$  und  $G_s$ , welche jeweils an verschiedene Rezeptoren gekoppelt sind (Li et al., 2010), veranschaulicht in Abbildung 3. Die Aktivierung durch  $G_q$ -Protein gekoppelte Rezeptoren wie PAR1, PAR4, der TxA<sub>2</sub>-Rezeptor, der P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor und der 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptor induziert die Aktivierung der Phospholipase C  $\beta$  (PLC $\beta$ ). Diese katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) zu Inosit-1,4,5-Triphosphat (IP<sub>3</sub>) und 1,2-Diacylglycerin (DAG) (Jurk & Kehrel, 2005; Scharf, 2018b). IP<sub>3</sub> und DAG aktivieren die Proteinkinase C, wodurch es zur Granulasekretion und Freisetzung des Second Messenger ADP kommt (Estevez & Du, 2017; Stalker et al., 2012). Durch das IP<sub>3</sub> wird außerdem Calcium (Ca<sup>2+</sup>) aus dem dichten tubulären System freigesetzt und das DAG fördert zudem eine transmembranäre Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme. Folglich steigen die intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegel. Der Anstieg des intrazellulären Calciums führt zur Formänderung der Thrombozyten sowie zur Granulasekretion, was in einer weiteren ADP-Freisetzung resultiert. Dieses bindet am P2Y<sub>12</sub> sowie P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor und verstärkt die Plättchenaktivierung (Jurk & Kehrel, 2005; Scharf, 2018b). Des Weiteren kommt es durch die Mobilisation des Calciums zu einer Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub>, welche die Fettsäure am C2 des Phosphoglycerid von Phospholipiden hydrolytisch abspaltet. So wird Arachidonsäure frei, die durch die COX-1 in Prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) und anschließend Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) umgewandelt wird. Dieser Prozess kann durch Aspirin unterbunden werden. PGH<sub>2</sub> wird dann wiederum durch die Thromboxan-Synthetase zu Thromboxan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) umgewandelt. Das sekretierte TxA<sub>2</sub> kann durch die Plasmamembran diffundieren und sowohl autokrin als auch parakrin an  $G_q$ -Protein-gekoppelten Thrombopoietin (TP)-Rezeptoren binden, welche  $G_q$  und  $G_{12/13}$  gekoppelt sind und somit zur Verstärkung der Signaltransduktionsprozesse, Formänderung und Rekrutierung weiterer Thrombozyten beitragen (Jurk & Kehrel, 2005; Scharf, 2018b; Stalker et al., 2012). Durch den Anstieg des intrazellulären Calciums

kommt es außerdem zu einer Aktivierung des Integrins  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  (Stalker et al., 2012). Dieses kann nun lösliche Liganden wie Fibrinogen, vWF und Fibronectin binden und führt so zu einer Aggregation von Thrombozyten (Jurk & Kehrel, 2005; Scharf, 2018a).



**Abbildung 3: Übersicht über Signaltransduktionswege der Thrombozytenaktivierung**, modifiziert nach (Estevez & Du, 2017; Jurk & Kehrel, 2005; Jurk & Walter, 2019; Stalker et al., 2012; Stegner & Nieswandt, 2010). Die Agonisten binden an verschiedene G-Protein gekoppelte Rezeptoren, was unter anderem zu einem Anstoßen diverser Signalwege führt. Infolgedessen kommt es zu einer Aktivierung, Granulasekretion und Formänderung der Thrombozyten. Über die Aktivierung der Adenylatcyclase wirken inhibitorische Effekte. Abkürzungen: PLC $\beta$ = Phospholipase C  $\beta$ ; TXA<sub>2</sub>= Thromboxan A<sub>2</sub>, TP $\alpha$ / $\beta$ = Thrombopoietin-Rezeptor  $\alpha$ / $\beta$ , GTP= Guanosin triphosphat, ATP= Adenosin triphosphat, cAMP= zyklisches Adenosinmonophosphat, ADP= Adenosindiphosphat, PGI<sub>2</sub>= Prostaglandin I<sub>2</sub>, R= Rezeptor, PI3K= Phosphatidylinositol-3-Kinase, PIP<sub>2</sub>= Phosphatidylinositolbiphosphat, IP<sub>3</sub>= Inositol-1,4,5-Triphosphat, DAG= Diacylglycerin, PAR= Protease-aktivierter Rezeptor, PKC= Proteinkinase C

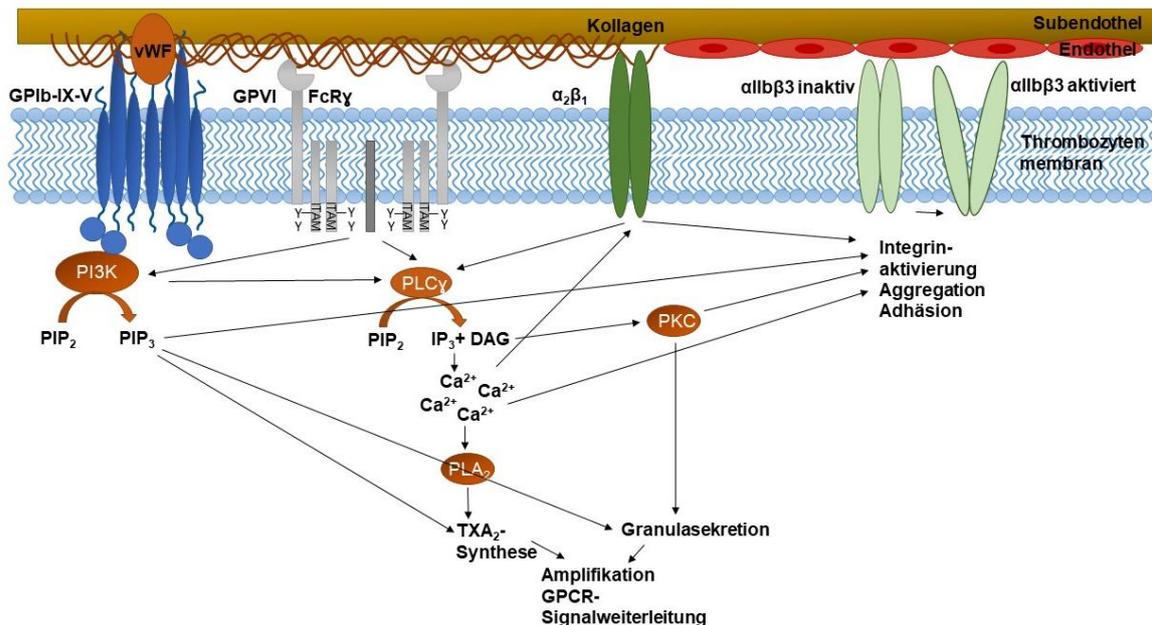
Damit Thrombozyten nicht in Abwesenheit einer Verletzung aggregieren, werden Prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) und EDRF/Stickstoffoxid (NO) von den Endothelzellen freigesetzt. Diese Plättcheninhibitoren induzieren einen Anstieg der intrazellulären sekundären Messenger cAMP und cGMP, indem PGI<sub>2</sub> die Adenylatzyklase G $\alpha_s$ -vermittelt und NO die Guanylatzyklase aktiviert und außerdem die Aktivität der Phosphodiesterase herabsetzt. Die hohen Konzentrationen dieser zyklischen Mononukleotide führt zur Herabsetzung der Plättchenaktivität (Estevez & Du, 2017; Gremmel et al., 2016; Jurk & Kehrel, 2005; Scharf, 2018b).

Das durch Aktivierungsprozesse freigesetzte ADP initiiert über den P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor auch G<sub>i</sub>-Protein vermittelte Prozesse. Auf diese Weise kommt es zu einer Hemmung der Adenylatcyclase und folglich einer Abnahme des Second Messenger cAMP, wodurch die Blockade der Plättchenaktivierung durch diesen aufgehoben wird (Jurk & Kehrel, 2005; Jurk & Walter, 2019; Stalker et al., 2012). Über die βγ-Untereinheit werden auch Downstream-Effektoren wie die die PLCβ und die PI3-Kinase aktiviert. Die PI3-Kinase führt über eine Phosphorylierung von Phosphatidylinositolbiphosphat zu Phosphatidylinositoltriphosphat zur Integrin-Aktivierung. Des Weiteren wird die Phospholipase C aktiviert, welche wie oben beschrieben zur Granulasekretion und Formänderung der Thrombozyten beiträgt (Estevez & Du, 2017; Jurk & Walter, 2019; Stalker et al., 2012).

Einen weiteren essenziellen Signalübertragungsweg für eine Formänderung der Thrombozyten stellt die Signalübertragung über die Proteine G<sub>12</sub> und vor allem G<sub>13</sub> dar. Diese sind an die Rezeptoren PAR1 und 4 sowie TP gekoppelt. Sie führen über nachgeschaltete Signalprozesse zur Formänderung der Thrombozyten (Estevez & Du, 2017; Stalker et al., 2012).

Kollagen, Immunglobuline und vWF übertragen ihre Signale im Gegensatz dazu über nicht-rezeptorgekoppelte Tyrosinkinasen. Kollagen bindet indirekt über vWF an die Rezeptoren GPIb-IX-V, αIIbβ<sub>3</sub> und GPIα. Die direkte Signalübertragung durch Kollagen findet sowohl über den Rezeptor α<sub>2</sub>β<sub>1</sub> (=GPIa/IIa) als auch über GPVI statt. Abbildung 4 stellt die Signalweiterleitung dar. Der potenteste Kollagen-Rezeptor ist GPVI und gehört zu der Familie der Immunglobuline. Er ist mit einem Dimer aus kovalent gekoppelten Fc-Rezeptor-γ-Ketten (FcRγ) verbunden, wodurch der Rezeptor die Thrombozytenoberfläche erreicht (Jurk & Kehrel, 2005; Moroi & Watson, 2015; Scharf, 2018b; Stalker et al., 2012). Die Bindung von Kollagen an den Rezeptor führt über einige nachgeschaltete Prozesse unter anderem zur Hydrolyse von PIP<sub>2</sub> zu IP<sub>3</sub> und DAG und dadurch zu einer Calciumfreisetzung. Es folgen die gleichen nachgeschalteten Prozesse wie bei der G<sub>q</sub>-Protein-vermittelten Signaltransduktion, beispielsweise die ADP-Sekretion, Freisetzung von TxA<sub>2</sub> und Integrinaktivierung (Jurk & Kehrel, 2005; Moroi & Watson, 2015; Scharf, 2018b; Stalker et al., 2012). Auch die Signalübertragung via GPIb-

IX-V führt zur Aktivierung der PI3-Kinase und damit indirekt zur Aktivierung der Thrombozyten mit Granulasekretion und Aggregation (Stalker et al., 2012).



**Abbildung 4: Kollagenrezeptoren und ihre Signalweiterleitung**, vereinfacht dargestellt, modifiziert nach (Estevez & Du, 2017; Laurent et al., 2014; Li et al., 2010; Moroi & Watson, 2015; Stalker et al., 2012). Kollagen bindet über vWF den GPIb-IX-V sowie direkt an GPVI und α<sub>2</sub>β<sub>1</sub>. Über die Aktivierung von unter anderem PI3K sowie PLCγ kommt es zur Thromboxansynthese, Granulasekretion, Integrinaktivierung und Aggregation. Abkürzungen: PLCγ= Phospholipase C γ; TXA<sub>2</sub>= Thromboxan A<sub>2</sub>, PI3K= Phosphatidylinositol-3-Kinase, PIP<sub>2</sub>= Phosphatidylinositolbiphosphat, IP<sub>3</sub>= Inositol-1,4,5-Triphosphat, DAG= Diacylglycerin, PKC= Proteinkinase C, PIP<sub>3</sub>= Phosphatidylinosoltriphosphat, ITAM= Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes Aktivierungs-Motiv

Einen zentralen Punkt der Thrombozytenaktivierung stellt, wie oben bereits beschrieben, die Aktivierung des Integrins αIIbβ<sub>3</sub> dar. Dieses wird durch Signaltransduktionsprozesse via Inside-Out-Signaling aktiviert, welche durch verschiedenen Agonisten angestoßen werden (Scharf, 2018b). Infolge dieser Aktivierung kann ein Outside-In-Signaling stattfinden, mediiert durch die Bindung von Liganden wie Fibrinogen an αIIbβ<sub>3</sub>. Auch bei diesem Signalweg spielen G-Proteine und die Aktivierung der PI3-Kinase eine wichtige Rolle (Scharf, 2018b). Es kommt zur Stabilisierung der Plättchenadhäsion, einem Plättchen-Spreading, einer Granulasekretion und einer Amplifikation der Plättchenaggregation, was wichtig ist für das Wachstum des Thrombus und seine Retraktion (Estevez & Du, 2017). Da

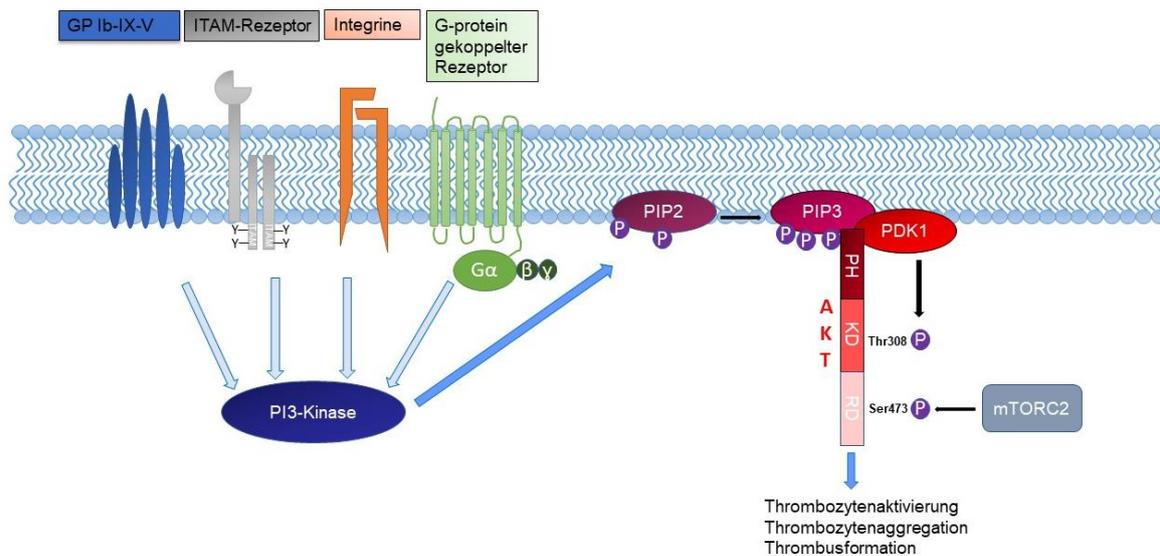
die Arbeit auf der Untersuchung des Phosphorylierungszustandes einer spezifischen Kinase, der AKT-Kinase, beruht, wird im folgenden Kapitel auf den damit verbundenen Signalweg detailliert eingegangen.

#### **1.1.4 Der AKT- Signalweg**

Die AKT-Kinase, auch als Proteinkinase B (PKB) bezeichnet, ist eine ubiquitär vorkommende 57-kDa-Serin-Threonin-Kinase mit pleiotropen Effekten auf das Zellüberleben, das Zellwachstum und den Zellmetabolismus. Auch menschliche Thrombozyten exprimieren die AKT-Kinase. Sie ist bei der Aktivierung und Signaltransduktion und vermutlich auch an thrombotischen Prozessen beteiligt. Die AKT-Kinase besteht aus drei Domänen, nämlich einer Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH), einer katalytischen Domäne mit einer Thr308-Phosphorylierungsstelle und einer regulatorischen Domäne mit einer Ser473-Phosphorylierungsstelle (Kim et al., 2006; Woulfe, 2010). Es gibt drei Isoformen der AKT-Kinase, AKT1 (PKB $\alpha$ ), 2 (PKB $\beta$ ) und 3 (PKB $\gamma$ ). Alle drei Isoformen werden in menschlichen Thrombozyten exprimiert (Estevez & Du, 2017; Kim et al., 2006).

Der PI3K-AKT-Signalweg ist von großer Bedeutung für die Granulasekretion, Plättchenaktivierung und stabile Thrombozytenadhäsion. Er ist beteiligt an der Signaltransduktion via GPIIb-IX, ITAM-Rezeptoren wie GPVI oder dem C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2), via IGF1(Insulin-like growth factor 1)-Rezeptor und beim Integrin-Inside-Out sowie Outside-In-Signaling. Der CLEC-2-Rezeptor spielt unter anderem bei Wachstums-, Entzündungs- und Gerinnungsprozessen eine Rolle (Estevez & Du, 2017; Guidetti et al., 2015; Laurent et al., 2014; Meng et al., 2021; Woulfe, 2010). An der primären Signaltransduktion über die Agonisten via GPCRs ist der PI3/AKT-Signalweg nicht direkt beteiligt, dient jedoch der Signalamplifikation des Signalweges über eine zweite Welle der Sekretion. Diese wird in erster Linie vermittelt durch den G<sub>i</sub>-gekoppelten ADP-Rezeptor P2Y<sub>12</sub> (Estevez & Du, 2017; Guidetti et al., 2015; Laurent et al., 2014; Woulfe, 2010), wobei auch P2Y<sub>12</sub>-unabhängige Wege der AKT-Phosphorylierung identifiziert wurden (Laurent et al., 2014). Innerhalb des PI3-AKT-Signalwegs steht die Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) über der AKT-Kinase und reguliert deren

Aktivität. PI3-Kinasen bestehen aus einer katalytischen und regulatorischen Untereinheit und sind der Lage, die Phosphoinositide an der 3-Position ihres Inositid-Ringes zu phosphorylieren. Dies führt zu einer Rekrutierung von Adaptorproteinen und Effektoren über eine PIP3-bindende Domäne wie die Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH) an die Plasmamembran und damit zu einer Komplexbildung (Guidetti et al., 2015; Laurent et al., 2014; Moroi & Watson, 2015). Abbildung 5 skizziert den Aufbau sowie die Aktivierung der AKT-Kinase schematisch.



**Abbildung 5: Aktivierung der AKT-Kinase durch die PI3-Kinase**, adaptiert nach (Guidetti et al., 2015; Woulfe, 2010). Die Signalübertragung verschiedener Rezeptoren führt zu einer Aktivierung der PI3-Kinase, welche PIP<sub>2</sub> in der Zellmembran zu PIP<sub>3</sub> umwandelt und so eine Bindung der AKT-Kinase ermöglicht. Durch eine zweifache Phosphorylierung via PDK1 und mTORC2 wird diese aktiviert, was in einer Thrombozytenaktivierung, -aggregation und Thrombusformation resultiert. Abkürzungen: PI3-Kinase= Phosphoinositid-3-Kinase, PIP<sub>2</sub>= Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, PIP<sub>3</sub>= Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat, PDK1= 3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase-1, PH= Pleckstrin-Homologie-Domäne, KD= katalytische Domäne, RD= regulatorische Domäne, mTORC2=cytosolic mammalian target of rapamycin complex2

Agonisteninduziert kommt es über verschiedene Rezeptoren zur Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). Diese wandelt primär Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in der Zellmembran zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP<sub>3</sub>) um, indem die 3-Position des Inositolrings des PIP<sub>2</sub> phosphoryliert wird. Durch die Bindung der AKT-Kinase mit ihrer PH-Domäne an die 3'-phosphorylierten Phosphatidylinositole wird die Kinase an die Zellmembran lokalisiert, wo sie in Kontakt mit zwei weiteren Kinasen kommt, die die Phosphorylierung

und damit die Aktivierung der AKT-Kinase katalysieren. An Thr308 in der katalytischen Domäne erfolgt eine Phosphorylierung durch die 3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase-1 (PDK1), welche ebenfalls durch die PH-Domäne an PIP3 binden kann. An Ser473, das sich in der regulatorischen Domäne befindet, erfolgt eine primär durch den cytosolic mammalian target of rapamycin complex2, mTORC2, katalysierte Phosphorylierung. Diese zweifache Phosphorylierung führt zur vollen AKT-Aktivierung und infolgedessen zur Granulasekretion sowie Thrombozytenaktivierung (Estevez & Du, 2017; Guidetti et al., 2015; Laurent et al., 2014; Woulfe, 2010). Thrombozyten exprimieren verschiedene Isoformen der PI3-Kinase, nämlich PI3K $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ , die bei der Aktivierung der AKT-Kinase beteiligt sind und jeweils durch verschiedene Agonisten und Rezeptoren stimuliert werden (Guidetti et al., 2015; Woulfe, 2010). Tabelle 2 zeigt hierzu eine Übersicht.

**Tabelle 2: Übersicht über die Isoformen der PI3-Kinase und ihre Rolle bei der Signalweiterleitung in Thrombozyten**, modifiziert nach (Hirsch et al., 2001; Laurent et al., 2014)

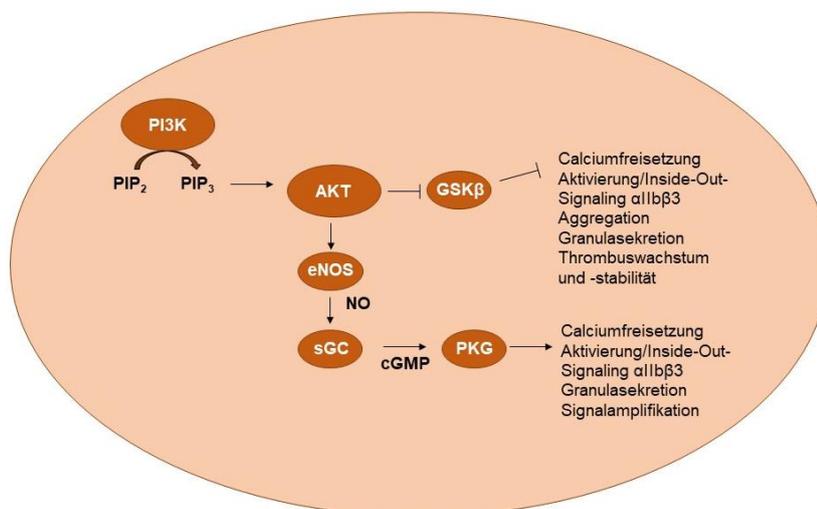
Isoform	Bedeutung
<b>PI3K<math>\beta</math></b>	Thrombusformation und -stabilität Kontrolle der AKT/GSK3-Achse Regulation, Erhalt der $\alpha$ IIb $\beta$ 3-Aktivierung Regulation der PLC $\gamma$ 2 und Ca <sup>2+</sup> -Mobilisation downstream von GPVI und $\alpha$ IIb $\beta$ 3 beteiligt an der Signalweiterleitung von GPVI, sowohl kooperativ mit PI3K $\alpha$ als auch nicht-redundant kooperative Rolle mit PI3K $\gamma$ bei der Signalweiterleitung von P2Y12
<b>PI3K<math>\gamma</math></b>	kooperative Rolle mit PI3K $\beta$ bei der Signalweiterleitung von P2Y12 relevante Rolle bei dem durch ADP induzierten Thromboembolismus
<b>PI3K<math>\alpha</math></b>	beteiligt an der Signalweiterleitung von GPVI, sowohl kooperativ mit PI3K $\beta$ als auch nicht-redundant

	Potenzierung der Thrombozytenaktivierung durch den IGF1-Rezeptor Geringer Effekt auf die AKT-Aktivierung
<b>PI3Ky</b>	Untergeordnete Rolle downstream des GPVI-Rezeptors

Neben dem gut charakterisierten Weg der AKT-Aktivierung via PI3-Kinase existieren PI3K-unabhängige Mechanismen der AKT-Aktivierung, welche jedoch noch spärlich charakterisiert sind (Woulfe, 2010). So zeigen Experimente, in denen alle Formen der PI3K gehemmt wurden, keine vollständige Unterdrückung der AKT-Phosphorylierung (Laurent et al., 2014). Stattdessen scheint bei diesen PI3K-unabhängigen Wegen die PLC, PKC und zytosolisches Calcium eine Rolle zu spielen, wobei der genaue Mechanismus noch genauer bestimmt werden muss. Dessen ungeachtet spielt die PI3K vermutlich die Hauptrolle bei der Signalübertragung durch die AKT-Kinase (Laurent et al., 2014).

Der AKT-Kinase nachgeschaltet sind verschiedene Effektoren, die beteiligt an der Granulasekretion und Thrombozytenaktivierung sind, unter anderem die Stickstoffoxidsynthase (NOS) sowie Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), wie in Abbildung 6 dargestellt. Durch die Aktivierung der AKT-Kinase kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung der NOS, wodurch der cGMP-Signalweg angestoßen wird. Dieser führt über die lösliche Guanylcyclase, cGMP, und die Proteinkinase G (PKG) zur Granulasekretion und GPIb-IX-abhängigen Thrombozytenaktivierung. Der NO-cGMP-PKG-Signalweg wirkt so biphasisch. Geringe Konzentrationen von endogen synthetisiertem NO und cGMP fördern die Plättchenaktivierung und steigern die Sensitivität von Thrombozytenrezeptoren wie GPIb-IX, ITAM-Rezeptoren und GPCRs gegenüber niedrig konzentrierten Agonisten. Hohe Konzentrationen von NO zeigen dagegen einen inhibitorischen Effekt auf die Thrombozytenaktivierung, hauptsächlich durch die cGMP-abhängige Steigerung des cAMPs, was zu einer Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase führt. Durch seine biphasische Rolle stellt der cGMP-Signalweg damit eine wichtige Rolle für die Regulation der Plättchenaktivierung dar (Estevez & Du, 2017). Die Serin-Threonin-Kinase GSK3 mit ihren Isoformen GSK $\alpha$  und

GSK $\beta$  spielt dagegen bei verschiedenen Wegen der Aktivierung eine unterschiedliche Rolle (Estevez & Du, 2017; Laurent et al., 2014). So wirkt GSK $\beta$  zum Beispiel inhibitorisch bei der Thrombin-induzierten Plättchenaktivierung oder beim Integrin-Outside-In-Signaling. Hier hemmt AKT durch eine Phosphorylierung die GSK3 $\beta$ , welche unghemmt eine negative Regulation des Plättchen-Spreadings, der Clotretraktion und der Thrombusstabilität induziert. Bei der durch Kollagen-induzierten Thrombozytenaktivierung scheint die GSK $\beta$  jedoch fördernd zu wirken (Estevez & Du, 2017). Der Mechanismus der GSK3 $\beta$ -Aktivierung sowie die Substrate der GSK sind noch nicht hinreichend geklärt (Estevez & Du, 2017; Laurent et al., 2014). Der PI3K/AKT/GSK3-Signalweg gilt jedoch als einer der Hauptwege zur Regulation der Signaltransduktion von Thrombozyten, vor allem bei der arteriellen Thrombusbildung unter hohem Scherstress. Damit stellt er ein potenzielles Ziel für weitere antithrombotische Therapien dar (Laurent et al., 2014).



**Abbildung 6: Downstream-Effektoren der AKT-Kinase**, adaptiert nach (Estevez & Du, 2017; Guidetti et al., 2015; Laurent et al., 2014; Li et al., 2010; Morello et al., 2008; Moroi & Watson, 2015; Stalker et al., 2012; Woulfe, 2010). Die Aktivierung der AKT-Kinase führt zur Aktivierung der Stickstoffsynthase und nachgeschaltet der Guanylylcyclase sowie Proteinkinase G, außerdem führt sie zu einer Hemmung der Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$ . Durch diese Mechanismen kommt es zur Aktivierung von  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, zur Thrombozytenaggregation, zur Granulasekretion und Signalamplifikation, einem Thrombuswachstum und einer Zunahme der Thrombusstabilität. Abkürzungen: eNOS= endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, sGC= lösliche Guanylylcyclase, cGMP= zyklisches Guanosinmonophosphat, PKG= Proteinkinase G, PI3K= Phosphoinositid-3-Kinase, PIP<sub>2</sub>= Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, PIP<sub>3</sub>= Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat

## 1.2 Thrombozytäre Erkrankungen

### 1.2.1 Angeborene Thrombozytopathien

Grundsätzlich lassen sich Blutungsstörungen bedingt durch Pathologien der Thrombozyten untergliedern in Thrombozytopenien, also Störungen aufgrund eines Mangels an Thrombozyten, sowie Thrombozytopathien, unter denen man Defekte der Thrombozytenfunktion versteht. Sowohl Thrombozytopenien als auch Thrombozytopathien können angeboren oder erworben sein. Thrombozytopathien lassen sich erneut untergliedern nach der betroffenen pathologischen Struktur. Es existieren Defekte der Plättchenrezeptoren, Storage-Pool-Diseases, also Defekte der  $\alpha$ -Granula, der  $\delta$ -Granula, der Lysosomen oder kombinierte Granuladefekte, Defekte des Zytoskeletts, Defekte der Plasmamembran, Signaltransduktionsdefekte oder Transkriptionsfaktordefekte (Althaus et al., 2020; Gothwal et al., 2014; Sandrock-Lang et al., 2016; Wagner et al., 2022). Zu den am besten charakterisierten Rezeptordefekten zählen das Bernard-Soulier-Syndrom, ein Defekt des GPIb-V-IX, sowie die Glanzman-Thrombasthenie, ein Defekt des  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. Defekte der Granula sind mit einer verminderten Anzahl oder reduzierten Inhaltstoffen der  $\alpha$ -Granula /  $\delta$ -Granula beziehungsweise einer Störung der Granulasekretion assoziiert, wie beispielsweise das Gray-Platelet-Syndrom ( $\alpha$ -Granula) oder das Hermansky-Pudlak-Syndrom ( $\delta$ -Granula). Zytoskelettale Defekte wie das Wiskott-Aldrich-Syndrom oder die MYH9-assoziierten Syndrome beeinträchtigen unter anderem die Plättchengröße und gehen häufig mit einer Thrombozytopenie einher (Sandrock-Lang et al., 2016; Wagner et al., 2022). Auch Defekte der Transkriptionsfaktoren wie die familiäre Thrombozytopenie mit malignen Assoziationen oder der GATA1-Defekt sind oft mit einer Verminderung der Thrombozytenzahl assoziiert. Außerdem können Defekte der bei der Signaltransduktion beteiligten Strukturen wie den G-Proteinen, den Phospholipasen oder anderen Enzymen vorliegen, welche die Thrombozytenfunktion beeinträchtigen (Wagner et al., 2022). Patienten<sup>1</sup> mit

---

<sup>1</sup> In dieser Arbeit wird um eine bessere Lesbarkeit zu gewährleisten auf das Verwenden von genderspezifischer Sprache verzichtet. Die Formulierungen beziehen sich hierbei gleichermaßen auf alle Geschlechter.

angeborenen Thrombozytenfunktionsdefekten können verschiedene Symptome aufzeigen, von Schleimhautblutungen wie Epistaxis oder Zahnfleischblutungen über Hämatome und Petechien bis hin zu lebensbedrohlichen Blutungen im Zuge von Operationen oder Traumata. Vor allem Frauen leiden häufig unter Menorrhagien und können schwere Blutungen nach der Menarche bekommen. Insbesondere bei älteren Patienten stellen vor allem gastrointestinale Blutungen eine ernstzunehmende Komplikation dar. Da die verschiedenen Thrombozytopathien jedoch mit ähnlichen Symptomen einhergehen können, ist es klinisch oft nicht möglich, diese voneinander zu unterscheiden. So bedarf es umfassender diagnostischer Maßnahmen, um die zugrundeliegende Ursache der Blutung auszumachen und infolgedessen die passende Behandlung einleiten zu können (Gothwal et al., 2014; Sandrock-Lang et al., 2016). Einen Überblick über die verschiedenen Defekte und ihre Charakteristika in der Diagnostik gibt Tabelle 3.

**Tabelle 3: Übersicht über die verschiedenen Thrombozytendefekte sowie ihre Diagnostik**, modifiziert nach (Althaus et al., 2011; Althaus et al., 2019; Althaus et al., 2020; Bakchoul & Hinz, 2017; Balduini et al., 2012; Deutch et al., 1993; Gothwal et al., 2014; Latger-Cannard et al., 2016; Li et al., 2019; Rosa et al., 2019; Sandrock-Lang et al., 2016; Satta et al., 1997; Saultier et al., 2017; Schlegelberger & Heller, 2017; Songdej & Rao, 2015; van Geffen et al., 2016; Wagner et al., 2022). Abkürzungen: IF= Immunfluoreszenz-Mikroskopie, IB= Immunoblot (Westernblot), vWF= von-Willebrand-Faktor, TxA<sub>2</sub>= Thromboxan A<sub>2</sub>, EM=Elektronenmikroskopie, RUNX1= Runt-related transcription factor 1, FLI1= friend leukemia integration 1

Defekte Struktur	Syndrom	Molekularer Mechanismus	Blutungs-symptome	Plättchen-zahl (x10 <sup>9</sup> /l)	Plättchen-struktur	Abnormalität in der LTA	Abnormalität in der Durchflusszytometrie	Weitere Diagnostik
Thrombozytäre Rezeptoren	<b>Bernard-Soulier-Syndrom (BSS)</b>	reduzierte oder fehlende Expression bzw. Dysfunktion des GPIIb-IX-V	moderat bis ernst	20-100	Riesenplättchen	normale Aggregation mit allen Agonisten, fehlende Agglutination mit Ristocetin	GPIIb-V-IX-Komplexe reduziert oder fehlend	IB, IF, genetische Testung
	<b>Glanzman Thrombasthenie (GT)</b>	reduzierte oder fehlende Expression bzw. Dysfunktion des αIIbβ3	moderat bis ernst	normal	normal	fehlende Aggregation mit ADP, Epinephrin, Kollagen und Thrombin, normale Agglutination mit Ristocetin	αIIbβ3-Komplexe reduziert oder fehlend	IB, IF, genetische Testung

	<b>Von-Willebrand-Syndrom vom Plättchentyp (vWD)</b>	verstärkte Affinität des GPIb-V-IX-Rezeptors für den vWF	moderat	normal bis erniedrigt	heterogene Plättchengröße	verstärkte Agglutination mit Ristocetin bei niedrigen Konzentrationen	verstärkte Bindung des vWF an den GPIb-V-IX-Komplex	genetische Testung
	<b>GPVI-Kollagen-Rezeptor-Defekt</b>	reduzierte oder fehlende Expression bzw. Dysfunktion des GPVI, beeinträchtigte Aktivierung durch Kollagen	mild	normal	normal	reduzierte oder fehlende Aggregation nach Induktion mit Kollagen, CRP oder Convulxin	GPVI reduziert oder fehlend	IB, IF, genetische Testung
	<b><math>\alpha 2\beta 1</math>-Kollagen-Rezeptor-Defekt</b>	reduzierte oder fehlende Expression bzw. Dysfunktion des $\alpha 2\beta 1$ , beeinträchtigte Adhäsion an Kollagen	mild	normal	normal	reduzierte oder fehlende Aggregation nach Induktion mit Kollagen, CRP oder Convulxin	$\alpha 2\beta 1$ -Komplex reduziert oder fehlend	IB, IF, genetische Testung
	<b>P2Y12-Rezeptor-Defekt</b>	reduzierte oder fehlende Expression bzw. Dysfunktion des P2Y12-Rezeptors	mild	normal	normal	kleine, instabile Aggregate nach Induktion mit ADP, normale Aggregation mit hohen	unklar	unklar

						Thrombinkonzentrationen		
<b>α-Granula-Defekte (α-SPD)</b>	<b>z.B. Gray Platelet Syndrome (GPS), Quebec Platelet Syndrom (QPD), Paris-Trosseau-Syndrom,</b>	fehlende/leere α-Granula, Granulasekretionsdefekt, bei Paris-Trosseau-Syndrom vermehrte α-Granula mit Sekretionsdefekt	mild bis moderat	normal bis erniedrigt	verminderte/leere bzw. vermehrte α-Granula, tw. vergrößerte Plättchen	kein einheitliches Muster	reduzierte CD62P-Expression nach Aktivierung, variabler Phänotyp	Blutausstriche, IF; genetische Testung
<b>δ-Granula-Defekte</b>	<b>z.B. Hermansky-Pudlak-Syndrom, Chediak-Higashi-Syndrom (CHS)</b>	fehlende δ-Granula bzw. Granulasekretionsstörung	moderat bis schwer	normal	verminderte δ-Granula	verminderte Aggregation nach Induktion mit ADP, fehlende bzw. reduzierte zweite Welle der Aggregation	reduzierte CD63-Expression nach Aktivierung	ATP-Freisetzung, Mepacrin-Aufnahme, IF, EM, genetische Testung
<b>αδ-Granula-Defekte</b>	<b>X-chromosomale dyserythropoetische Anämie mit Thrombozytopenie/ X-Chromosomale Makrothrombozytopenie</b>	verminderte α- und δ-Granula, Granulasekretionsstörung	moderat	meist vermindert	verminderte δ-Granula, variable α-Granula, vergrößerte Plättchen	verminderte Aggregation, kein einheitliches Muster	reduzierte CD63- und CD62P-Expression nach Aktivierung, kein	Blutausstriche, Mepacrin-Aufnahme, IF, EM, genetische Testung, ATP-Freisetzung

							einheitliches Muster	
<b>Zytoskelett</b>	<b>Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS)</b>	Mikrothrombozytopenie, assoziiert mit Immundefizienz (Neutropenie), ekzematöse Dermatitis, blutige Diarrhoe, Arthritis	moderat bis schwer	10-100	verminderte Granula, verkleinerte Plättchen	normal/ verminderte Aggregation	normal	Blutausstriche), genetische Testung
	<b>Filamin A-Defekt</b>	Makrothrombozytopenie	variabel	variabel	vergrößerte Plättchen	verminderte Aggregation nach Induktion mit Convulxin	normal	IF (nur ein geringer Teil der Thrombozyten besitzt kein Filamin A)
	<b>MYH9(Myosin-heavychain-9)-assozierte Störungen (May-Heglin-Anomalie, Fechtner-Syndrom, Epstein-Syndrom, Sebastian-Platelet-Syndrom)</b>	Makrothrombozytopenie, reduzierte Thrombusstabilität und Clotretaktion durch Mutation der nichtmuskulären schweren Myosinkette IIA, einem kontraktilen Protein des Zytoskeletts	mild	30-100	vergrößerte Plättchen (Riesenthrombozyten), große Vakuolen	fehlende Formänderung nach Induktion mit Kollagen, nahezu normale Aggregation	normal	IF (Einschlusskörperchen=MYH9-Aggregate in den Neutrophilen), Blutausstriche, EM, genetische Testung (MYH9-Sequenzierung)

<b>Transkriptionsfaktoren-Defekte</b>	<b>Familiäre Thrombozytopenie mit malignen Assoziationen</b>	Mutationen in RUNX1	mild	mild bis moderate Thrombozytopenie (50-150x 10 <sup>9</sup> /l), gelegentlich auch normal	normal	kein einheitliches Muster	normal	Vorhandensein des MYH10 in Thrombozyten, IF, IB; genetische Testung
	<b>FLI1-assoziiertes Granuladefekt</b>	Defekt in FLI1	variabel	vermindert	vergrößerte Plättchen	kein einheitliches Muster	normal	Vorhandensein des MYH10 in Thrombozyten, IF, IB, genetische Testung
	<b>GATA1-Defekt</b>	Thrombozytopenie und Thrombozytenfunktionsstörung aufgrund von Defekt in GATA1, einem Transkriptionsfaktor, der wichtig für die Megakaryopoese und Erythropoese ist	variabel	vermindert	variabel	kein einheitliches Muster, verminderte Aggregation nach Induktion mit Ristocetin, geringere Aggregation nach Induktion mit Kollagen	normal	Blutausstriche (Makrothrombozytopenie), genetische Testung

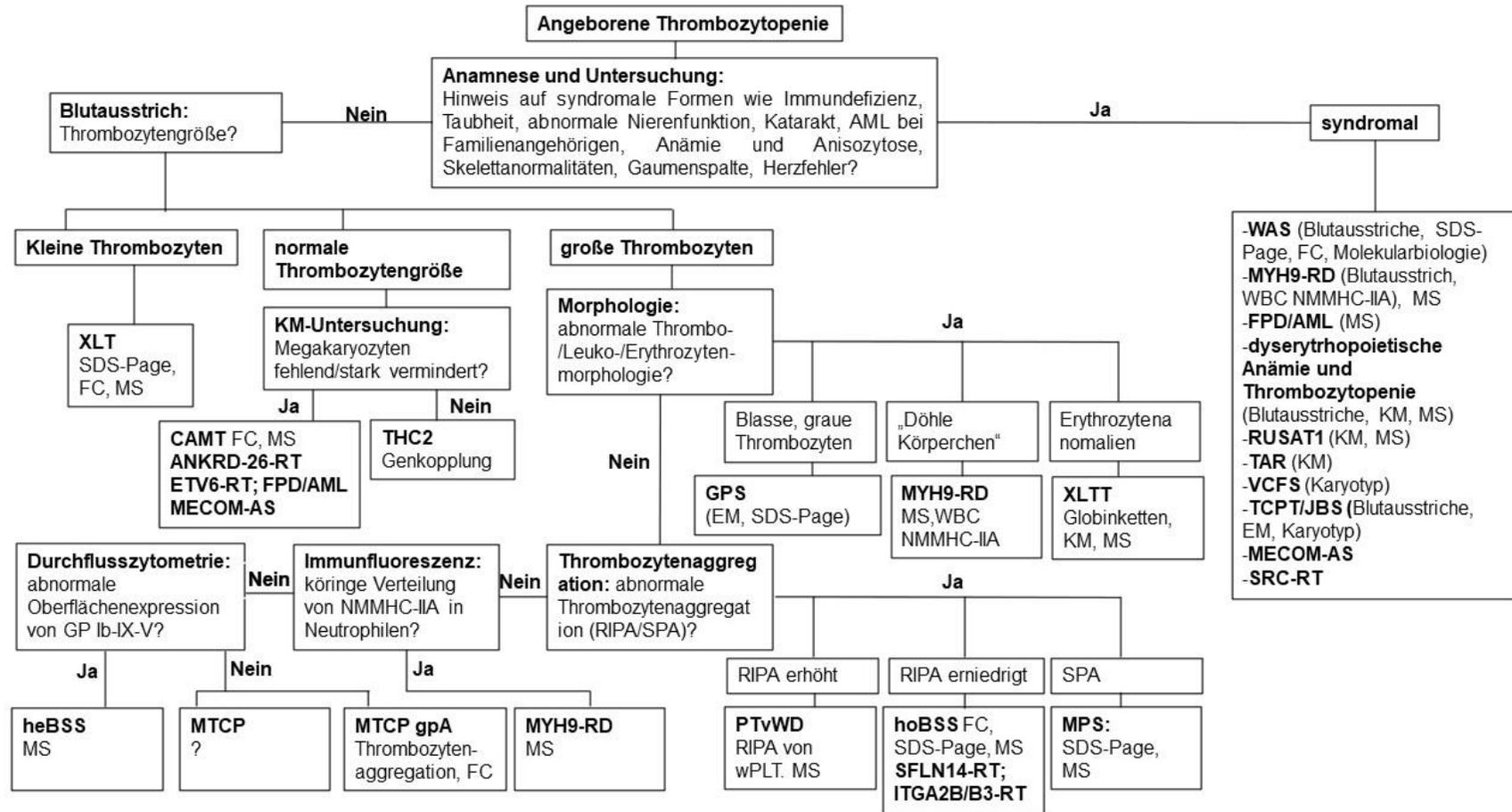
	<b>ETV6-Defekt</b>	Defekt in ETV6, führt zu leichter Thrombozytopenie	mild	vermindert	normal	kein einheitliches Muster	normal	Vorhandensein des ETV6 in Thrombozyten, IF, IB, genetische Testung
<b>Signaltransduktionsdefekte</b>	<b>G-Protein-Defekt</b>	durch eine Reduktion der mit den GPCRs (PAR1, PAR4, P2Y12, P2Y1, TP, 5HT2-R, Epinephrinrezeptor) assoziierten G-Proteine	variabel	normal	normal	kein einheitliches Muster	kein einheitliches Muster	genetische Testung
	<b>Phospholipase-Defekt</b>	Defekt der zytosolischen Phospholipase A2 $\alpha$ oder der Phospholipase C	variabel	normal	normal	kein einheitliches Muster	kein einheitliches Muster	genetische Testung
	<b>Aspirin-Like-Defekt</b>	Defekt des Cyclooxygenase-Pathways (Defekt der COX1-Enzyme oder der Thromboxansynthese)	variabel	normal	normal	verminderte oder fehlende Aggregation nach Induktion mit Arachidonsäure (Epinephrin, Kollagen), optional fehlende	normal	TxA <sub>2</sub> -Messung, genetische Testung

						zweite Welle nach Induktion mit ADP		
<b>Defekte der Phospholipid- membran</b>	<b>Scott-Syndrom</b>	verminderte Expression der negativ geladenen Phospholipide in aktivierten Thrombozyten	mild	normal	variabel	normal	verminderte Annexin-Bindung	reduzierte Thrombingeneration
	<b>Stormorken-Syndrom</b>	gesteigerte Expression der negativ geladenen Phospholipide in ruhenden Thrombozyten	mild	vermindert	erniedrigt	normal	gesteigerte Annexin-Bindung	gesteigerte Thrombingeneration

### **1.2.2 Angeborene Thrombozytopenien**

Zwischen angeborenen Thrombozytopathien und -penien lässt sich oft nicht klar differenzieren, da sie, wie in Tabelle 3 dargestellt, auch kombiniert auftreten können. Das Wissen über angeborene Thrombozytopenien ist in den letzten Jahrzehnten stark gewachsen. Zahlreiche neue Formen, basierend auf neu detektierten Mutationen, wurden identifiziert und erfordern immer wieder Anpassungen der diagnostischen Algorithmen. Dennoch bleiben immer noch ungefähr die Hälfte der Patienten mit angeborenen Thrombozytopenien ohne finale Diagnose (Balduini et al., 2012; Bourguignon et al., 2022). Aktuell sind circa 45 verschiedene Formen von angeborenen Thrombozytopenien bekannt mit einer großen Variabilität an klinischen Erscheinungsbildern und Prognosen. Sie können sich in einer reinen Thrombozytopenie äußern, mit anderen angeborenen Defekten einhergehen oder eine Prädisposition für den Erwerb weiterer Erkrankungen im Laufe des Lebens mit sich bringen (Pecci & Balduini, 2021). Zu den häufigsten Formen der angeborenen Thrombozytopenien zählen die oben bereits genannte MYH9-assoziierte Thrombozytopenie (MYH9-RD) sowie die ANKRD26-assoziierte Thrombozytopenie. Trotz Mutationen im gleichen Gen kann die Klinik sehr variieren. Grundsätzlich lassen sich angeborene Thrombozytopenien nach dem Vererbungsmuster, den Symptomen, die sich neben der Thrombozytopenie zeigen, oder der Plättchengröße klassifizieren. Dabei kann die Thrombozytengröße bei angeborenen Thrombozytopenien vergrößert, verkleinert oder normal sein. Patienten mit angeborenen Thrombozytopenien zeigen ähnliche Symptome wie erworbene Thrombozytopenien oder Thrombozytopathien, zum Beispiel Schleimhautblutungen, Hämatome, Nasenbluten, Menorrhagie oder gastrointestinale Blutungen. Bei Thrombozytenzahlen unter  $20-30 \times 10^9/l$  können spontane Blutungen von Geburt an auftreten, meistens ist die Thrombozytopenie jedoch eher mild ausgeprägt und Blutungen treten eher selten und vorwiegend nach Traumata oder invasiven Eingriffen auf. Es gilt jedoch zu beachten, dass die Blutungstendenz nicht immer mit dem Ausmaß der Thrombozytopenie korreliert, da nicht selten kombinierte Thrombozytenfunktionsdefekte vorliegen (Balduini et al., 2012). So ist eine klare Differenzierung zwischen Thrombozytopenien und Thrombozytopathien oft nicht möglich, was unter anderem am Beispiel des

Bernard-Soulier-Syndroms oder den MYH9-assoziierten Erkrankungen (MYH9-RD) gut zu erkennen ist. Obwohl bei den bislang bekannten angeborenen Thrombozytopenien die zugrundeliegenden Mutationen identifiziert wurden, ist der genaue Mechanismus, der für die Entstehung der Thrombozytopenie verantwortlich ist, noch nicht genau bekannt. Es existieren verschiedene Hypothesen. In den meisten Fällen befinden sich Defekte in den Mechanismen, die die Megakaryozytenreifung und Proplättchenformation regulieren und so zu einer verringerten Plättchenproduktion führen. Aber auch Defekte der Festlegung der Stammzellen sowie der Megakaryoztendifferenzierung mit einhergehender verminderter Anzahl der sich im Knochenmark befindenden Megakaryozyten können ursächlich sein, ebenso in seltenen Fällen eine kürzere Lebensspanne der Thrombozyten (Balduini et al., 2012). Die Diagnose angeborener Thrombozytopenien stellt oftmals eine Herausforderung dar. Gerade milde Formen werden häufig erst im späten Kindes- oder Erwachsenenalter diagnostiziert. Nicht selten sind durch de-novo-Mutationen keine weiteren Familienmitglieder betroffen, was den Verdacht einer nicht-genetischen Störung nahelegt. Bei Thrombozytopenien mit großen Thrombozyten wie das BSS oder die MYH9-RD wird außerdem häufig durch automatische Zellzähler die eigentliche Thrombozytenzahl unterschätzt. Dies birgt das Risiko der Fehldiagnose einer schweren Immunthrombozytopenie (Balduini et al., 2012). Aus diesem Grund ist eine mikroskopische Beurteilung des Blutausstriches für die Diagnose essenziell, bei der morphologische Auffälligkeiten der Thrombozyten und anderer Zellreihen besser beurteilt werden können (Balduini et al., 2012; Ballmaier et al., 2006). Zudem ist eine ausführliche Anamnese sowie eine gute klinische Untersuchung von großer Bedeutung, vor allem bei syndromatischen Formen der Thrombozytopenie. Insbesondere um spezifische Formen der angeborenen Thrombozytopenie zu diagnostizieren sind neben klinischen Untersuchungen und der Evaluation der Plättchengröße auch Messungen der in-vitro-Plättchenaggregation sowie durchflusszytometrische Bestimmungen der thrombozytären Glykoproteine, Immunfluoreszenzfärbungen, Knochenmarksuntersuchungen und genetische Untersuchungen hilfreich (Balduini et al., 2012; Ballmaier et al., 2006; Pecci & Balduini, 2021). Abbildung 7 gibt einen Überblick über die verschiedenen angeborenen Thrombozytopathien und ihre Diagnostik.



28

**Abbildung 7: Übersicht über die Diagnostik von angeborenen Thrombozytopenien**, modifiziert nach (Balduini et al., 2003; Ballmaier et al., 2006; Pecci & Balduini, 2021), Abkürzungen: XLT= X-chromosomale Thrombozytopenie; CAMT= kongenitale amegakaryozytäre Thrombozytopenie; ANKRD-26-RT= ANKRD26-assoziierte Thrombozytopenie; ETV6-RT=ETV6-assoziierte Thrombozytopenie; FDP/AML=familiäre Thrombozytopenie mit Prädisposition für AML; MECOM-AS= MECOM-assoziiertes Syndrom; THC2= Chromsom-10p-assoziierte Thrombozytopenie; he/hoBSS= heterozygotes/homozygotes Bernard-Soulier-Syndrom; MTCP= benigne mediterrane Thrombozytopenie; MTCP gpA= Makrothrombozytopenie mit Glykophorin-A-Expression; MYH9-RD= MYH9-assoziierte Thrombozytenstörung; GPS=Gray-Platelet-Syndrom; XLTT=X-chromosomale Thrombozytopenie mit  $\beta$ -Thalasämie; PTvWD= Plättchentyp/Pseudo-von-Willebrand-Syndrom; SFLN14-RT= SFLN14-assoziierte Thrombozytopenie; ITGA2B/ITGB3-assoziierte Thrombozytopenie; MPS=Montreal-Platelet-Syndrom; WAS= Wiskott-Aldrich-Syndrom; RUSAT1= radioulnare Synostose mit amegakaryozytärer Thrombozytopenie 1; TAR= Thrombozytopenie mit fehlendem Radius; VCFS= velocardiofaziales Syndrom; TCPT= Paris-Trosseau-Syndrom; JBS= Jacobsen's Syndrom;; SRC-RT= SRC-assoziierte Thrombozytopenie; KM= Knochenmark(untersuchung); EM= Elektronenmikroskopie; WBC= weiße Blutzellen; MS= Mutationsscreening; FC= Durchflusszytometrie

### 1.2.3 Erworbene Thrombozytopathien

Erworbene Thrombozytenfunktionsdefekte entstehen häufig durch Medikamente, durch medizintechnische Methoden wie die extrakorporale Membranoxygenierung, auf der Basis von hämatologischen Grunderkrankungen (z.B. myeloproliferative Erkrankungen) oder durch ein Nierenversagen (Konkle, 2011). Tabelle 4 stellt mögliche Ursachen erworbener Thrombozytenfunktionsdefekte dar.

**Tabelle 4: Mögliche Ursachen erworbener Thrombozytenfunktionsdefekte,** modifiziert nach (Konkle, 2011)

➤ **Medikamente**

- COX1-Inhibitoren wie Aspirin, Ibuprofen, Naproxen, Diclofenac, Indomethacin, Ketorolac
- Thienopyridine (P2Y<sub>12</sub>-Antagonisten) wie Clopidogrel, Prasugrel, Ticagrelor, Ticlopidin
- αIIbβ3-Inhibitoren wie Abciximab, Tirofiban, Eptifibatid
- Phosphodiesterasehemmer wie Dipyridamole, Clostazol, Sildenafil, Koffein, Theophyllin,
- Antikoagulantien wie Heparine, thrombolytische Wirkstoffe wie Streptokinase, Urokinase, t-PA; antifibrinolytische Wirkstoffe wie ε-Aminocapronsäure
- Beta-Laktam-Antibiotika wie Ampicillin, Cephalosporine
- Nitrate, Beta-Blocker, Calcium-Kanal-Blocker, ACE-Hemmer, AT1-Antagonisten
- HMG-CoA-Inhibitoren wie Statine oder Fibrate
- Psychopharmaka wie trizyklische Antidepressiva, Phenothiazine, selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI)
- Chemotherapeutika wie Mithramycin, Daunorubicin, Hochdosischemotherapien mit Cisplatin oder Melphalan
- Radiologische Kontrastmittel
- Antihistaminika
- Plasmaexpander

- Anästhetika wie Procain, Lidocain
- **Pflanzliche Nahrungsergänzungsmittel und Nahrungsmittel**  
z.B. Ingwer, Knoblauch, Zwiebel, Ginko, Heidelbeeren, chinesische Engelwurz, Mutterkraut, Ginseng, Kurkuma, Cumin, Nelken, Vitamin E, echtes Mädesüß, Silberweide, Alkohol, Aronox, Delphinol, Fruitflow
- **Nierenversagen**
- **Medizinische Therapien wie kardiopulmonale Bypässe, extrakorporeale Membranoxygenierung**
- **Myeloproliferative Erkrankungen**
- **Myelodysplastische Syndrome**
- **Paraproteinämien**
- **Antikörperinduzierte Thrombozytendysfunktion**

Medikamente und Nahrungsergänzungsmittel können eine Inhibition der Plättchenfunktion sowohl als Therapieziel als auch als Nebeneffekt aufweisen. Ein prominentes Beispiel hierfür ist der COX1-Inhibitor Aspirin, welcher die Umwandlung von Arachidonsäure zu Thromboxan A<sub>2</sub> hemmt und damit in die Signalweiterleitung eingreift. Medikamenteninduzierte Thrombozytenfunktionsdefekte stellen in der heutigen Gesellschaft die häufigsten erworbenen Plättchendysfunktionen dar, sowohl durch bewusste Thrombozyteninhibition als auch durch eine Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion durch Nebenwirkungen von Medikamenten wie NSAIDs, Antibiotika oder SSRIs (Konkle, 2011; Scharf, 2012). Wie oben dargestellt können auch Nahrungsmittel und Nahrungsergänzungsmittel oder Alkohol einen inhibitorischen Effekt auf die Thrombozytenfunktion haben. Ihre klinische Bedeutung ist aber bislang aufgrund zu weniger aussagekräftiger Studien noch nicht belegt (Konkle, 2011; Olas, 2018). Ebenso kann ein Nierenversagen die Thrombozytenfunktion beeinträchtigen und so zu einer verlängerten Blutungszeit führen. Medizinische Therapien mit artifiziellen Membranen wie ein kardiopulmonaler Bypass (CPB) oder die extrakorporeale Membranoxygenierung (ECMO) können sowohl zu Thrombozytopenien als auch zu Thrombozytenfunktionsdefekten führen, unter anderem durch eine geringere Verfügbarkeit von Agonisten. Dabei können zugrundeliegende Vorerkrankungen wie

myeloproliferative Erkrankungen den Effekt verstärken. Sie sind sowohl mit Thrombosen als auch mit Blutungskomplikationen assoziiert. Patienten mit myelodegenerativen Erkrankungen wie der Myelodysplasie leiden dagegen unter einer zu geringen Thrombozytenzahl, oftmals in Kombination mit dysfunktionalen Thrombozyten aufgrund ineffizienter Thrombopoese. Erkrankungen, die mit der Bildung von Paraproteinen einhergehen, beispielsweise das Multiple Myelom oder der Morbus Waldenström, können ebenfalls die Hämostase beeinträchtigen und durch eine Adhäsion der unspezifischen Immunglobuline an die Plättchenoberfläche zu einer Dysfunktion führen. Des Weiteren kann es induziert durch Autoantikörper zu Thrombozytendysfunktionen kommen, worauf im nächsten Kapitel genauer eingegangen wird. Für die Diagnose von Patienten mit Thrombozytenfunktionsdefekten ist es daher sinnvoll, die Medikation zu erfragen, eine ausführliche Anamnese zu erheben und Labortestungen durchzuführen (Konkle, 2011).

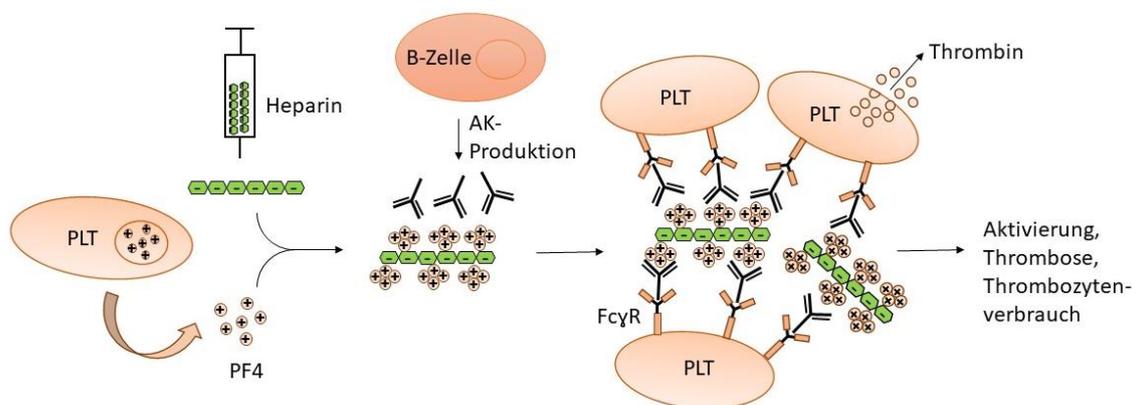
#### **1.2.4 Erworbene Thrombozytopenien**

Erworbene Thrombozytopenien können verschiedene Ursachen haben. So können Knochenmarkserkrankungen, die Immunthrombozytopenie, die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP), das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS), aber auch Viren wie HIV, das Hepatitis-C-Virus oder Bakterien wie *Helicobacter pylori* sowie verschiedene Medikamente zu Thrombozytopenien führen (Lassila, 2016). Bei durch Medikamente verursachten Thrombozytopenien werden immunvermittelte von nicht-immunvermittelten Mechanismen unterschieden. Während letztere auf der direkten Toxizität von Medikamenten beruhen, entstehen immunvermittelte Thrombozytopenien durch die Bildung von Antikörpern gegen Glykoprotein-Komplexe auf der Thrombozytenoberfläche. Dies führt zu einem vermehrten Verbrauch, einer Zerstörung der Thrombozyten oder einer beeinträchtigten Thrombozytenproduktion, was je nach Krankheitsbild mit Blutungen oder thromboembolischen Komplikationen assoziiert sein kann (Marini et al., 2022). Im Folgenden soll auf zwei Beispiele einer erworbenen Thrombozytopenie näher eingegangen werden.

#### 1.2.4.1 Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT)

Die Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) ist eine durch Antikörper vermittelte Thrombozytopenie, die als unerwünschte Arzneimittelreaktion des Heparins auftritt. Sie geht mit einem erhöhtem Thromboserisiko sowohl im venösen als auch im arteriellen System einher und kann zu lebensbedrohlichen Komplikationen wie Schlaganfällen, Herzinfarkten oder Lungenarterienembolien führen (Greinacher, 2003; Thiele et al., 2010). Es werden zwei Formen der Heparin-induzierten Thrombozytopenie unterschieden. Die nichtimmunologische Heparin-induzierte Thrombozytopenie (auch HIT Typ 1 genannt) basiert auf der Bindung des stark negativ geladenen Heparins an positiv geladene Proteine, die unter anderem auf der Oberfläche von Thrombozyten vorkommen. Die Bindung des Heparins an GPIIb/IIIa-Komplexe führt zu einer Potenzierung des Outside-In-Signalings und folglich zu einem Abfall der Thrombozyten. Dieser tritt typischerweise ein bis zwei Tage nach Behandlungsbeginn mit unfraktioniertem Heparin auf, allerdings ist der Thrombozytenabfall gering ausgeprägt (unter 30 %) und die Thrombozytenzahl normalisiert sich in der Regel unter weiterer Heparin-gabe von selbst. Davon zu unterscheiden ist die immunologische Heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT Typ 2) (Greinacher, 2003; Marini et al., 2022). Ihre Pathogenese wird in Abbildung 8 dargestellt. Sie basiert auf der Bildung von Antikörpern, vor allem der Klasse IgG, gegen ein Neoantigen. Dieses wird durch die Komplexbildung von negativ geladenen Heparinmolekülen und positiv geladenem PF4 aus den Speichergranula der Thrombozyten gebildet. Durch die mehrfache Bindung dieser Antikörper an Ketten aus repetitiven Antigenen entstehen Plättchenfaktor-4/Heparin/IgG-Immunkomplexe. Die IgG-Antikörper können über ihren Fc-Teil an die Fc- $\gamma$ -IIa-Rezeptoren der Thrombozyten binden, diese vernetzen und damit zu einer intravasalen Thrombozytenaktivierung und -aggregation führen, was zu einer Thrombozytopenie sowie einer Aktivierung der Gerinnungskaskade auf der Thrombozytenoberfläche mit konsekutiver Thrombinfreisetzung und Thrombusformation führt. Zudem können die PF4/Heparin/IgG-Komplexe auch Monozyten, neutrophile Granulozyten und Endothelzellen aktivieren, was die Thrombus- und Thrombinbildung verstärkt (Thiele et al., 2010). Diese Prozesse erklären die scheinbar paradoxe Thromboseneigung von HIT-Patienten

auf das antikoagulatorisch wirksame Heparin (Bakchoul, 2016). Die Immunogenität des Antigens ist dabei von der Länge der Heparinmoleküle abhängig. So können sich bei längererkettigen Heparinmolekülen größere Komplexe ausbilden, welche wiederum mehr PF4/Heparin-Antikörper binden. Durch die größeren Immunkomplexe können außerdem mehr Thrombozyten über Fc- $\gamma$ -IIa-Rezeptoren vernetzt werden, wodurch das Ausmaß der Thrombozytenaktivierung steigt. Dies erklärt das größere HIT-Risiko für unfraktionierte Heparine (UFH) im Gegensatz zu niedermolekularen Heparinen. Neben der Art des Heparins hängt das Risiko für eine HIT zudem von der Grunderkrankung und dem Ausmaß des Eingriffs ab. (Thiele et al., 2010). Nahezu die Hälfte der akuten HIT-Patienten entwickelt thromboembolische Komplikationen. Am häufigsten ist hier die tiefe Beinvenenthrombose. Da die Komplikationen nicht immer symptomatisch sind und es auch vorkommen kann, dass das thrombotische Ereignis dem Thrombozytenabfall ein bis drei Tage vorausgeht, ist die Diagnose einer HIT nicht immer einfach und erfordert eine gründliche Untersuchung sowie Diagnostik (Bakchoul, 2016; Marini et al., 2022).



**Abbildung 8: Pathophysiologie der Heparin-induzierten Thrombozytopenie Typ 2**, adaptiert nach (Greinacher, 2003; Marini et al., 2022). Bei der Heparin-induzierten Thrombozytopenie Typ 2 kommt es zur Antikörperbildung gegen PF4/Heparin-Komplexe. Diese binden über den Fc $\gamma$ R an die Thrombozyten und führen zur Aktivierung, Thrombose und zum Verbrauch von Thrombozyten. Abkürzungen: PLT=Thrombozyt, PF4= Plättchenfaktor 4, AK=Antikörper

Zur Abschätzung der Wahrscheinlichkeit einer Heparin-induzierten Thrombozytopenie Typ II kann der 4-T-Score herangezogen werden. Der Score beurteilt als Kriterien das Ausmaß der Thrombozytenabfalls, die absolute Thrombozytenzahl, den zeitlichen Zusammenhang des Auftretens des Thrombozytenabfalls mit der Heparin-gabe, klinische Erscheinungen und thromboembolische Komplikationen sowie das Vorliegen möglicher anderer Gründe für eine Reduktion der Thrombozytenzahl (siehe Tab. 5). Basierend auf diesem Score wird anhand der Gesamtpunktzahl die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer HIT als niedrig (0-3 Punkte), mittel (4-6 Punkte) oder hoch (7-8 Punkte) eingestuft (Thiele et al., 2010; Zeleznik et al., 2021).

**Tabelle 5: 4-T-Score**, adaptiert nach (Bakchoul, 2016; Thiele et al., 2010)

4 Ts	2 Punkte	1 Punkt	0 Punkte
Thrombozytopenie	Thrombozytenabfall über 50 % und niedrigster Thrombozytenwert $>20 \times 10^9/l$	Thrombozytenabfall 30-50 % oder niedrigster Thrombozytenwert $10-19 \times 10^9/l$	Thrombozytenabfall unter 30 % oder niedrigster Thrombozytenwert $<10 \times 10^9/l$
Zeitpunkt des Auftretens des Thrombozytenabfalls	zwischen Tag 5 und 10 bzw. $\leq 1$ bei vorheriger Heparin-gabe (in den letzten 30 Tagen)	nach Tag 10 oder $\geq 1$ bei vorheriger Heparin-gabe (30-90 Tage)	unter 4 Tage bzw. über 14 Tage nach Heparin-gabe
Thrombosen oder andere Komplikationen	gesicherte neue Thrombose, anaphylaktische Reaktion nach Heparin-bolus oder Hautnekrose	nicht gesicherter Verdacht auf Thrombose oder nicht nekrotisierende Hautläsion	keine
Andere Ursachen der Thrombozytopenie	nicht vorhanden	möglich	definitiv

Charakteristisch für die HIT Typ2 ist ein Thrombozytenabfall von über 50 % innerhalb von ein bis zwei Tagen. Dieser tritt in der Regel 5-14 Tage nach Beginn einer Heparintherapie auf. Bei erst kurz zurückliegender vorheriger Heparinabgabe innerhalb der letzten 100 Tage kann es jedoch durch bereits vorhandene PF4/Heparin-Antikörper schon innerhalb der ersten 24h nach Reexposition mit Heparin zu einem Thrombozytenabfall kommen („Rapid Onset Hit“). Bei einem 4T-Score  $\geq 4$  und dem Verdacht auf eine HIT ist eine Labordiagnostik zur Diagnosesicherung sinnvoll. Generell gibt es zwei Möglichkeiten, eine HIT nachzuweisen. Zum einen lassen sich PF4/Heparin-Antikörper mittels Enzymimmunoassays (ELISA) sowie partikel-basierten Immunoassays nachweisen, zum anderen gibt es funktionelle Tests wie den Heparin-induzierten Plättchen-Aktivierungsassay (HIPA) oder den Serotoninfreisetzungstest (SRA, engl. „serotonin-release assay“), die thrombozytenaktivierende, Heparin-abhängige Antikörper nachweisen. Die Enzymimmunoassays zur Detektion von Antikörpern sind mittlerweile weit verbreitet und haben einen hohen negativen prädiktiven Wert, sodass sie geeignet sind für den Ausschluss einer HIT. Obwohl der Wert der optischen Dichte dieser Tests mit der Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins einer HIT korreliert, haben sie nur eine geringe Spezifität und sind damit allein nicht ausreichend für die Diagnose einer HIT. Bei einem positiven Antikörpernachweis bedarf es der funktionellen Tests, die die Thrombozytenaktivierungsfähigkeit der Antikörper gegen PF4/Heparin-Komplexe beurteilen und so einen höheren positiven prädiktiven Wert und eine höhere Spezifität für klinisch bedeutsame thrombozytenaktivierende Antikörper besitzen. Diese Tests sind jedoch nur in Speziallaboren durchführbar. Sowohl für den HIPA als auch den SRA, die den Goldstandard für die Diagnostik einer HIT darstellen, werden gewaschene Thrombozyten benötigt und die Durchführung der Tests bedarf ausreichend gesunden Spendermaterials sowie fachlicher Expertise in der Durchführung (Bakchoul, 2016; Marini et al., 2022; Thiele et al., 2010). Der Algorithmus für die Diagnose einer Heparin-induzierten Thrombozytopenie besteht also aus der Einschätzung der klinischen Wahrscheinlichkeit (z.B. durch den 4-T-Score), einem Antikörpernachweis durch Immunoassays sowie einem funktionellen Test bei positivem Antikörpernachweis. Da die PF4/Heparin-Antikörper rasch abnehmen und nach 30 Tagen in der Regel

nicht mehr nachweisbar sind, ist nur eine unmittelbare Diagnose möglich. Eine Untersuchung mit zeitlichem Abstand zum Ausschluss einer anamnestisch berichteten HIT ist dagegen nicht sinnvoll (Thiele et al., 2010).

Besteht der starke klinische Verdacht auf eine HIT Typ 2, sollte das Heparin unmittelbar abgesetzt und ein alternatives Antikoagulans angesetzt werden, um die Bildung weiterer Thromben zu verhindern. Hierfür kommen direkte Thrombininhibitoren wie Lepirudin, Bivalirudin oder Argatroban sowie indirekte Faktor-Xa-Inhibitoren wie Danaparoid oder Fondaparinux infrage (Bakchoul, 2016; Thiele et al., 2010). Diese alternativen Antikoagulantien sind jedoch kostenaufwändiger, finden seltener klinische Anwendung und gehen mit einem erhöhten Blutungsrisiko einher, weshalb die Unterscheidung zwischen funktionell relevanten HIT-Antikörpern von lediglich im Plasma vorhandenen nicht relevanten PF4/Heparin-Antikörpern von Bedeutung ist (Bakchoul, 2016; Bakchoul & Marini, 2018; Marini et al., 2022; Thiele et al., 2010). Die Einstellung auf Vitamin-K-Antagonisten bei nachgewiesener HIT darf aufgrund der Gefahr von weiteren Thrombosen erst nach vollständiger Normalisierung der Thrombozytenwerte erfolgen und sollte stets einschleichend unter zunächst fortgeführter überlappender Antikoagulation erfolgen (Greinacher, 2003; Thiele et al., 2010).

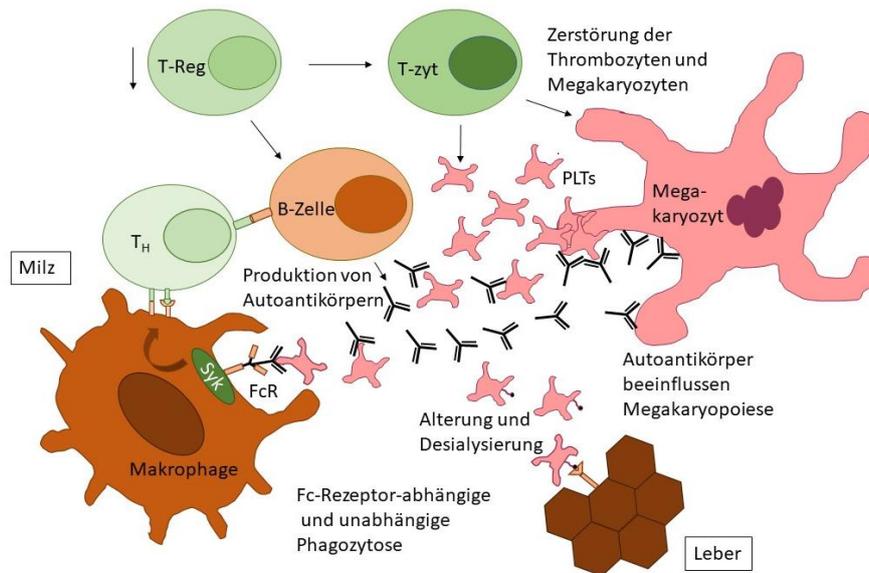
Da die Diagnose einer HIT bedeutende Konsequenzen für den Patienten mit sich bringt, wie beispielsweise die Verzögerung einer dringend notwendigen Heparintherapie bei lebensbedrohlichen Erkrankungen wie einer Lungenarterienembolie oder einem Myokardinfarkt sowie eine Umstellung auf weniger etablierte Antikoagulantien, sollte sie nur dann eingetragen werden, wenn eine sorgfältige Diagnosesicherung stattgefunden hat (Thiele et al., 2010). Dabei stellt die Diagnosesicherung einer klinisch relevanten HIT sowie die Unterscheidung einer HIT von einer Thrombozytopenie anderer Ursache in vielen Fällen immer noch eine Herausforderung dar, sodass weitere Forschung für klinische und diagnostische Fortschritte notwendig ist, um ernsthafte Komplikationen dieser Reaktion auf das im klinischen Alltag sehr häufig verwendete Heparin zu verhindern (Bakchoul, 2016; Marini et al., 2022).

#### 1.2.4.2 Immunthrombozytopenie (ITP)

Die primäre Immunthrombozytopenie (ITP) stellt eine Autoimmunerkrankung dar, die durch das Auftreten von Blutungen bei reduzierten Thrombozytenzahlen unter  $100 \times 10^9/l$  charakterisiert ist (Althaus et al., 2021; Cooper & Ghanima, 2019; Singh et al., 2021). Nach Knochenmarkserkrankungen stellt die chronische Form der ITP die häufigste Ursache einer Thrombozytopenie dar (Lassila, 2016). Die ITP kann primär entstehen oder sekundäre Ursachen wie Infektionen, Medikamente oder andere Autoimmunerkrankungen haben (Cooper & Ghanima, 2019). Die Pathogenese der ITP ist komplex und bis heute noch nicht genau verstanden. Es wird angenommen, dass dieser Erkrankung ein Ungleichgewicht zwischen regulatorischen Immunzellen und Effektorzellen zugrunde liegt. Dieses Ungleichgewicht führt zu einer Überaktivität zytotoxischer T-Zellen sowie einem verstärkten Überleben Autoantikörper-produzierender B-Zellen, was in einer Beeinträchtigung der Thrombopoese sowie einer verkürzten Lebensspanne der Thrombozyten durch einen gesteigerten Umsatz sowie Zerstörung der Thrombozyten resultiert. Die Thrombozytendestruktion wird dabei verursacht durch die direkte Wirkung zytotoxischer T-Zellen, durch Phagozytose, Apoptose und Komplementaktivierung nach dem Binden von Autoantikörpern sowie durch Fc-abhängige und Fc-unabhängige Maserung in Milz und Leber (Althaus et al., 2021; Cooper & Ghanima, 2019; Lassila, 2016; Singh et al., 2021). Abbildung 9 zeigt die Pathogenese schematisch.

Häufige Symptome der ITP sind Petechien, Purpura oder Schleimhautblutungen verschiedener Lokalisationen, wobei sich circa 30-40 % der Patienten mit chronischer ITP asymptomatisch präsentieren (Cooper & Ghanima, 2019; Singh et al., 2021). Die Vorhersage des Blutungsrisikos ist komplex, da es nicht in jedem Fall mit der Thrombozytenzahl korreliert (Lassila, 2016). Zwar treten Blutungen bei Patienten mit ITP in der Regel bei sehr geringen Thrombozytenzahlen auf, gelegentlich zeigen sich jedoch auch Blutungssymptome bei milden oder moderaten Thrombozytopenien. Dies kann daran liegen, dass manche Antikörper bei der ITP auch zu Thrombozytenfunktionsdefekten führen können (Konkle, 2011). Ebenso kann es durch antithrombozytäre Antikörper zu thrombotischen Komplikationen kommen (Lassila, 2016). Bei der Diagnose der ITP handelt es sich um

eine Ausschlussdiagnose nach Evaluation anderer Ursachen der Thrombozytopenie, was Expertise auf dem Gebiet der Thrombozytenstörungen voraussetzt und die Diagnose erschwert (Althaus et al., 2021). Bestätigt werden kann sie durch verschiedene Labortests, die Thrombozyten-spezifische Autoantikörper nachweisen, wie die monoklonale Antikörper-spezifische Immobilisierung von Plättchen (MAIPA). Diese Tests sind jedoch nicht sehr sensitiv, es werden nur bei circa 50 % der ITP-Patienten Autoantikörper nachgewiesen. Bislang gibt es noch keine klaren Empfehlungen für sie (Althaus et al., 2021; Cooper & Ghanima, 2019; Singh et al., 2021). Auch Labormessungen der Plättchenfunktion sind oft nicht weiterführend, da niedrige Thrombozytenwerte oftmals schon zu abnormalen Werten führen (Konkle, 2011). Primäres Ziel in der Therapie der ITP stellt die Reduktion schwerer Blutungskomplikationen dar (Althaus et al., 2021). Die Entscheidung, ob eine Therapie eingeleitet werden sollte oder abwartend vorgegangen wird, hängt dabei mitunter von der Thrombozytenzahl, dem Alter des Patienten, vorherigen Blutungskomplikationen, Komorbiditäten, Medikamenteneinnahme und Nieren- sowie Leberfunktion ab und sollte nach Abwägung der Risiken mit dem Patienten besprochen werden. Zur Verfügung stehen als Erstlinientherapie Glucocorticoide wie Dexamethason oder Prednisolon. Diese können mit intravenösen Immunglobulinen (IVIg) oder Anti-Rhesus-D-Immunglobulinen kombiniert werden. Weitere Therapieoptionen stellen Medikamente wie der B-Zell-Inhibitor Rituximab, der Syk-Inhibitor Fostamatinib, Thrombopoietin-Rezeptor-Agonisten wie Romiplostin oder, wenn diese Zweitlinientherapien nicht greifen, eine Splenektomie als Alternative dar (Singh et al., 2021). Im Falle einer akuten Blutung sollten Antikoagulantien abgesetzt werden und Thrombozytentransfusionen in Kombination mit Glucocorticoiden oder IVIg erfolgen (Cooper & Ghanima, 2019; Singh et al., 2021). Trotz stetiger Weiterentwicklung neuer Therapieoptionen spricht ein beträchtliches Patientenkollektiv nicht oder nicht ausreichend auf die bislang existierenden Therapien an, sodass weitere Forschung notwendig ist, um neue Therapieansatzpunkte zu finden, individuelles Therapieansprechen besser beurteilen und zuverlässigere Diagnostik etablieren zu können (Althaus et al., 2021; Singh et al., 2021).



**Abbildung 9: Pathophysiologie der ITP**, adaptiert nach (Cooper & Ghanima, 2019; Singh et al., 2021). Durch eine Dysbalance des Immunsystems kommt es zur Bildung von Autoantikörpern gegen Thrombozyten, was wiederum zur Phagozytose und dem Abbau der Thrombozyten sowie einer Beeinflussung der Megakaryopoese führt. Außerdem findet eine Zerstörung der Thrombozyten und Megakaryozyten durch fehlregulierte zytotoxische T-Zellen statt. Abkürzungen: T-Reg= regulatorische T-Zelle, T-zyt= zytotoxische T-Zelle, T<sub>H</sub>= T-Helferzelle, PLTs= Thrombozyten, Syk= Spleen Tyrosine Kinase

### 1.3 Die Rolle des AKT-Signalings in Thrombozytenerkrankungen

Da dem PI3/AKT-Signalweg eine bedeutende Rolle bei der Thrombozytenaktivierung und Signaltransduktion zukommt, stellen diese Enzyme vielversprechende Ziele für antithrombotische Therapien sowie die Prävention einer Aggregatbildung bei extrakorporalen Zirkulationssystemen dar (Guidetti et al., 2015; Laurent et al., 2014). Verschiedene Studien haben bereits sowohl ex vivo als auch in vivo die Auswirkungen der Hemmung dieser Kinasen auf die Thrombusformation getestet. Klassische Inhibitoren aller Formen der PI3K wie Wortmannin und LY294002 haben zwar eine Thrombose in ex vivo-Modellen verhindern können, wurden jedoch aufgrund ihrer hohen Toxizität und Nebenwirkungen bislang nur spärlich in vivo getestet. Ein neuerer Pan-PI3K-Inhibitor, S14161, welcher für die Therapie des Multiplen Myeloms eingesetzt wird, hat bei Mäusen zu einer Verlängerung der Zeit bis zur Okklusion verletzter Carotiden sowie eine verlängerte Blutungszeit geführt (Guidetti et al., 2015; Laurent et al., 2014).

Weitere Studien haben zudem gezeigt, dass der PI3K/AKT-Signalweg auch an der durch nicht-physiologischen Scherstress induzierten

Thrombozytenaktivierung und Thrombozyten-Matrix-Interaktion in medizinischen Geräten, die mit Blut Kontakt haben, wie ECMOs (extracorporeal membrane oxygenation), Herz-Lungen-Maschinen oder VADs (ventricular assist devices) beteiligt ist (Chen et al., 2019). Sowohl der prozentuale Anteil der GPIIb/IIIa-Aktivierung als auch die P-Selektin- und pAKT-Expression stiegen unter unphysiologischem Scherstress signifikant an im Vergleich zu einer Negativkontrolle, die keinem Scherstress ausgesetzt war (Chen et al., 2019; Hidiatov et al., 2023). Dieser Effekt konnte durch die vorherige Inkubation des Blutes mit dem PI3K-Inhibitor TGX221 gehemmt werden. Damit könnte die Inhibition des PI3K/AKT-Signalweges auch eine präventive Behandlungsmöglichkeit für Patienten darstellen, deren Blut durch ein solches medizinisches Gerät geleitet wird, um auf diese Weise verursachte Thrombosen zu verhindern (Chen et al., 2019).

Ein weiteres Ziel stellt die AKT-Kinase als primärer Downstream-Effektor der PI3K bei der Thrombusformation dar. Während der AKT1 bei der Thrombose in vivo eine untergeordnete Rolle zukommt, sind Mäuse, bei denen sowohl AKT1 als auch AKT2 ausgeschaltet wurden, nicht in der Lage, stabile Thromben nach einer Verletzung der Carotiden zu bilden. Mäuse ohne AKT3 zeigten eine Verzögerung der arteriellen Thrombusbildung. Auch eine Inhibition der PDK1, welche AKT an Thr308 phosphoryliert, beeinträchtigt eine Thrombusformation. Verschiedene Experimente bestätigten außerdem, dass dem PI3K-AKT-GSK3-Signalweg als Teil des Integrin-Outside-In-Signalings für die Festigung der Plättchenaggregate im Rahmen einer Thrombose eine bedeutende Rolle zukommt (Guidetti et al., 2015).

Generell führt die Inhibition der PI3K-Isoformen und ihrer Downstream-Effektoren zu einer partiellen Blockade der Thrombozytenaktivierung und zeigt nur bei niedrigen Agonistenkonzentrationen einen signifikanten Effekt. Das macht sie zu einem attraktiven Ziel für neue antithrombotische Therapien, ohne das Blutungsrisiko stark zu steigern, was bei aktuellen Therapien einen Kritikpunkt darstellt (Moroi & Watson, 2015).

Da der PI3K/AKT-Signalweg auch häufig bei Krebspatienten mutiert ist und diese nicht selten ein erhöhtes Risiko für venöse Thromboembolien aufweisen, könnten

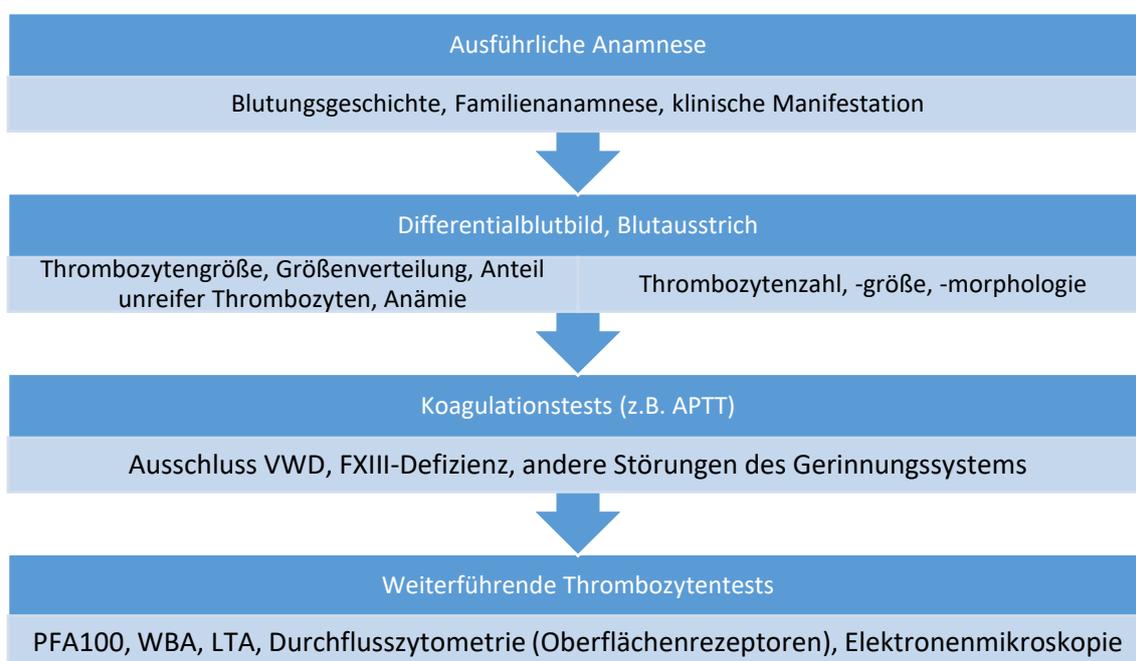
AKT-Inhibitoren ideal für die Behandlung solcher Patienten sein, da sie nur einen relativ milden Effekt auf die GPVI- und CLEC-2-vermittelte Thrombozytenaktivierung haben und gleichzeitig die maligne Entartung und das Wachstum von Tumoren stoppen könnten (Moroi & Watson, 2015).

Als Herausforderung für die Zukunft gilt es, noch genauer an der Rolle der verschiedenen Kinasen bei der Thrombozytenaktivierung zu forschen, um weitere spezifische PI3K/AKT-Inhibitoren als antithrombotische Therapien zu entwickeln. Dabei könnte die Identifizierung verschiedener, den unterschiedlichen Rezeptoren und Integrinen nachgeschalteten Mechanismen und Effektoren helfen, spezifischere Ziele auszumachen und so bestimmte erwünschte Wirkungen zu erreichen (Guidetti et al., 2015).

#### **1.4 Diagnostik von Thrombozytenfunktionsstörungen**

Thrombozytenfunktionsstörungen können viele verschiedene Ursachen aufweisen, die multiple klinische Erscheinungen mit sich bringen. So können sowohl qualitative als auch quantitative Thrombozytendefekte zu einem erhöhten Blutungsrisiko beziehungsweise zu thromboembolischen Komplikationen führen. Um Patienten mit angeborenen oder erworbenen Thrombozytenfunktionsdefekten zu identifizieren, aber auch für die Überwachung und Bestimmung des Ansprechens anithrombozytärer Therapien, dem Vorhersagen und Management perioperativer Blutungskomplikationen sowie für verschiedene Aspekte der Transfusionsmedizin und die Beurteilung der Pathophysiologie von Thrombozyten bei diversen Erkrankungen ist neben einer ausführlichen Anamnese ein breites Panel an Thrombozytenfunktionstests essenziell. Zur Erfassung der multiplen Funktionen der Thrombozyten und ihrer zahlreichen Aktivierungswege sowie aufgrund der vielfältigen Anwendungsgebiete der Thrombozytenfunktionstestung bedarf es vielseitiger Methoden. So wurde bereits ein breites Spektrum an Plättchenfunktionstests hervorgebracht (Lassila, 2016; Lordkipanidze, 2016; Paniccia et al., 2015). Die Analyse der Thrombozytenfunktion ist allerdings komplex, zudem fehlt oft eine Standardisierung (Althaus et al., 2019). Dabei gewinnen neben den klassischen Testungen wie der Lichttransmissionsaggreometrie nach Born

(Born, 1962), die immer noch speziellen Laboren vorbehalten sind, Point-Of-Care-Tests, welche im klinischen Setting und in den Standardlaboren einfach angewendet werden können, zunehmend an Bedeutung (Althaus et al., 2019; Althaus et al., 2020; Paniccia et al., 2015; Wagner et al., 2022). Verschiedene präanalytische Variablen wie die Blutabnahmebedingungen in Bezug auf Koffeinkonsum, Sportverhalten, Medikamenteneinnahme oder das Nahrungsverhalten des Probanden, die Verwendung verschiedener Nadeln und das Stauverhalten bei der Abnahme, das falsche Befüllen von Blutröhrchen, die Verwendung der falschen Antikoagulantien sowie eine falsche Aufbewahrung oder Transport, zu lange Zeitspannen zwischen Abnahme und Bearbeitung der Blutproben oder eine falsche Prozessierung der Proben können zu einer Variabilität der Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboren führen, was die Bedeutung von Qualitätskontrollen sowie einer zunehmenden Standardisierung von Thrombozytenfunktionstest hervorhebt (Lordkipanidze, 2016). Tabelle 6 gibt einen Überblick über die aktuellen Methoden der Thrombozytenfunktionstestung. Abbildung 10 zeigt den empfohlenen Diagnosealgorithmus für Thrombozytenfunktionsstörungen.



**Abbildung 10: Diagnostikalgorithmus von Thrombozytenfunktionsstörungen**, modifiziert nach (Lassila, 2016). Abkürzungen: APTT= aktivierte partielle Thromboplastinzeit, PFA100= Plaquelet Function Analyzer-100, WBA=Vollblutimpedanzaggregometrie, LTA= Lichttransmissionsaggregometrie

In der Diagnose von Thrombozytenfunktionsstörungen nach der AWMF-Leitlinie stellt den ersten Schritt eine ausführliche Blutungsanamnese anhand verschiedener Fragebögen dar. Anschließend folgen erste Untersuchungen zur Eingrenzung der Diagnosen. Dabei spielen für die richtige Diagnosefindung die Messung der Thrombozytenzahl, des mittleren Thrombozytenvolumens (MPV) sowie ein einfacher Blutaussstrich oft eine entscheidende Rolle. Beim Blutaussstrich ist auf das Vorhandensein vergrößerter oder verkleinerter Thrombozyten, Einschlusskörper in den Granulozyten, die Anfärbbarkeit von Thrombozyten sowie eine mögliche Dyserythropoese zu achten. Bei auffälligen Befunden sind nach dem Ausschluss anderer Gerinnungsstörungen durch Koagulationstests für eine gute Differentialdiagnose weiterführende Thrombozytenfunktionstests wie die Thrombozytenaggregometrie, Sekretionstests, eine Immunfluoreszenzmikroskopie, durchflusszytometrische Tests, Elektronenmikroskopie und gegebenenfalls eine genetische Untersuchung anzuschließen (Althaus et al., 2019; Lassila, 2016).

**Tabelle 6: Überblick über verschiedenen Thrombozytenfunktionstests mit ihren Vor- und Nachteilen**, modifiziert nach (Althaus et al., 2019; Jurk, 2015; Lordkipanidze, 2016; Paniccia et al., 2015)

<b>Methode</b>	<b>Probe</b>	<b>Anwendungsgebiet</b>	<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
<b>Elektronenmikroskopie</b>	Citrat-VB, EDTA-Blut	Diagnostik von Thrombozytendefekten speziellen Laboren vorbehalten	keine Probenbearbeitung (VB), hilfreich für die Darstellung von Granula	teuer, bedarf spezieller Ausrüstung
<b>Lichttransmissionsaggregometrie (LTA)</b>	Citrat-PRP	Diagnostik von Thrombozytendefekten Screeningtest auf Blutungsneigung	Goldstandard diagnostische Methode, verschiedene Signalwege beurteilbar, empfindlich für	manuelle Probenbearbeitung, von präanalytischen und analytischen Variablen

		Monitoring anti-thrombozytärer Therapien; weit verbreitet in Speziallaboren	antithrombozytäre Therapien	abhängig, bedarf großer Blutvolumina, zeitaufwändig, geringe Standardisierung
<b>Impedanzaggregometrie</b>	Citrat-VB	Diagnostik von Thrombozytendefekten Screeningtest auf Blutungsneigung Monitoring anti-thrombozytärer Therapien; weit verbreitet in Speziallaboren	keine Probenbearbeitung (VB), diagnostische Methode, schneller Einsatz verschiedene Signalwege beurteilbar, empfindlich für anti-thrombozytäre Therapien	abhängig vom Hämatokrit und der Thrombozytenzahl, bei älteren Geräten müssen Elektroden gereinigt und recycelt werden
<b>Lumiaggregometrie</b>	Citrat-VB	Detektion von Granuladefekten; weit verbreitet in spezialisierten Laboren	beurteilt Granulasekretion und sekundäre Aggregation	semiquantitativ
<b>Verfiy Now</b>	Citrat-VB	Monitoring anti-thrombozytärer Therapien	POCT, einfach, keine Probenbearbeitung, verschiedene Kartuschen verfügbar	unflexibel, teuer, abhängig vom Hämatokrit und der Thrombozytenzahl
<b>Plateletworks</b>	Citrat-VB	Monitoring anti-thrombozytärer	POCT, nur minimale	Indirekter Test, bedarf

		Therapien; verwendet in der Chirurgie und Kardiologie	Probenbearbeitung, schneller und einfacher Screeningtest	eingestellter Thrombozytenzahl, wenige Daten
<b>PFA100/Innovance PFA-200</b>	Citrat-VB	Beurteilung des Blutungsrisikos, der Wirkung von Medikamenten, Screening auf schwere Thrombozytendefekte; weit verbreitet	POCT, einfach, schnell, keine Probenbearbeitung (VB), kleine Blutvolumina erforderlich, empfindlich für schwere Thrombozytendefekte,	starres, geschlossenes System, abhängig vom Hämatokrit, Thrombozytenzahl und vWF, nicht empfindlich für Granulosekretionsdefekte
<b>TEG/ROTEM</b>	Citrat-VB	Diagnostik von Thrombozytendefekten Beurteilung der gesamten Hämostase Monitoring antithrombozytärer Therapien; weit verbreitet in der Chirurgie und Anästhesie	POCT, globale Beurteilung der Hämostase, keine Probenbearbeitung (VB), reduziert Bluttransfusionen, Vorhersage von Blutungskomplikationen,	bestimmte Messpunkte definiert, misst Thrombuseigenschaften, abhängig vom Hämatokrit und der Thrombozytenzahl, wenige klinische Studien
<b>Durchflusszytometrie</b>	Citrat-VB, PRP,	Beurteilung der Zellzahl, des Aktivierungszustand, der	z.T. keine Probenbearbeitung (VB), kleine Blutvolumina	spezialisiertes Verfahren, teuer, Probenbearbeitung

	gewaschene Plättchen	Expression von Oberflächenmarker sowie der zytoplasmatischen Marker; vor allem in spezialisierten Laboren angewandt	erforderlich, große Variabilität der durchführbaren Tests	kann zu Artefakten führen
--	----------------------	---	---	---------------------------

### 1.5 Ziele der Arbeit und Ausblick

Die Diagnose von Thrombozytenfunktionsstörungen, vor allem milder Plättchenfunktionsstörungen, stellt bis heute eine Herausforderung dar (Althaus et al., 2020). Zwar existiert bereits ein breites Spektrum diagnostischer Testmethoden, dennoch weisen auch die aktuellen Methoden noch Defizite auf. Studien haben gezeigt, dass lediglich 10 % der Patienten mit Verdacht auf eine angeborene Thrombozytenfunktionsstörung eine spezifische molekulare Diagnose bekommen, während bei 40 % der Patienten ein Funktionsdefekt ausgemacht wurde (Lassila, 2016). Außerdem profitiert nur ein begrenzter Anteil der Patienten mit Thrombozytendefekten von den Fortschritten, die die letzten Jahre auf diesem Bereich gemacht wurden, da viele neue Methoden aktuell noch Speziallaboren vorbehalten sind und so viele Patienten nur erschwerten Zugang zu adäquater Diagnostik haben (Greinacher et al., 2017). Des Weiteren benötigen viele Methoden größere Blutvolumina, wie beispielsweise die Lichttransmissionsaggregometrie als aktueller Goldstandard. Dies stellt jedoch gerade bei Untersuchungen von Neugeborenen und Kindern ein Problem dar. Hinzu kommt, dass die Lichttransmissionsaggregometrie bei Patienten mit Thrombozytopenie nur wenig aussagekräftig ist, sie unmittelbar durchgeführt werden muss und sehr arbeits- und zeitintensiv ist (Althaus et al., 2020). Zudem werden mit der Lichttransmissionsaggregometrie bei nicht allen Patienten mit klinischen Blutungszeichen Plättchenfunktionsstörungen festgestellt. Genetische Screeningmethoden wie das Next-Generation-Sequencing können zwar häufig zugrundeliegende genetische

Defekte detektieren, jedoch ist dabei die Korrelation zwischen variablen genetischen Ausprägungen und phänotypischen Erscheinungen oftmals schwer (Greinacher et al., 2017).

Die durchflusszytometrische Messung der pAKT-Kinase bringt hier als neue Methode zur Diagnostik von Thrombozytenfunktionsstörungen einige Vorteile mit sich. So stellt gerade bei der Diagnostik von Thrombozytendefekten bei thrombotyzopenen Patienten die Durchflusszytometrie die Methode der Wahl dar, da die Thrombozytenzahl, anders als bei vielen Standardmethoden, keinen Einfluss auf die Ergebnisse hat (Lordkipanidze, 2016; Paniccia et al., 2015). Insbesondere bei Patienten unter einer Chemotherapie, die die Thrombopoese beeinflusst, ist es essenziell, Aussagen über eine erhöhte Blutungsneigung und folglich den individuellen Transfusionsbedarf treffen zu können. Auch Patienten, die unter der Immunthrombozytopenie leiden, können trotz erniedrigter Thrombozytenzahl sowohl zu Blutungen als auch zu Thrombosen neigen (Konkle, 2011; Lassila, 2016). Eine Charakterisierung des Aktivierungszustandes der Thrombozyten kann hier helfen, mögliche Komplikationen vorherzusagen und so ein schnelles Handeln zu gewährleisten. Zudem benötigen die durchflusszytometrischen Verfahren nur geringe Blutvolumina, was gerade bei der Diagnostik von Thrombozytendefekten bei Kindern einen entscheidenden Vorteil darstellt (Althaus et al., 2020). Die Fixierbarkeit der Proben erlaubt des darüber hinaus eine weitreichendere Diagnostik, da Proben verschickt werden können und so keine direkte räumliche Anbindung an Speziallabore notwendig ist. Durch die Möglichkeit der Darstellung intrazellulärer Prozesse ermöglicht die Durchflusszytometrie zudem die Analyse verschiedener Signaltransduktionswege und somit eine bessere Charakterisierung von Thrombozytenfunktionsstörungen, die mit den Standardmethoden bislang nicht weiter eingrenzbar sind. In Studien wurde gezeigt, dass die bereits etablierten durchflusszytometrischen Messungen der Expression der Oberflächenmarker CD62P und CD63 relativ zuverlässig Patienten detektieren können, die später auch eine Funktionsstörung in der LTA aufweisen, und somit als Prätest für die aufwändige Standardmethode in Frage kommen. Allerdings weisen auch diese Methoden Defizite auf, insbesondere was die Diagnose von

Störungen von Signaldefekten der Glykoproteinrezeptoren angeht (Dovlatova et al., 2014), sodass hier weitere Methoden sinnvoll sind.

Immer mehr therapeutische Ansätze zielen zudem auf die Inhibition spezifischer Signalwege ab. So finden Inhibitoren der AKT-Kinase und PI3-Kinase in der Zukunft voraussichtlich immer mehr Einsatz in der Therapie von Tumoren (Ellis & Ma, 2019; Hirai et al., 2010; Hua et al., 2021; Revathidevi & Munirajan, 2019) oder entzündlichen Prozessen wie der Osteoarthritis (Liu et al., 2019; Xue et al., 2017). Die Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion unter diesen Therapien lässt sich mit den aktuell etablierten Methoden schlecht abschätzen. Der Einfluss der spezifischen Inhibition von Signalwegen auf die Thrombozytenfunktion und Gerinnung sollte jedoch nicht vernachlässigt werden. Hier könnte die durchflusszytometrische Bestimmung der pAKT-Expression der Thrombozyten von Bedeutung sein.

Gerade bei multimorbiden Patienten, die neben Antikoagulantien mehrere Medikamente mit potenziellem Einfluss auf die Thrombozytenfunktion wie zum Beispiel SSRI oder Antibiotika einnehmen, könnte ein spezifischeres Monitoring der Thrombozytenaktivität sinnvoll sein, insbesondere wenn eine erhöhte Blutungsneigung bei Sturzgefahr schwerwiegendere Konsequenzen haben könnte. Ebenso kann es bei Hochrisiko-Patienten mit Stents wichtig sein, die Effektivität der dualen Thrombozytenaggregation zu überwachen, um weitere thromboembolische Ereignisse zu vermeiden (Gross et al., 2016).

Die durchflusszytometrische Messung der pAKT-Kinase könnte außerdem der Identifizierung neuer therapeutischer Ansatzpunkte im Signaling bei antikörpervermittelten Erkrankungen dienen. So stellt der PI3K-AKT-Signalweg einen der Hauptaktivierungswege der Thrombozyten bei COVID-19 dar. Studien haben gezeigt, dass die Aktivierung des pAKT/AKT-Signalweges mit einer Thrombozytenaktivierung bei schweren COVID-19-Verläufen einhergeht. Damit stellt dieser Signalweg potenziell auch einen möglichen Ansatzpunkt für die Prävention von Thrombosen bei COVID-Patienten dar (Pelzl et al., 2022). Darüber hinaus könnte die in meiner Dissertation beschriebene Methode für die Diagnostik der HIT neue Möglichkeiten mit sich bringen. So hat nicht jeder im HIPA positiv getesteter

Patient eine klinisch relevante HIT (Warkentin, 2011), sodass eine genauere Charakterisierung der Aktivität der HIT-Antikörper und somit eine Schweregradbeurteilung der HIT entscheidend ist. Außerdem könnte eine Analyse der durch die HIT-Antikörper aktivierten Thrombozyten bei der Identifizierung von Subgruppen mit einem hohen Risiko für Thrombose helfen (Pelzl et al., 2022).

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, dass es durchaus realisierbar ist, mittels durchflusszytometrischen Methoden die pAKT-Expression von Thrombozyten zu visualisieren und zu quantifizieren (Althaus et al., 2020). Ebenso konnte gezeigt werden, dass der Anteil der pAKT-Expression abhängig von der Aktivierung der Thrombozyten durch verschiedene Agonisten ist und somit einen wichtigen Bestandteil von verschiedenen Signaltransduktionswegen darstellt. Auch die Aktivierung der Thrombozyten durch antithrombozytäre Antikörper, wie sie zum Beispiel bei der HIT vorhanden sind, lässt sich mittels der in meiner Doktorarbeit vorgestellten Methode darstellen. Damit sind wichtige Grundvoraussetzungen zur Beurteilung der Thrombozytenfunktion und ihrer Störungen erfüllt. Mit entscheidenden Vorteilen wie dem Bedarf geringer Blutvolumina sowie der Möglichkeit der Fixierung von Proben und einer damit verbundenen Flexibilität könnte die durchflusszytometrische Bestimmung der Expression der pAKT-Kinase eine neue Methode als zukünftige Alternative oder Ergänzung in der Thrombozytenfunktionsdiagnostik darstellen (Althaus et al., 2020). Für eine weitere Beurteilung der Eignung der Methode, ihrer Sensibilität und Spezifität für die Diagnose von Thrombozytendefekten bedarf es jedoch weiterer Messungen an größeren Patientengruppen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien und Geräte

#### 2.1.1 Verwendete Chemikalien

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Ampuwa® (destilliertes Wasser)	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
NaCl 0,9%	Braun, Melsungen, Deutschland
ROTI®Cell Hanks' BSS	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Melon™-Gel IgG Spin Purification Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PerFix no centrifuge assay Kit	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
RIPA lysis buffer	ThermoFisher Scientific, Paisley, UK
0,5 EDTA Solution (100X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Halt™ Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail (100X)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Laemmli-Sample-Buffer	BioRad, California, USA
EveryBlot Blocking Buffer	BioRad, California, USA
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
AKT-Inhibitor Bay1125976	Merck, Darmstadt, Deutschland

Heparin 1000 E/ml	Emosis, Illkirch, Frankreich
Heparin 3 E/ml	Emosis, Illkirch, Frankreich
TRAP-6	HART, Hartlepool, UK
Kollagen Chrono-Par	Chrono-Log Corp., Haverton, USA
Arachidonsäure	Hart, Hartlepool, UK
ADP	Hart, Hartlepool, UK
Kollagen-Reagenz-Horm (für HIPA)	Takeda Austria GmbH, Tokio, Japan
SKF-Lösung	Takeda Austria GmbH, Tokio, Japan
Hirudin 2000 ATU	Pentapharm, Aesch BL/Schweiz
Heparin für HIPA	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Reviparin (Clivarin)	Mylan Healthcare GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Zymutest HIA IgG	Hyphen BioMed, Neuville-sur-Oise, Frankreich

### 2.1.2 *Verwendete Antikörper*

**Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-Human CD32-Antikörper, Clone IV.3	Stemcell technologies, Vancouver, Canada
OptiClone IgG1(mouse)-FITC- IgG1(mouse)-PE, IgG1(mouse)-PC5- Antikörper	Beckman Coulter, Marseille, France

PC5-labelled mouse anti-human CD41, Clone P2	Beckman Coulter, Brea, USA
AKT1-Monoclonal Antibody APC	Invitrogen, Rockford, USA
Anti-Hu/Mo Phospho-AKT1 (Ser473), eBioscience-PE-Antikörper	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
APC Mouse Anti-Human CD62P-Anttikörper	BD Pharmingen, New Jersey, USA
Ms mAb to AKT1	Abcam, Cambridge, UK
Sekundärantikörper IRDye®680	LI.COR®, Lincoln, US
Sekundärantikörper IRDye®800	LI.COR®, Lincoln, US
Phospho-AKT1 (Ser473) Antibody	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Anti(h)-Fcy-HRP-Immunkonjugat	

### 2.1.3 Verwendete Labormaterialien

Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Labormaterialien

Labormaterialien	Hersteller
50 ml Cellstar®Tubes	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
15 ml Falcon-Tubes	Corning Science Mexico S.A. de C.V., Tamaulipas, Mexiko
BD Vacutainer 9NC 0,105M Buff. Na <sub>3</sub> Citrate	Becton Dickinson, Plymouth, UK
Acidic-dextrose, Vacutainer ACD-A	Becton Dickinson, Plymouth, UK

S-Monovette EDTA 7.5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Venofix Safety 21G Sicherheitsvenenpunktionsbesteck	Braun, Melsungen, Deutschland
Safe-Lock Tubes 1.5 und 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Durchflusszytometrie-Röhren	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Nitril Handschuhe	Paul Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Pasteurpipette 5ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TipOne XL Pipettenspitzen 10; 20; 200; 1000 µl	Starlab, Hamburg, Deutschland
Amicon®Ultra Centrifugal Filters 1K	Merck, Darmstadt, Deutschland
0,45 µm PVDF Membranen	Merck, Darmstadt, Deutschland
PS-Microplatte 96k U-Form	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
PS-Röhrchen 14 ml, Round Bottom	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
ELISA-Mikrotiterplatte	Hypen BioMed, Neuville-sur-Oise, Île-de-France

#### 2.1.4 Verwendete Puffer und Lösungen

Tabelle 10: Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen

Lösung	Inhaltsstoffe
RIPA lysis buffer	1 ml 100x RIPA lysis buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)

	<p>1 µl 0,5 M 100x EDTA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)</p> <p>1 µl 100x Halt™ protease and phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)</p>
15 % SDS-PAGE Gele	<p>Wasser</p> <p>2-30 % Acrylamide/Bis Solution (BioRad, California, USA)</p> <p>1.5 M Tris-hydrochlorid (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)</p> <p>4-10 % SDS ultra pure (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)</p> <p>5-10 % Ammonium persulfate (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)</p> <p>TEMED (BioRad, California, USA)</p>
Laufpuffer für Westernblot	<p>0.025 M Trizma®base (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)</p> <p>0.192 M Glycin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)</p> <p>0.10 % SDS ultra pure (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)</p>
Transferpuffer Westernblot	<p>0.025 M Trizma®base (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)</p> <p>0.192 M Glycin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)</p> <p>0.10 % SDS ultra pure (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)</p> <p>200 ml Methanol (Honeywell, Muskegon, Michigan, USA)</p>
TBS-T Buffer	<p>20 mM Trizma®base (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)</p> <p>1 mM NaCl (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)</p> <p>0,1 % Tween®20 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)</p>
Zymutest HIA IgG ELISA-Kit	<p>Hypen BioMed, Neuville-sur-Oise, Île-de-France, bestehend aus:</p> <p>HIA Probenverdünner</p> <p>HIA IgG Positivkontrolle</p> <p>Negativkontrolle</p>

	<p>Anti(h)-Fcy-HRP-Immunkonjugat</p> <p>Konjugatverdünner</p> <p>Waschlösung</p> <p>Peroxidasesubstrat (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)</p> <p>Stopplösung (0,45M Schwefelsäure)</p> <p>(Hypen BioMed, Neuville-sur-Oise, Île-de-France)</p>
HIPA Basispuffer	<p>Bicarbonatpuffer: NaHCO<sub>3</sub> (VWR international, Fontenay sous Bois, Frankreich), KCl (VWR international, Fontenay sous Bois, Frankreich), NaCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), Ampuwa</p> <p>Glucose 10 % (Braun, Melsungen, Deutschland)</p> <p>Rinderalbumin BSA 20 % (VWR international, Fontenay sous Bois, Frankreich)</p> <p>Ampuwa (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland)</p>
HIPA Waschpuffer	<p>Basispuffer</p> <p>Apyrase 1 U/μl (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)</p> <p>Hirudin 1 U/μl (DSM, Aesch BL, Schweiz)</p> <p>HCl 1 M (VWR international, Fontenay sous Bois, Frankreich) zur pH-Wert-Einstellung</p>
HIPA Resuspensionspuffer	<p>Basispuffer</p> <p>MgCl<sub>2</sub> 0.2 M (VWR international, Fontenay sous Bois, Frankreich)</p> <p>CaCl<sub>2</sub> 0.2 M (VWR international, Fontenay sous Bois, Frankreich)</p> <p>HCl 1 M (VWR international, Fontenay sous Bois, Frankreich) zur pH-Wert-Einstellung</p>

### 2.1.5 Verwendete Geräte

Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Geräte

Geräte	Hersteller
Cell-Dyn Ruby Hematological Analyzer	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
Durchflusszytometer Navios	Beckman Coulter, Brea, USA
Gefrierschrank (-80 °C)	Ilshin Europe, Ede, Niederlande
Heraeus 37 °C Inkubator	Thermo Scientific, Waltham, USA
Kühlschrank (4 °C)	Siemens, München, Deutschland
Eppendorf Research®Plus Pipetten 10; 20; 100; 200; 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Rotator	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Rotina 46 R Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Rotina 35 R Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Shaker	Philips, Brussels, Belgien
Tube Roller	Benchmark Scientific Inc, Edison, USA
TubeOne Mikrozentrifuge	Starlab, Hamburg, Deutschland
Vortexer, Reax-Top	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Magnetrührer	Janke&Kunkel GmbH& Co. KG, Staufen, Deutschland
NanoDrop One	VWR, Bruchsal, Deutschland
Imaging System Westernblot	NIH, Bethesda, USA
Trans-Blot®Turbo System	BioRad, California, USA

Multiplate®-Analyser	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Test Tube Thermostat Model TCR100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

## 2.2 Methoden

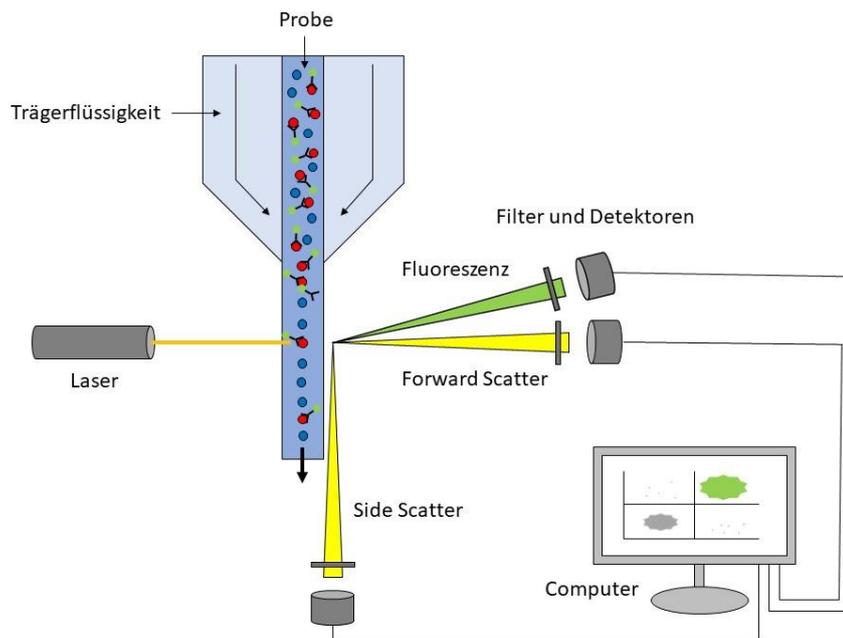
### 2.2.1 Patienten und Spender

Für die Messungen wurde Blut von gesunden Spendern aus der Blutspendeezentrale Tübingen, Baden-Württemberg, nach deren schriftlicher Einwilligung verwendet. Voraussetzung war, dass diese keine Medikamente innerhalb der letzten zehn Tage eingenommen hatten. Die Blutentnahme erfolgte aus der Kubitalvene mittels 21-Gauge Butterfly (Braun, Melsungen, Deutschland) ohne Stauung je nach Methode in ein Citratröhrchen (Becton Dickinson, Plymouth, UK), EDTA-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) oder ACDA-Röhrchen (Becton Dickinson, Plymouth, UK).

Für den klinischen Teil, die Testung der Wirkung von Antikörpern gegen den Heparin-PF4-Komplex der Klasse IgG auf die Aktivierung von Thrombozyten, wurden Seren von Patienten mit Verdacht auf eine HIT und bestätigter HIT verwendet. Diese wurden vorher im HIPA-Test sowie im ELISA getestet und mittels dieser Tests sowie klinischer Kriterien (4-T-Score) in verschiedene Kategorien bezüglich der Schwere ihrer Erkrankung eingeteilt. Als Kontrolle dienten Seren von gesunden Spendern der Blutgruppe AB, ebenfalls aus der Blutspendeezentrale Tübingen. Auch die Thrombozyten, an denen die Wirkung der HIT-Seren getestet wurden, stammten von gesunden Spendern ohne Medikamenteneinnahme nach deren Einverständnis.

### **2.2.2 Durchflusszytometrische Analysen- Grundlagen der Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie (FACS= Fluorescence Activated Cell Sorting) ist eine Methode, die der Zählung und Charakterisierung von Zellen dient. Mithilfe der Durchflusszytometrie kann so die Expression verschiedener Proteine an der Oberfläche oder innerhalb von Zellen beurteilt werden. Dafür werden die zu untersuchenden Zellen von dem FACS-Gerät aufgenommen und fließen einzeln hintereinander aufgereiht an einem scharf gebündelten Laserstrahl vorbei (siehe Abb. 11). Trifft der Laserstrahl auf die Zelle, wird das Licht in verschiedene Richtungen gestreut. Das Vorwärtsstreulicht wird dabei im Forward Scatter (FSC), erfasst und erlaubt Informationen über die Größe der Zellen. In einem 90°-Winkel dazu wird das so genannte Seitwärtsstreulicht im Side Scatter (SSC) erfasst, welches Informationen über die Granularität der Zellen gibt. Der Laser regt außerdem spezifische, kovalent an Antikörper gebundene Fluoreszenzfarbstoffe an, mit denen die Zellen vorher gefärbt wurden. Die unterschiedlichen Farbstoffe emittieren die absorbierte Energie in Form von Licht einer höheren Wellenlänge, entsprechend des Wellenlängenbereichs für den jeweiligen Farbstoff. Dieses Signal wird mittels Filter in verschiedene Fluoreszenzspektren aufgetrennt und durch nach verschiedenen Fluoreszenzkanälen getrennten Detektoren aufgenommen, in elektrische Signale umgewandelt und ausgewertet (Mandy et al., 1995; McKinnon, 2018). In den hier beschriebenen Messungen wurde das Durchflusszytometer Navios von Beckman Coulter verwendet.



**Abbildung 11: Prinzip der Durchflusszytometrie**, adaptiert nach (Adan et al., 2017): Die in der Probe enthaltenen Zellen fließen durch die Trägerflüssigkeit einzeln aufgereiht hintereinander an einem Laserstrahl vorbei. Der Laserstrahl, der auf die Zellen trifft, erzeugt ein Streulicht, das als Forward und Side Scatter gemessen werden kann. Außerdem regt der Laser die kovalent an Antikörper gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe an, die ein Licht spezifischer Wellenlänge, je nach gebundenem Farbstoff, emittieren. Dieses Licht wird gefiltert und trifft auf Detektoren, die das aufgenommene Signal in elektrische Signale umwandeln.

### 2.2.3 Herstellung von PRP

Für die Herstellung von thrombozytenreichem Plasma (PRP, engl. „platelet rich plasma“) wurde das von den Spendern entnommene Citratblut für 30 Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen und anschließend bei 120 g für 15 Minuten zentrifugiert (Rotina 46R Zentrifuge, Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Der Überstand, der das PRP darstellt, wurde dann mit einer Pasteurpipette (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) abgenommen und in ein separates Gefäß überführt (Althaus et al., 2020). Anschließend wurde die Zellzahl mittels Cell-Dynn (Abbott, Wiesbaden, Deutschland) gemessen und auf 300.000 Zellen pro Mikroliter eingestellt.

#### **2.2.4 Verdünnung der Agonisten**

Für die Aktivierung der Thrombozyten wurden in den Experimenten verschiedene Agonisten verwendet: TRAP-6 (=Thrombin Receptor Activating Peptide) (HART, Hartlepool, UK), ADP (=Adenosindiphosphat) (Hart, Hartlepool, UK), Arachidonsäure (Hart, Hartlepool, UK) sowie Kollagen (Chrono-Log Corp., Haverton, USA). Je nach Experiment wurden die Agonisten direkt im Voraus entsprechend mit Ampuwa (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) verdünnt, um final die gewünschte Endkonzentration der Agonisten zu erhalten. Die geeigneten Endkonzentrationen hierfür wurden in Vorexperimenten ermittelt. Tabelle 12 präsentiert die verwendeten Konzentrationen.

**Tabelle 12: Verwendete Agonisten und jeweilige Verdünnung**

<b>Agonist</b>	<b>Stock</b>	<b>Endkonzentration</b>
TRAP-6	1 mM	20 µM
ADP	100 µM	15 µM
Arachidonsäure	5 mg/ml	1,5 mmol/l
Kollagen	1 mg/ml	10 µg/ml

#### **2.2.5 Inhibierung der AKT-Kinase**

Ein weiterer Teil des PRP wurde vorab mit dem AKT-Inhibitor Bay1125976 (Merck, Darmstadt, Deutschland Stock 10 mM, End-C 10 µM) für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert, um den Einfluss der Hemmung des AKT-Signalwegs auf die Aktivierung der Thrombozyten aufzuzeigen (Pelzl et al., 2022). Der AKT-Inhibitor hemmt dabei die Phosphorylierung der AKT-Kinase unter anderem an der Position Ser473 sowie Thr308 durch die PDK1 (Politz et al., 2017).

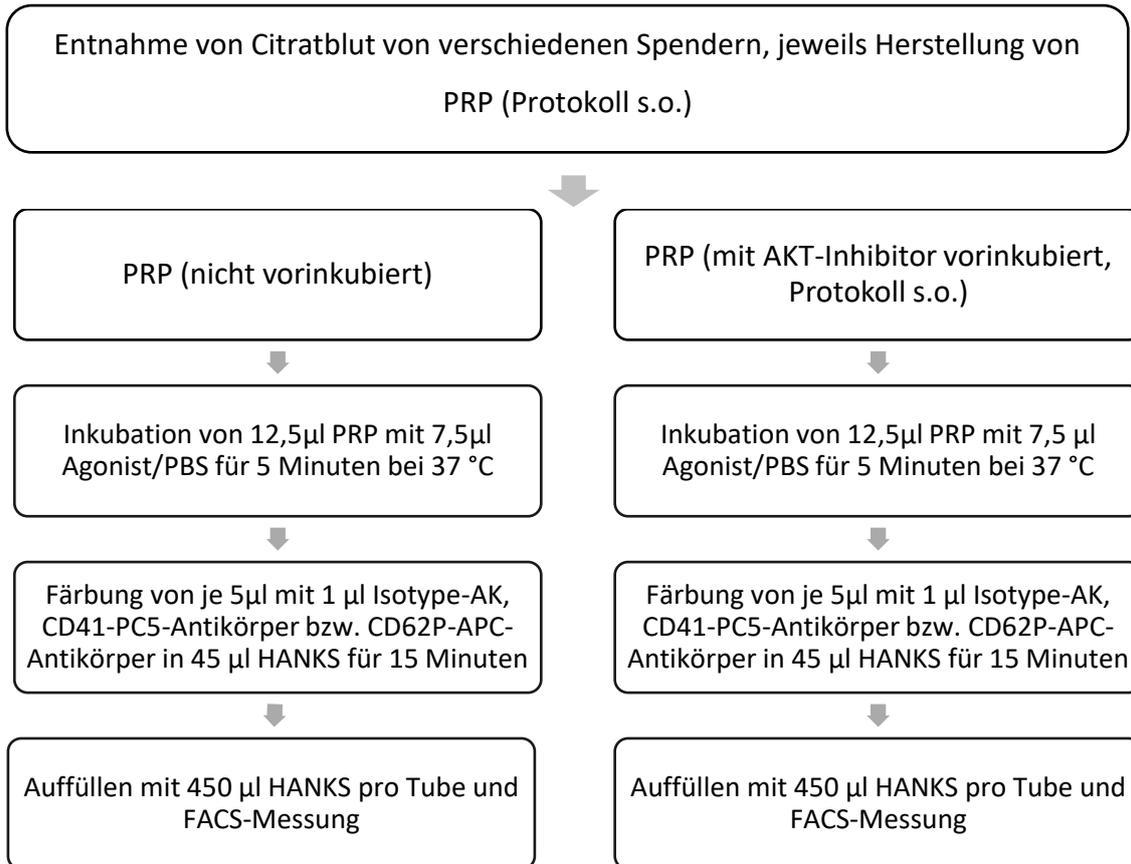
#### **2.2.6 Thrombozytenaktivierung und CD62P-Messung**

Eine bereits etablierte Kontrollmethode, um die Aktivierung der Thrombozyten zu messen, ist die Analyse der Expression des Oberflächenmarkers P-Selektin (CD62P). Dabei handelt es sich um ein Zelladhäsionsmolekül, das sich bei nicht aktivierten Thrombozyten in den  $\alpha$ -Granula befindet. Eine Aktivierung der

Thrombozyten führt zu einer Freisetzung der Granula an die Zelloberfläche der Thrombozyten (Gremmel et al., 2016).

Für die Beurteilung der Aktivierung wurde pro Agonisten ein Pipettieransatz hergestellt, eine Isotypenkontrolle, um das Hintergrundsignal durch unspezifische Bindungen von Antikörpern abschätzen zu können, und eine Negativkontrolle mit Puffer, um den nicht aktivierten Zustand der Thrombozyten beurteilen zu können. Zudem erfolgte ein Ansatz mit einer CD41-PC5-Färbung, einem Thrombozytenmarker, um verifizieren zu können, dass es sich bei den gemessenen Events um Thrombozyten handelt.

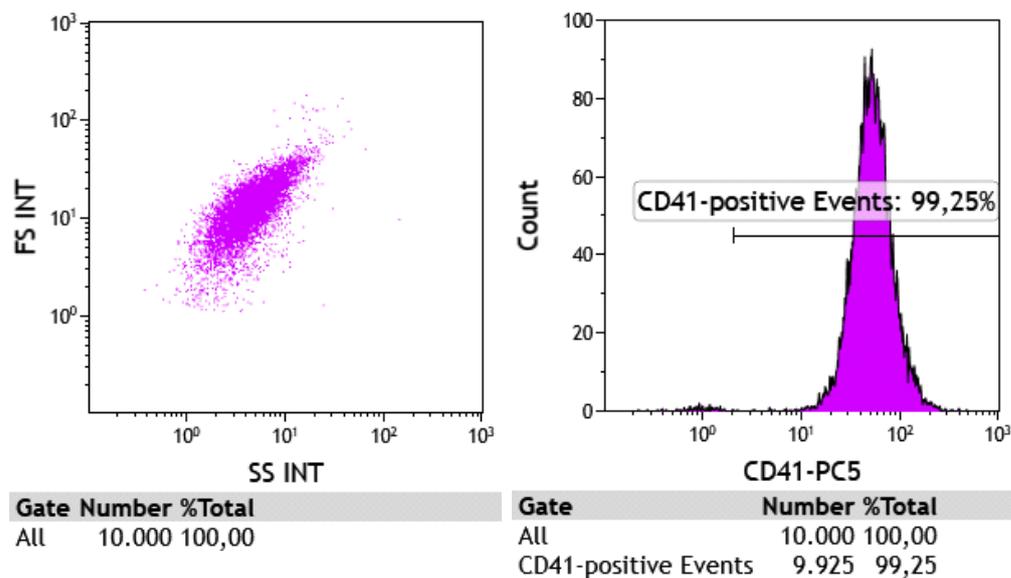
Pro Pipettieransatz wurden 12,5 µl PRP mit 7,5 µl des jeweiligen vorher verdünnten Agonisten bzw. PBS (engl. „phosphate-buffered saline“) (Biochrom, Berlin, Deutschland) als Kontrolle für 5 min bei 37 °C inkubiert (Althaus et al., 2020; Hidiatov et al., 2023). Als Vergleich erfolgte je ein Ansatz mit dem mit AKT-Inhibitor vorinkubiertem PRP. Anschließend wurden je 5 µl pro Ansatz in 45 µl HANKS-Puffer (Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) überführt. Die Ansätze wurden mit je 1 µl des entsprechenden Antikörpers (OptiClone IgG1(mouse)-FITC-IgG1(mouse)-PE, IgG1(mouse)-PC5-Antikörper (Beckman Coulter, Marseille, France), PC5-labelled mouse anti-human CD41, Clone P2 (Beckman Coulter, Brea, USA) bzw. APC Mouse Anti-Human CD62P-Antikörper (BD Pharmingen, New Jersey, USA) für 15 min im Dunkeln inkubiert, anschließend mit 450 µl HANKS-Puffer (ROTI®Cell Hanks' BSS, Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland) aufgefüllt und am Durchflusszytometer (Navios, Beckman-Coulter, USA) gemessen. Der Versuchsaufbau wird in Abbildung 12 schematisch dargestellt.



**Abbildung 12: Darstellung des Versuchsaufbau für die Thrombozytenaktivierung und CD62P-Messung**

### 2.2.7 Analyse CD62P-Messung im FACS-Protokoll

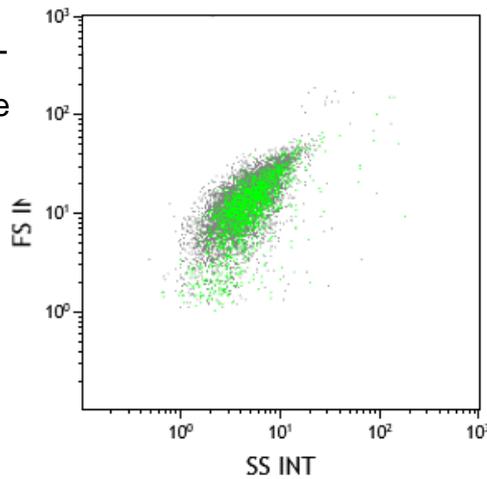
Die Analyse der Zellen erfolgte nach ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenzmarkierung. Zunächst erfolgte eine Quantifizierung der in der CD41-PC5-Färbung positiven Events, gemessen im FL-5 Kanal. Wie in Abbildung 12 beispielhaft zu sehen, exprimierten fast alle Events CD41, einen Thrombozytenmarker, weshalb davon auszugehen ist, dass es sich bei den Zellen nahezu ausschließlich um Thrombozyten handelt.



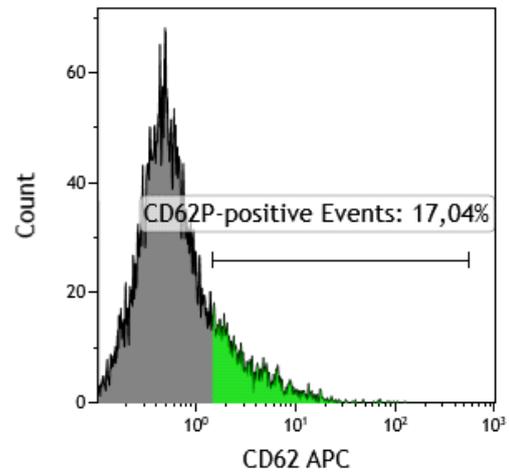
**Abbildung 13: Darstellung der CD41-positiven Events.** Links wird die Zellpopularität nach Granularität und Größe dargestellt, rechts die Expression des Markers CD41, markiert durch eine PC5-Färbung. Die CD41-positiven Events, die hier 99,25 % der Zellen ausmachten, wurden lila eingefärbt.

Die CD62P-Expression der Thrombozyten konnte durch die CD62P-APC-Färbung im FL6-Kanal detektiert werden. Um die Aktivierung der Thrombozyten durch die verschiedenen Agonisten vergleichen zu können, wurde das Signal nach Aktivierung mit den Agonisten (Prozentsatz der positiven Zellen) jeweils in das Verhältnis zu dem Signal der Negativkontrolle, also den nicht bzw. nur gering aktivierten Zellen, gesetzt und der so genannte Fold Increase (FI) gebildet (siehe Abb.14). Beispiel hier:  $FI (TRAP) = 85,65 / 17,04 = 5,03$ .

Negativ-  
kontrolle

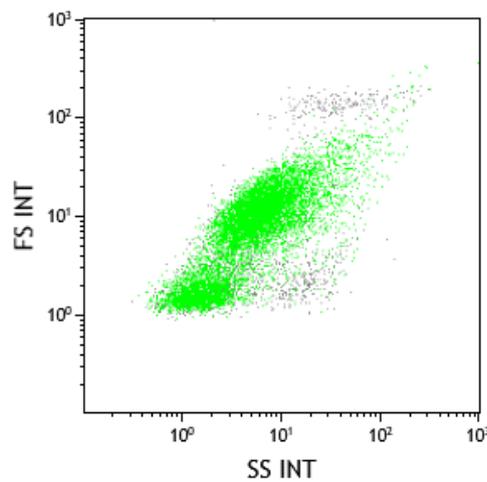


Gate	Number	%Total
All	10.000	100,00

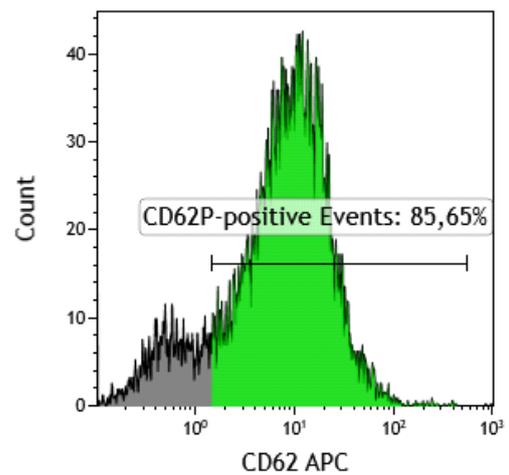


Gate	Number	%Total
All	10.000	100,00
CD62P-positive Events	1.704	17,04

TRAP



Gate	Number	%Total
All	10.000	100,00



Gate	Number	%Total
All	10.000	100,00
CD62P-positive Events	8.565	85,65

**Abbildung 14: Darstellung der CD62P-positiven Events nach Aktivierung mit TRAP-6.** Jeweils links sind die Zellpopulationen nach Granularität und Größe dargestellt, rechts die Expression der CD62 positiven Zellen. Diese wurden grün eingefärbt. Während bei der Negativkontrolle (oben dargestellt) nur 17,04 % der gemessenen Events CD62P exprimierten, stieg der Anteil nach Aktivierung mit TRAP-6, unten dargestellt, auf 85,65 %, was einem Fold Increase von 5,03 entsprach.

### 2.2.8 pAKT/AKT-Messungen

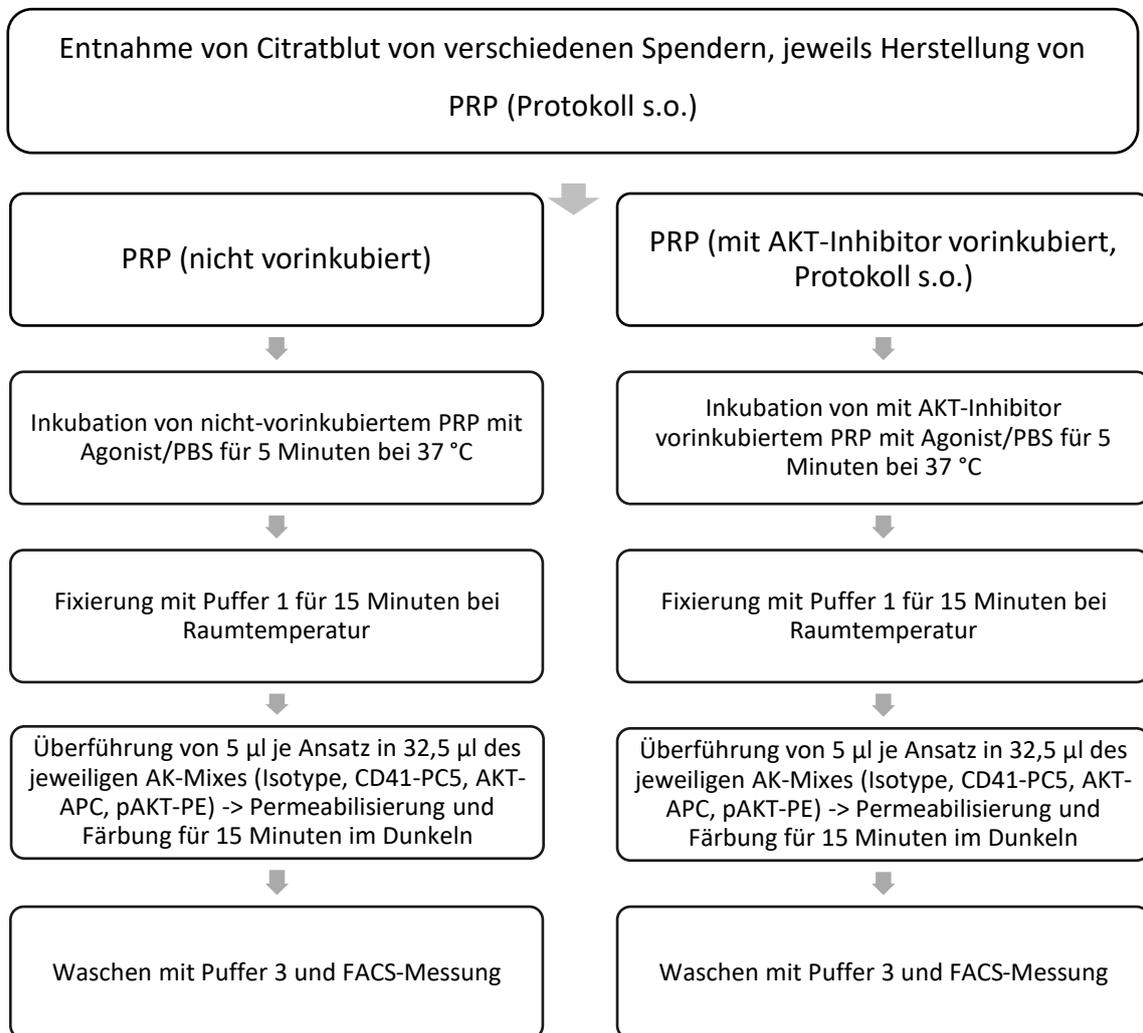
Für die Messung der phosphorylierten Form der AKT-Kinase bei den zuvor aktivierten Thrombozyten wurde zu den jeweiligen Inkubationsansätzen mit den verschiedenen Agonisten (siehe oben) sowie der Negativkontrolle nach Inkubation je 2 µl des Puffer 1 eines kommerziell erhältlichen Perfix-Kits (Beckmann Coulter, Marseille, Frankreich) hinzugegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellen zu fixieren. Auch hier wurde jeweils PRP mit und ohne vorausgegangener AKT-Inhibition verwendet. Da es sich bei der AKT-Kinase um ein intrazelluläres Protein handelt, mussten die Zellen für die Darstellung der Phosphorylierung dieser Kinase permeabilisiert werden. Die Permeabilisierung erfolgte mit der Färbung in einem weiteren Schritt. Dafür wurden 5 µl des entsprechenden Pipettieransatzes zu 32,5 µl eines Antikörpermixes pipettiert, bestehend aus Puffer 2 des Perfix-Kit und dem jeweiligen Antikörper (siehe Tab.13), OptiClone IgG1(mouse)-FITC-IgG1 (mouse)-PE IgG1 (mouse)-PC5-Antikörper (Beckman Coulter, Marseille, France), PC5-labelled mouse anti-human CD41, Clone P2 (Beckman Coulter, Brea, USA), AKT1-Monoclonal Antibody APC (Invitrogen, Rockford, USA) sowie Anti-Hu/Mo Phospho-AKT1 (Ser473), e-Bioscience-PE-Antikörper (Invitrogen Life Technologies Corp., Carlsbad, USA).

**Tabelle 13: Zusammensetzung der Antikörpermixe für die Permeabilisierung und Färbung**

Isotypenkontrolle	129 µl Puffer 2 + 1 µl Isotype-AK
CD41-Kontrolle	1200 µl Puffer 2 + 8 µl CD41-PC5
Solofärbung pAKT	1200 µl Puffer 2 + 32 µl pAKT-PE
Solofärbung AKT	1200 µl Puffer 2 + 32 µl AKT-APC
Doppelfärbung pAKT/AKT	1200 µl Puffer 2 + 32 µl pAKT-PE + 32 µl AKT-APC

Die Proben wurden für 15 Minuten in Dunkelheit mit den Antikörpern gefärbt. Im letzten Schritt wurden überschüssige, ungebundene Antikörper entfernt. Dies erfolgte durch die Zugabe von 375 µl eines vorher 1:10 mit Ampuwa verdünnten Waschpuffers, Puffer 3 des Perfix-Kits, zu jeder Probe. Dann wurden die Proben

unter dem Durchflusszytometer gemessen (Althaus et al., 2020). Abbildung 15 skizziert den beschriebenen Ablauf der pAKT/AKT-Messungen.

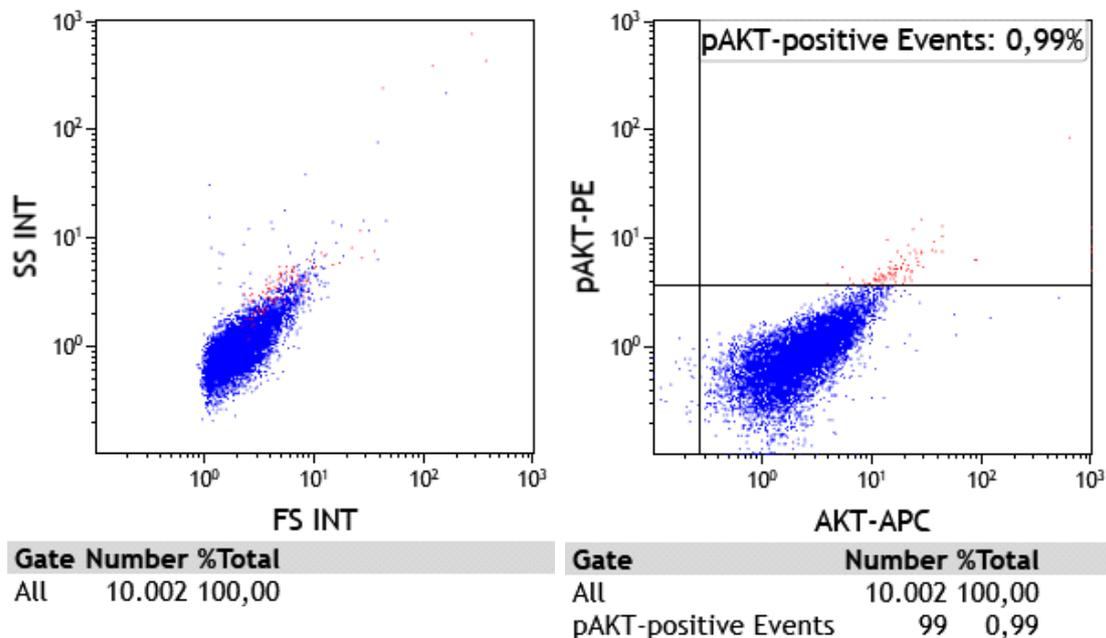


**Abbildung 15: Versuchsaufbau der pAKT/AKT-Messungen**

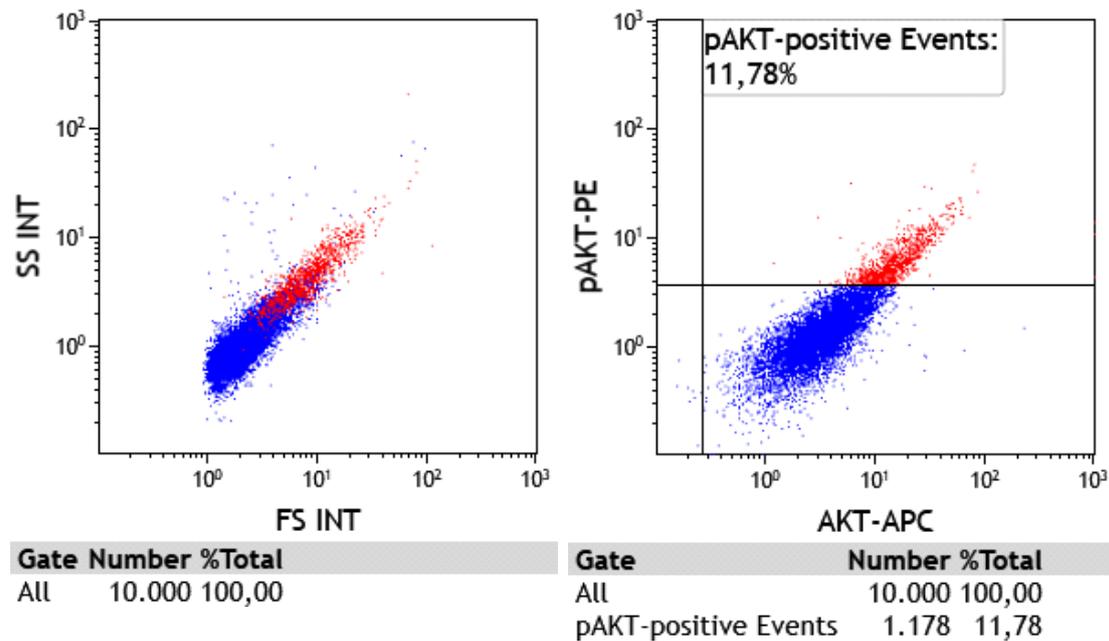
### **2.2.9 Analyse der pAKT/AKT-Messungen**

Zuerst erfolgte auch hier bei den im FACS gemessenen Events eine Kontrolle mittels CD41-PC5-Färbung (FL4-Kanal) um sicherzugehen, dass nahezu alle Zellen den Oberflächenmarker CD41 exprimieren und es sich demnach per Definition um Thrombozyten handelt. Anschließend wurde die AKT-Expression (APC, gemessen im FL6-Kanal) sowie die pAKT-Expression (PE, gemessen im FL2-Kanal) der Zellen beurteilt. Dazu wurden die beiden Kanäle gegeneinander aufgetragen und die Events in vier Sektoren eingeteilt: Events, die weder ein

positives AKT- noch ein positives pAKT-Signal emittierten, Events, die nur ein positives AKT-Signal von sich gaben, Events die nur ein positives pAKT-Signal zeigten, sowie Events, die sowohl ein positives AKT- als auch ein positives pAKT-Signal aufwiesen. Da Thrombozyten aufgrund des Vorhandenseins der AKT-Kinase grundsätzlich ein positives AKT-Signal aufzeigen müssen, wurde der Cut-Off für die Positivität des AKT-Signals so gesetzt, dass alle gemessenen und als Thrombozyten identifizierten Events als AKT-positiv galten. Der Cut-Off für ein positives pAKT-Signal wurde anhand der Negativkontrolle definiert. Da die Zellen sich hier in einem per Definition nicht aktivierten Zustand befinden, wurde der Cut-Off so gesetzt, dass sich maximal ein Prozent der Events in der Negativkontrolle im doppelt positiven Sektor befanden (siehe Abb.16) (Althaus et al., 2020). Die so gesetzten Cut-Off-Werte wurden dann für die weiteren Messungen der mit den Agonisten aktivierten Proben übernommen. Als Maß der Aktivierung wurde der prozentuale Anteil der Zellen festgelegt, die sich im doppelt positiven Sektor befanden. In Abbildung 17, die die Aktivierung mit TRAP-6 zeigt, waren das beispielsweise 11,78 %.



**Abbildung 16: Darstellung der FACS-Messung einer Negativkontrolle.** Links wurde die Zellpopulation nach Granularität und Größe aufgetragen, rechts wurde sie unterteilt nach AKT- sowie pAKT-Expression. Für die Beurteilung der pAKT-positiven Zellen sind die Events im rechten oberen Quadranten entscheidend. Diese wurden bei der Negativkontrolle auf maximal 1 % eingestellt und die Skalierung für die weiteren Messungen verwendet.



**Abbildung 17: Darstellung der FACS-Messung einer Probe nach Aktivierung mit TRAP-6.** Links wird die Zellpopulation nach Granularität und Größe dargestellt, rechts nach AKT- und pAKT-Expression. Die pAKT-positiven Events sind im rechten oberen Sektor dargestellt und rot eingefärbt. Sie betragen nach Inkubation mit TRAP-6 11,78 %.

### 2.2.10 IgG-Isolation

Für die Testung des Effekts der HIT-Seren auf Thrombozyten wurden aus den HIT-Seren IgG-Antikörper isoliert. Für die Definition eines HIT-Serum wurde ein HIT-IgG-Nachweis sowie ein positiver funktioneller Test mit entsprechender Klinik vorausgesetzt. Als Kontrolle dienen IgG aus AB-Seren gesunder Spender. Zur Isolation der Antikörper wurden die Seren zunächst für 30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert (Test Tube Thermostat Model TCR100, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und anschließend für 5 Minuten bei 5000 g mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem separaten Eppendorf-Gefäß aufgefangen und weiterverwendet. Die Aufreinigung der IgG erfolgte mittels des kommerziell erhältlichen Melon™-Gel IgG Spin Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gemäß der durch den Hersteller beschriebenen Anleitung. Anschließend wurde am NanoDrop One (NIH, Bethesda, USA) die Konzentration der IgG gemessen.

### **2.2.11 Inhibierung des Fcγ-Rezeptors II**

Um den Anteil der antikörperinduzierten Signalübertragung vermittelt durch den Fcγ-Rezeptors II (FcγRII) ausmachen zu können, wurde bei einem Teil der verwendeten Thrombozyten mittels eines monoklonalen Anti-CD32-Antikörpers Clone IV.3 (Stemcell technologies, Canada) der FcγRII blockiert (Worthington et al., 1990). Dazu wurden je 75 µl des PRPS mit je 5 µl des IV.3-Antikörpers bei 37 °C für 45 Minuten inkubiert. Danach wurde mit dem PRP wie weiter unten ausgeführt verfahren (Pelzl et al., 2022).

### **2.2.12 Messung der Aktivierung durch HIT-IgG**

Um den Effekt der HIT-IgG auf die Thrombozyten gesunder Spender zu testen und vergleichen zu können, wurden in diesem Experiment verschiedene Ansätze durchgeführt:

Eine Negativkontrolle, um den Ruhezustand der Thrombozyten beurteilen zu können, eine Positivkontrolle mit TRAP (Endkonzentration 20 µM) um zu beurteilen, inwiefern sich die Thrombozyten aktivieren lassen und eine Kontrolle des Effekts des zur Aufreinigung verwendetet Melon Kit Puffers auf die Thrombozyten. In je drei verschiedenen Ansätzen wurden die isolierten Antikörper auf die Thrombozyten gegeben und mit gering konzentriertem Heparin (End-Konzentration 0,3 U/ml), hoch konzentriertem Heparin (End-Konzentration 100 U/ml) oder PBS versehen. Außerdem wurde der Ansatz mit gering konzentriertem Heparin auch an AKT-inhibierten und IV.3-inhibierten Thrombozyten getestet (siehe Tab.14).

Für die Messung der CD62P-sowie pAKT/AKT-Expression wurden die Ansätze, wie in Tabelle 14 dargestellt, für 30 Minuten unter Schwenken inkubiert. Im Anschluss erfolgte für die pAKT/AKT-Messungen eine Fixierung mit Puffer 1 des Perfix-Kits im Verhältnis 1:10 für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Die Permeabilisierung und Färbung sowie das Waschen erfolgte wie im vorherigen Teil zu den pAKT/AKT-Messungen beschrieben.

Für die CD62-Messungen wurden nach Inkubation 5 µl pro Probe entnommen und in 45 µl HANKS-Puffer überführt. Die weiteren Schritte erfolgten dann analog zur oben dargestellten CD62P-Messung nach Aktivierung mit Agonisten.

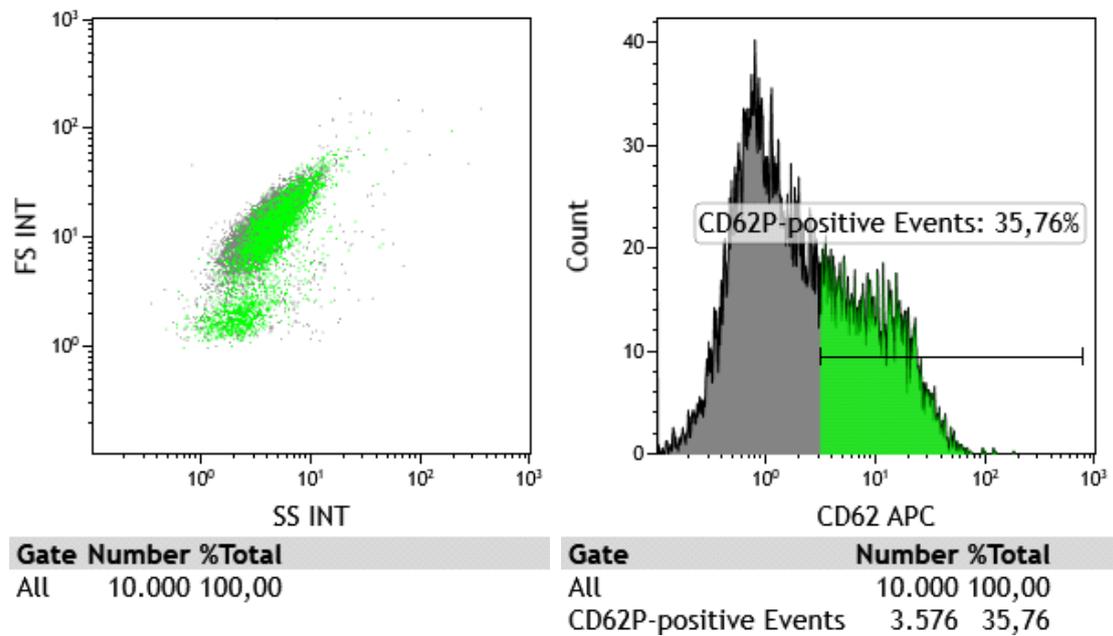
**Tabelle 14: Inkubationsansätze für die Messung der Effekte der HIT-IgG**

Negativkontrolle	15 µl PBS	25 µl PRP	-
Positivkontrolle	15 µl TRAP	25 µl PRP	-
Puffer Melon Kit Kontrolle	7,5 µl Puffer Melon Kit	17,5 µl PRP	-
AB 0,3	5 µl AB IgG	17,5 µl PRP	2,5 µl Heparin 0,3
AB 100	5 µl AB IgG	17,5 µl PRP	2,5 µl Heparin 100
AB PBS	5 µl AB IgG	17,5 µl PRP	2,5 µl PBS
AB IV.3 inhibiert 0,3	5 µl AB IgG	17,5 µl PRP (IV.3 inhibiert)	2,5 µl Heparin 0,3
AB AKT-inhibiert 0,3	5 µl AB IgG	17,5 µl PRP (AKT-inhibiert)	2,5 µl Heparin 0,3
HIT 0,3	5 µl HIT-IgG	17,5 µl PRP	2,5 µl Heparin 0,3
HIT 100	5 µl HIT-IgG	17,5 µl PRP	2,5 µl Heparin 100
HIT PBS	5 µl HIT-IgG	17,5 µl PRP	2,5 µl PBS
HIT IV.3 inhibiert 0,3	5 µl HIT-IgG	17,5 µl PRP (IV.3-inhibiert)	2,5 µl Heparin 0,3
HIT AKT-inhibiert 0,3	5 µl HIT-IgG	17,5 µl PRP (AKT-inhibiert)	2,5 µl Heparin 0,3

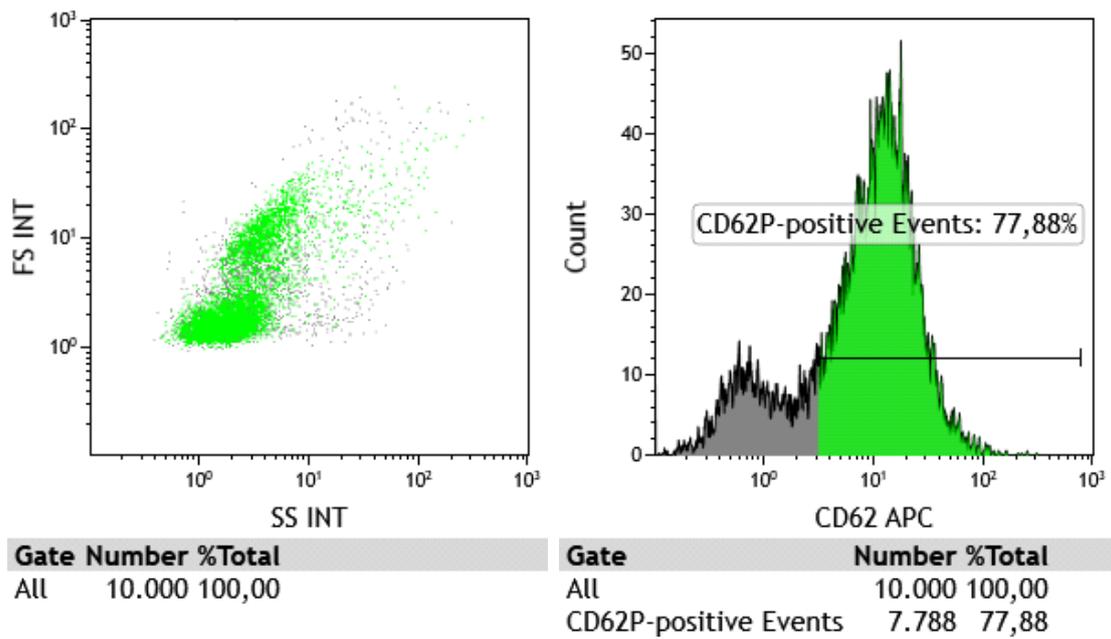
### **2.2.13 Analyse der Messung der Aktivierung durch HIT-IgG**

Um die Wirkung der HIT-IgG sowohl auf die CD62P-Expression als auch auf den AKT-Signalweg zeigen und vergleichen zu können, wurden pro Inkubationsansatz beide Färbungen durchgeführt, wie im Kapitel zuvor dargestellt. Die Auswertungen der FACS-Messungen erfolgten wie bei der Aktivierung durch die Agonisten. Abbildung 18 zeigt die Negativkontrolle, Abbildung 19 beispielhaft die CD62P-Messung nach Inkubation mit HIT-IgG und gering konzentriertem

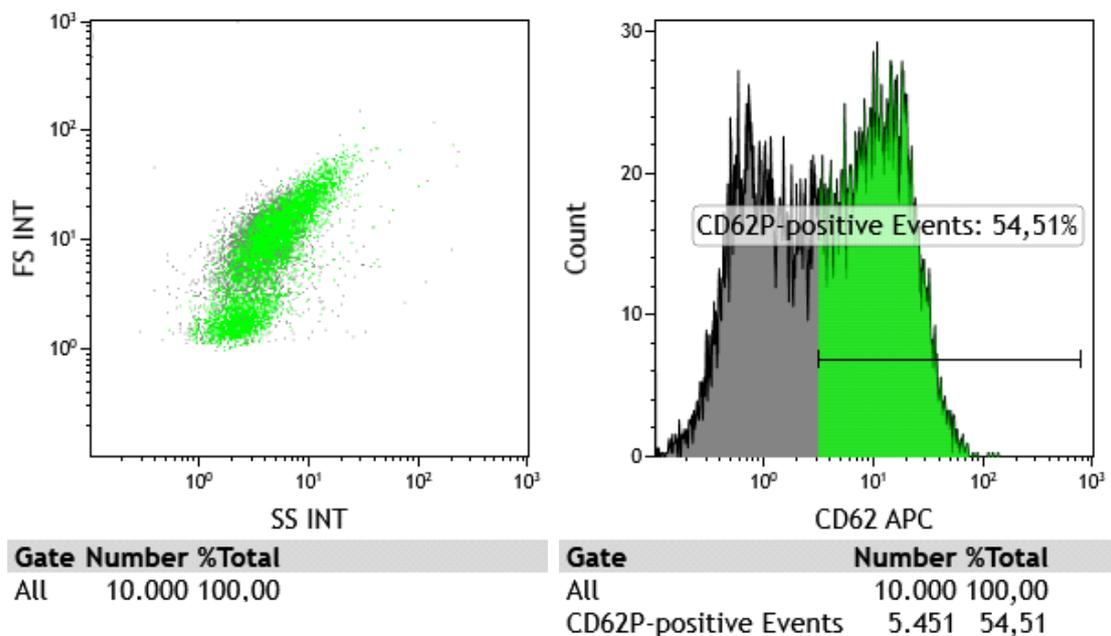
Heparin, Abbildung 20 die CD62P-Expression nach Inkubation mit hoch konzentriertem Heparin.



**Abbildung 18: Darstellung der CD62P-Messung einer Negativkontrolle.** Links ist die Population nach Granularität und Größe dargestellt, rechts die CD62-APC-Expression. Die CD62P-positiven Events sind grün dargestellt und betragen bei der Negativkontrolle 35,76 %.



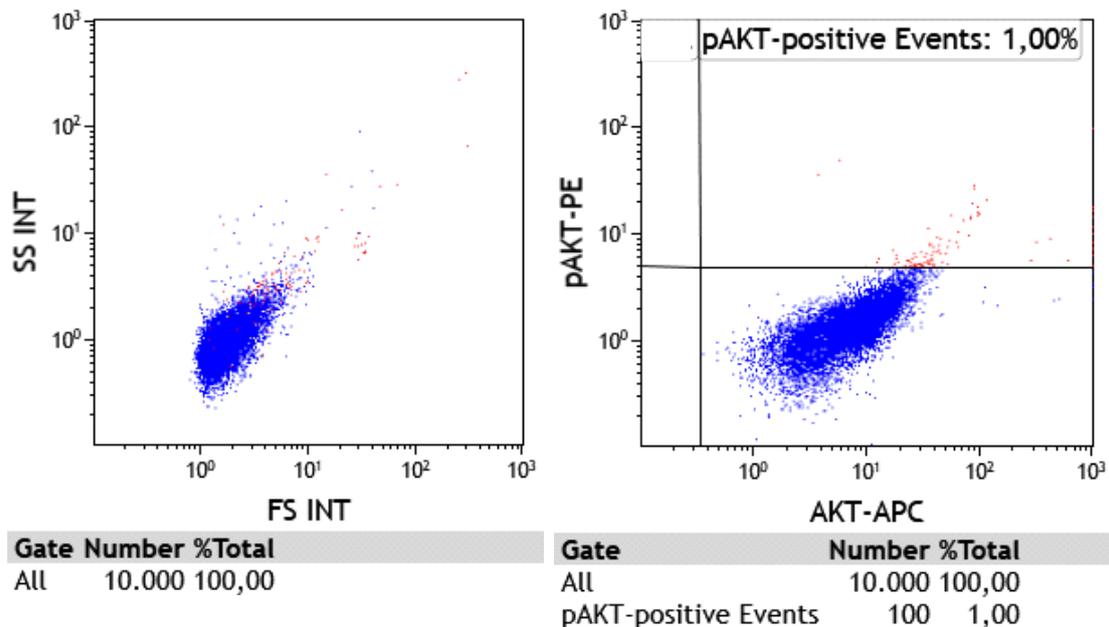
**Abbildung 19: Darstellung der CD62P-Messung nach Inkubation mit HIT-IgG und Heparin 0,3 U/ml.** Links ist die Population nach Granularität und Größe dargestellt, rechts die CD62-APC-Expression. Nach Inkubation mit den HIT-Antikörpern und Heparin mit der Konzentration 0,3 U/ml stieg der Anteil der CD62P-exprimierenden Events auf 77,88 %.



**Abbildung 20: Darstellung der CD62P-Messung nach Inkubation mit HIT-IgG und Heparin 100 U/ml.** Links ist die Population nach Granularität und Größe dargestellt, rechts die CD62-APC-Expression. Nach Zugabe von höher konzentriertem Heparin (100 U/ml) exprimierten nur 54,51 % der Zellen CD62P.

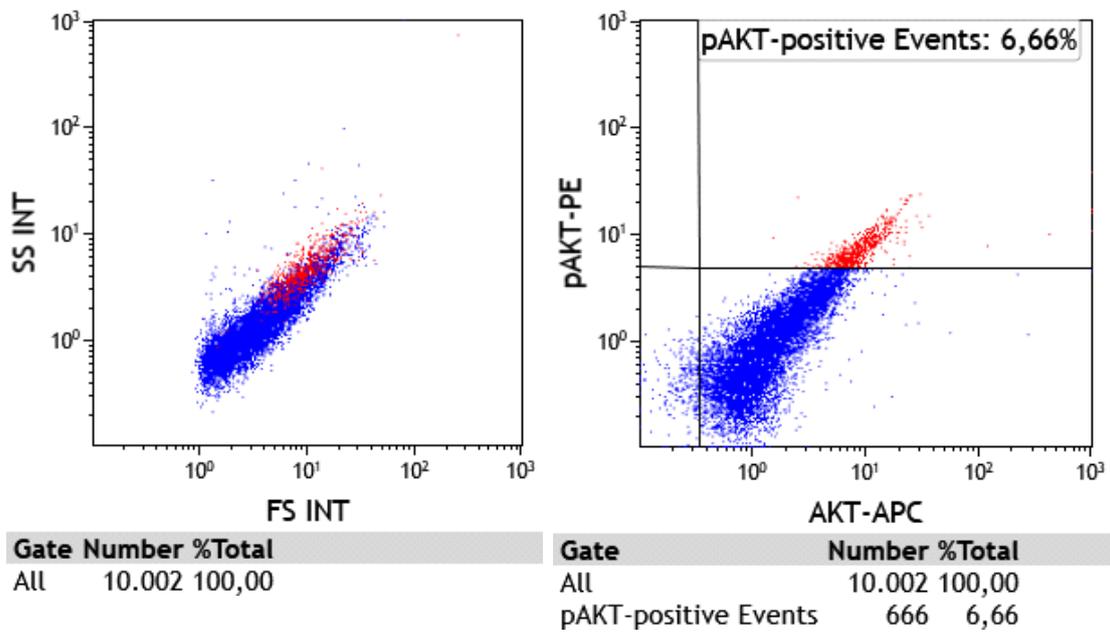
Für die Auswertung wurde, analog wie weiter oben beschrieben, der FI zur jeweiligen Negativkontrolle, also der Quotient aus dem Prozentsatz der CD62P-positiven Events der mit HIT-IgG inkubierten Probe zu dem Prozentsatz der CD62P-positiven Events der Negativkontrolle gebildet, der in diesem Beispiel für das gering konzentrierte Heparin  $77,88 / 35,76 = 2,18$  und für das hoch konzentrierte Heparin  $54,51 / 35,76 = 1,52$  betrug.

Analog zeigen die Abbildungen 21 bis 23 die entsprechenden pAKT/AKT-Messungen zu den entsprechenden Inkubationsansätzen mit den gleichen HIT-IgG. Abbildung 21 zeigt die Negativkontrolle, die als Referenz diente und bei der sich 1 % der Zellen im pAKT-positiven Bereich befanden.

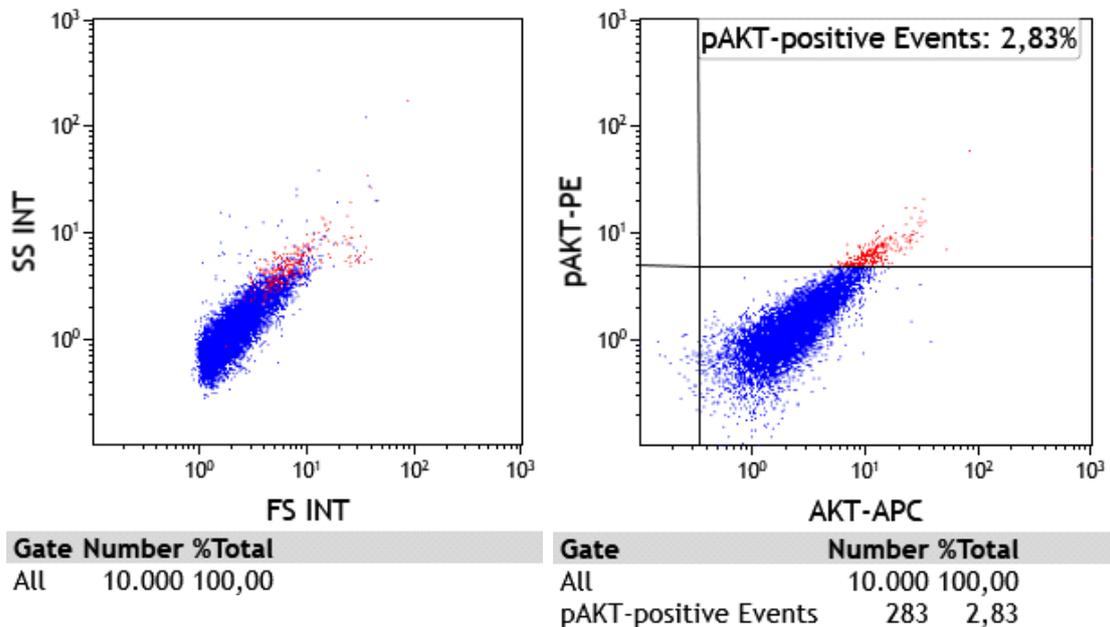


**Abbildung 21: Darstellung der pAKT/AKT-Messung der Negativkontrolle.** Links ist die Population nach Granularität und Größe dargestellt, rechts die AKT- sowie pAKT-Expression. Die pAKT-positiven Events, im rechten oberen Sektor dargestellt und rot eingefärbt, betragen bei der Negativkontrolle 1 %.

Abbildung 22 stellt eine Messung nach Aktivierung mit den HIT-IgG und gering konzentriertem Heparin dar. Hier waren 6,66 % der Zellen pAKT-positiv. Nach Inkubation mit den gleichen HIT-IgG und hoch konzentriertem Heparin waren es dagegen nur 2,83 % (siehe Abb.23).



**Abbildung 22:** Darstellung der pAKT/ACT-Messung nach Inkubation mit HIT-IgG und Heparin 0,3 U/ml. Links ist die Population nach Granularität und Größe dargestellt, rechts die AKT- sowie pAKT-Expression. Nach Inkubation mit den HIT-IgG und Heparin 0,3 U/ml exprimierten 6,66 % der Zellen pAKT.



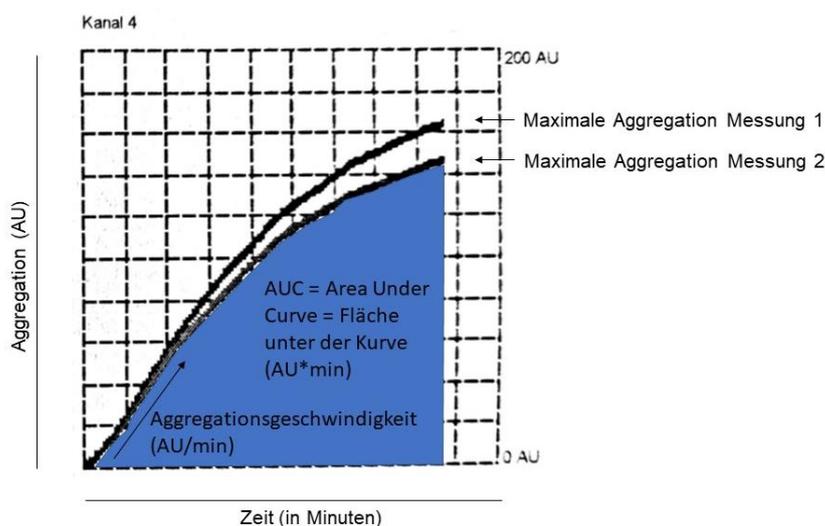
**Abbildung 23:** Darstellung der pAKT/ACT-Messung nach Inkubation mit HIT-IgG und hochkonzentriertem Heparin. Links ist die Population nach Granularität und Größe dargestellt, rechts die AKT- sowie pAKT-Expression. Nach Inkubation mit den HIT-IgG und Heparin 100 U/ml exprimierten lediglich 2,83 % der Zellen pAKT.

## 2.2.14 Standardmethoden für Methodenvergleich

### 2.2.14.1 Vollblut-Impedanz-Aggregometrie

Ähnlich wie die Lichttransmissionsaggregometrie stellt auch die Vollblut-Aggregometrie eine Methode zur Abklärung von Thrombozytenfunktionsstörungen dar. Sie beruht auf der Messung der elektrischen Impedanz zwischen zwei Elektroden. Durch die Zugabe von verschiedenen Agonisten kommt es infolge einer Aktivierung der Plättchen zu einer Veränderung der elektrischen Impedanz, welche über 6 Minuten aufgezeichnet wird. Die Plättchenfunktion wird dabei in Aggregationseinheiten gemessen. Die Ergebnisse werden als Fläche unter der Aggregationskurve angegeben, welche die maximale Aggregation (dargestellt auf der Ordinate) und die Aggregationsgeschwindigkeit (repräsentiert durch die Steigung der Kurve) integriert (Hvas & Favaloro, 2017; Hvas & Grove, 2017).

Für die Durchführung der Vollblut-Aggregometrie wurde der Multiplate®-Analyzer (Roche, Mannheim, Deutschland) verwendet, ein semiautomatisiertes Fünfkanal-Gerät. Für die Messung wurde Blut von gesunden Spendern in zwei EDTA-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) abgenommen und eins davon mit AKT-Inhibitor inkubiert (s.o.)



**Abbildung 24: Beispielmessung des Multiplate®-Analyzers nach Zugabe von TRAP-6,** adaptiert nach (Tran et al., 2015): Auf der Abszisse wird die Zeit in Minuten aufgetragen, auf der Ordinate die Aggregation in Aggregationsunits (AU). Die Steigung der Kurve definiert die Aggregationsgeschwindigkeit (AU/min), die Fläche unter der Kurve (Area Under Curve = AUC) die Gesamtintegration, der wichtigste Parameter zur Beurteilung der Thrombozytenaggregation.

Abbildung 24 stellt eine Beispielmessung des Multiplate®-Analyzers nach Zugabe von TRAP-6 dar. Es werden jeweils zwei Messungen durchgeführt. Auf der X-Achse wird die Zeit in Minuten dargestellt, auf der Y-Achse die Aggregation, die die Zunahme des Widerstands in sogenannten „Aggregations-Units“ (AU) angibt und proportional zur Anzahl der an den Elektroden adhätierenden Thrombozyten ist. Es wird also die Aggregation gegen die Zeit aufgetragen. Die maximale Höhe der Kurven repräsentiert dabei die maximale Aggregation, die Steigung der Kurven die Aggregationsgeschwindigkeit in AU/min. Den wichtigsten Parameter für die Beurteilung der Aggregation im Multiplate®-Analyser stellt die Fläche unter der Kurve (AUC) dar (Tran et al., 2015).

#### 2.2.14.2 Westernblot

Den Goldstandard zur Darstellung von Proteinen stellt der Westernblot dar. Die Methode basiert auf dem Transfer von Proteinen auf eine Membran, welche im Anschluss beispielsweise durch die Bindung von spezifischen Antikörper sichtbar gemacht werden können (Burnette, 1981). Damit stellt der Westernblot eine weitere Methode zum Nachweis der AKT-Kinase und ihrer phosphorylierten Form, der pAKT-Kinase, dar, wie in Althaus et al. demonstriert wird (Althaus et al., 2020). Hierfür wurde PRP wie oben beschrieben mit verschiedenen Agonisten für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte das Waschen und Isolieren der Thrombozyten durch Zentrifugation bei 750 g für 7 Minuten bei 4 °C. Das Pellet aus je 100 µl PRP wurde mit jeweils 50 µl RIPA-Puffer (100x ThermoFisher Scientific, Paisley, UK), in welchen zuvor 1 µl EDTA (0,5 M, 100x ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) und 1 µl Protease- und Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (100x ThermoFisher, Scientific, Waltham, UK) pipettiert wurden, resuspendiert und für 30 Minuten bei 4 °C lysiert. Anschließend wurden die Lysate bei -80 °C gelagert. Für das weitere Verfahren wurden die Proteinkonzentrationen der Lysate am Nanodrop One (VWR, Bruchsal, Deutschland) gemessen. Das Volumen, in dem sich 200 µg Protein befanden, wurde mit einem Drittel des jeweiligen Volumens an Laemmli-Sample-Buffer (BioRad, California, USA) für 5 Minuten bei 95 °C gekocht, auf 15%ige SDS-PAGE-Gele beladen und in einem Laufpuffer für

90 Minuten mittels Trans-Blot® Turbo System (BioRad, California, USA) bei 100V laufen gelassen, um die Proteine durch Elektrophorese zu separieren. Als Referenz wurden 4-5 µl Page Ruler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in eine Tasche beladen. Im Anschluss wurden die Proteine mittels Transferpuffer auf eine Polyvinylidene-Difluorid (PVDF)-Membran (0,45 µm, Merck, Tullagreen, Ireland) übertragen, welche zuvor mit Methanol aktiviert worden war. Unspezifische Bindungen wurden mittels Blocking Buffer (BioRad, California, USA) für 5 Minuten geblockt und die Proben mit den Primärantikörper Anti-AKT1 (1:1000, ab89402, mouse monoclonal, abcam, Cambridge, UK) und pAKT1 (1:1000, Invitrogen, 44-623G, Waltham, MA, USA) über Nacht unter ständigem Rotieren bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T Buffer für 10 Minuten erfolgte die Bindung der entsprechenden anti-mouse und anti-rabbit-konjugierten Sekundärantikörpern (1:3000, IRDye®680/IRDye®800, LI.COR®, Lincoln, US) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Es folgten drei weitere zehnmünütige Waschschrirte mit TBS-T, dann wurden die Proteinbanden mittels eines Imaging System (Li-Cor, Lincoln, USA) detektiert.

#### 2.2.14.3 ELISA

Der Enzym-Linked Immunoabsorbent Assay (=ELISA) dient als Screeningtest auf Anti-Heparin/PF4-Antikörper bei Verdacht auf eine HIT und einem 4-T-Score über drei Punkten. Das Testprinzip beruht darauf, dass das Zielantigen, in diesem Falle der PF4/Polyanionen-Komplex, an eine feste Phase wie eine Mikrotiterplatte gebunden ist. Zu diesem Antigen werden Patientenserum sowie Enzym-markierte Sekundärantikörper gegeben, welche an die gebundenen Anti-Heparin/PF-Antikörper im Patientenserum binden, um das Vorhandensein dieser zu detektieren. Die Enzymaktivität der Sekundärantikörper führt dabei zu einer Farbveränderung der zu messenden Probe, deren optische Dichte proportional zu der Menge der vorhandenen Antikörper ist (Nagler & Bakchoul, 2016).

Für die Messungen wurde das ELISA-Kit Zymutest HIA IgG (Hyphen-BioMed, Neuville-Sur-Oise, Frankreich) zum qualitativen Nachweis Heparin- bzw Protaminsulfat-abhängiger Antikörper vom IgG-Isotyp verwendet. In eine

Mikrotiterplatte wurden dazu in jede Vertiefung 50 µl Plättchenlysat pipettiert, dazu wurden jeweils 200 µl Leerwert bzw. Kontrollen oder vorher 1:100 verdünnte Proben von Patientenseren gegeben. Dies wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (Amiral et al., 1992; Warkentin et al., 1995) und anschließend in fünf Waschschritten gereinigt (Amiral et al., 1995). Dann wurden 200 µl Anti-(h)-Fcγ-HPR-Immunkonjugat hinzugegeben, für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert (Amiral et al., 1992; Warkentin et al., 1995) und erneut fünf Mal gewaschen (Amiral et al., 1995). Nach dem letzten Waschschriff wurden 200 µl Peroxidasesubstrat hinzupipettiert (Amiral et al., 1995; Amiral et al., 1996) und nach erneuten fünf Minuten Inkubationszeit in jede Vertiefung 50 µl Stopplösung gegeben, um die Farbreaktion zu stoppen (Amiral et al., 1996). Zum Stabilisieren der Farbe wurden die Proben erneut zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Amiral et al., 1992; Warkentin et al., 1995), dann erfolgte die Messung der Absorption bei 450nm (Warkentin & Sheppard, 2006). Von den jeweiligen Ergebnissen wurde der Leerwert abgezogen. Ab einem  $A_{450}$ -Wert von 0,3 gelten die Proben als schwach positiv, ab einem  $A_{450}$ -Wert von  $>0,5$  als positiv.

#### 2.2.14.4 Heparin-induzierter Plättchen-Aktivierungsassay

Der HIPA (= Heparin-induzierte Plättchen-Aktivierungsassay) stellt einen funktionalen Assay zur Diagnose der HIT dar, der auf der Heparin-abhängigen Aktivierung von Plättchen durch Patientenseren beruht. Er dient als Bestätigungstest nach klinisch wahrscheinlichem Vorliegen einer HIT gemäß klinischem Score sowie positivem Immunoassay und besitzt eine hohe Spezifität bei mäßiger Sensitivität. Im Gegensatz zum Immunoassay ist der HIPA in der Lage, die Aktivität von Anti-Heparin/PF4-Antikörpern zu beurteilen. Die Kombination aus Immunoassay und funktionellem HIPA vereint eine hohe Sensitivität mit einer hohen Spezifität, sodass für die Diagnostik der HIT eine Kombination der beiden Tests empfohlen wird (Farm et al., 2017). Für den HIPA wurden gewaschene Plättchen verwendet, welche aus dem Blut gesunder Spender ohne Medikamenteneinnahme hergestellt wurden. Dazu wurden 8,4 ml Blut in ACD-A-Röhrchen (Becton

Dickinson, Plymouth, UK, enthalten 1,6 ml Acid-Citrat-Dextrose) abgenommen. Die Röhrchen wurden 5 Minuten bei 37 °C in einem 45°-Winkel ruhen gelassen und anschließend für 20 Minuten bei 120 g (860 U/min,  $r = 13,5$  cm, ohne Bremse) zentrifugiert, um PRP zu erhalten. Das abpipettierte PRP wurde mit 111  $\mu$ l warmer ACD-Lösung pro ml auf einen pH von 6,3 eingestellt. Anschließend wurden 5  $\mu$ l Apyrase (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) pro ml PRP hinzugegeben. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 7 min bei 650 g (2200 U/min,  $r = 13,5$  cm, ohne Bremse). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert, die Thrombozyten in 5ml Waschpuffer resuspendiert und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Suspension wurde erneut für 7 min bei 650 g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Anschließend wurden die Thrombozyten in circa 2 ml Suspensionspuffer resuspendiert, auf 300.000/ $\mu$ l eingestellt und die Thrombozytensuspension für 45 min bei 37 °C inkubiert.

Für den Testansatz wurden je 75  $\mu$ l Thrombozytensuspension mit 20  $\mu$ l Patientenserum bzw. negativem oder positivem Kontrollserum und 10  $\mu$ l Heparin/Hirudin/Kollagen/Suspensionspuffer je nach Ansatz (siehe Tabellen 15 und 16) bei 45 Minuten auf einem Magnetrührer (500 rpm) inkubiert. Das positive Kontrollserum sowie das Kollagen dienten dabei der Prüfung der Funktionsfähigkeit der Testthrombozyten. Zur Auswertung wurde die Transparenz der Plättchensuspension alle 5 Minuten beobachtet und mit den Kontrollen verglichen (Greinacher et al., 1991; Warkentin, 2000). Bei ausbleibender Aktivierung bleibt die Plättchensuspension trüb, während die Transparenz bei einer stattgefundenen Aktivierung zunahm. Bei jedem Ansatz wurde bei Transparenzzunahme notiert, nach welcher Zeit diese stattfand (time to aggregation). Dabei ist beim Vorhandensein von HIT-Antikörpern im Patientenserum keine Aktivierung der Thrombozyten bei dem Ansatz mit hoch konzentriertem Heparin zu erwarten, jedoch eine Aktivierung bei dem Ansatz mit Reviparin. Das Hirudin dient dabei der Hemmung unspezifischer Aktivierungen durch eine Thrombininhibition.

**Tabelle 15: Pipettierschema der Patientenproben im HIPA**

	<b>Patient</b>		
	Pufferkontrolle	Hirudin/Reviparin	Heparin
	20 µl Patientenserum 10 µl Suspensionspuffer	20 µl Patientenserum 10 µl Hirudin (50 E/ml) 10 µl Reviparin (2,1 U/ml)	20 µl Patientenserum 10 µl Heparin (1050 U/ml)
Testzellsuspension	je 75 µl Thrombozytensuspension		

**Tabelle 16: Pipettierschema der Kontrollen im HIPA**

	<b>Kontrolle</b>			
	1. Kontrolle	2. Kontrolle	3. Kontrolle	4. Kontrolle
	20 µl neg. Kontrollserum 10 µl Kollagen (10 µg/ml)	20 µl neg. Kontrollserum 10 µl Hirudin (50 E/ml) 10 µl Reviparin (2,1 U/ml)	20 µl pos. Kontrollserum 10 µl Hirudin (50 E/ml) 10 µl Reviparin (2,1 U/ml)	20 µl pos. Kontrollserum 10 µl Heparin (1050 U/ml)
Testzellsuspension	je 75 µl Thrombozytensuspension			

### 2.3 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden mittels GraphPad Prism Version 8.0 (GraphPad, San Diego, California, USA) durchgeführt. Für die Analyse der Daten wurden unter Annahme der Normalverteilung ungepaarte oder gepaarte t-Tests verwendet. Die Daten wurden als Mittelwert (Mean) ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM, engl. „standard error of the mean“) angegeben, ab einem p-Wert von <0,05 wurde von einer statistischen Signifikanz ausgegangen.

## **2.4 Ethische Hintergründe**

Die Verwendung von Proben menschlicher Spender wurde von der Ethikkommission (507/2017B01; 457/2016B02) der Eberhard-Karl-Universität Tübingen genehmigt und wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt.

## **3 Ergebnisse**

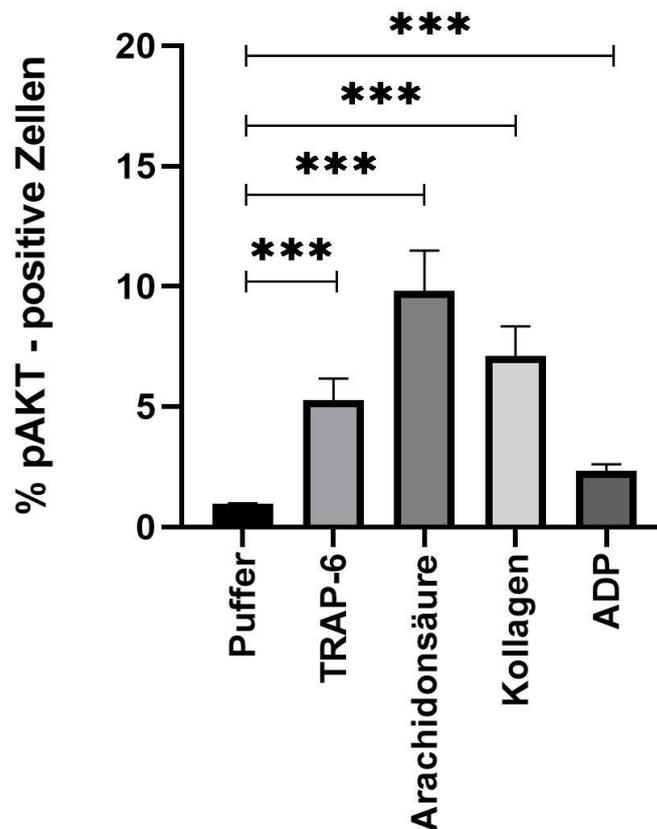
Die Messungen, die Grundlage dieser Doktorarbeit bilden, lassen sich in zwei Themenkomplexe aufteilen: Den ersten Teil stellen die Etablierung einer Methode zur Messung der pAKT-Expression am Durchflusszytometer und der Vergleich der Ergebnisse mit den bisherigen Standardmethoden dar, den zweiten Teil die klinische Anwendung der pAKT-Messung mit HIT-IgG. Außerdem wurden die erhobenen Daten mit etablierten Methoden der HIT-Diagnostik, dem 4-T-Score, dem ELISA und der time to aggregation im HIPA verglichen.

Ein Teil der Ergebnisse, die im Verlauf der Arbeit an der Dissertation erhoben wurden, wurde bereits von Althaus, Wagner et al. publiziert (Althaus et al., 2020). Die in dieser Dissertationsschrift präsentierten Daten stellen eine aktualisierte Form der erhobenen Daten dar.

### **3.1 Messungen der pAKT- sowie CD62P-Expression nach Inkubation mit verschiedenen Agonisten**

#### **3.1.1 pAKT-Messungen**

Um die Funktionalität der Thrombozyten darzustellen, wurde die pAKT-Expression, also des prozentualen Anteils der phosphorylierten Form der AKT-Kinase, am Durchflusszytometer mit und ohne Zugabe verschiedener Agonisten an 13 verschiedenen Spendern gemessen. Verwendet wurden die Agonisten TRAP-6 (20  $\mu$ M), Arachidonsäure (1,5 mM), Kollagen (10  $\mu$ g/ml) und ADP (15  $\mu$ M) (siehe Abb. 25).



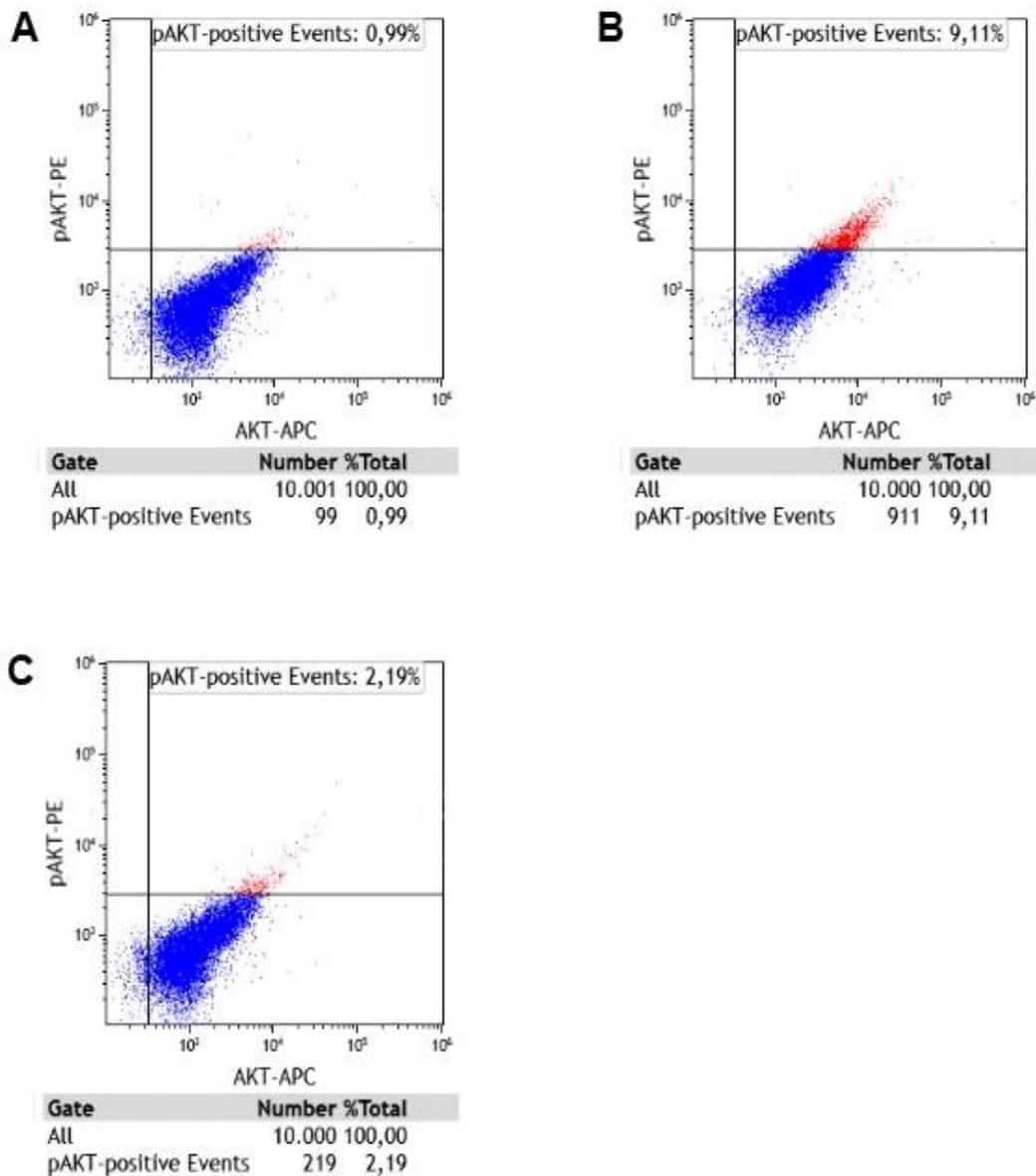
**Abbildung 25: Prozentuale Werte der pAKT-positiven Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Agonisten (TRAP-6, Arachidonsäure, Kollagen, ADP) im Vergleich zur Negativkontrolle mit Puffer:** Inkubation mit allen Agonisten führte zu einem signifikanten Anstieg der p-AKT Expression (% der pAKT-positiven Zellen Mean±SEM: 5,28±0,89 vs. 0,97±0,02, p-Wert=0.0004 bei TRAP-6; 9,82±1,68 vs. 0,97±0,02, p-Wert=0.0002 bei Arachidonsäure; 7,10±1,23 vs. 0,97±0,02, p-Wert=0,0004 bei Kollagen und 2,32±0,28 vs. 0,97±0,02 p-Wert=0,0005 bei ADP, Signifikanzniveaus: \* = p≤0,05, \*\* = p≤0,01, \*\*\* = p≤0,001, \*\*\*\* = p≤0,0001). Abkürzungen: SEM= Standardfehler des Mittelwertes (engl. „standard error of the mean“)

Dabei zeigten alle Agonisten einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Arachidonsäure führte zur stärksten Phosphorylierung der AKT-Kinase im Vergleich zu Puffer (prozentualer Anteil der pAKT-positiven Zellen Mean±SEM: 9,82±1,68 vs. 0,97±0,02, p-Wert=0.0002), gefolgt von Kollagen (7,10±1,23 vs. 0,97±0,02, p-Wert=0.0004), TRAP-6 (5,28±0,89 vs. 0,97±0,02 p-Wert=0,0004) und ADP (2,32±0,28 vs. 0,97±0,02, p-Wert=0,0005). Verwendet wurde der gepaarte, parametrische t-Test zum Testen der Signifikanzen unter Annahme einer Normalverteilung der Daten.

Um die Spezifität der Aktivierung zu überprüfen, wurde der prozentuale Anteil der phosphorylierten Form der AKT-Kinase nach Inkubation jeweils mit und ohne den AKT-Inhibitor Bay1125976 gemessen (siehe Abb. 26). Hier konnte gezeigt werden, dass es bei allen Induktoren zu einer signifikanten Abnahme der Phosphorylierung nach Zugabe des AKT-Inhibitors kam. Dies zeigt, dass es sich nicht um eine unspezifische Reaktion, sondern um ein spezifisch gemessenes Signal handelt (Tab. 17, Abb. 27). Unter Verwendung der Inhibitoren kam es jedoch zu keiner vollständigen Hemmung, was durch eine Voraktivierung der Thrombozyten erklärt werden kann.

**Tabelle 17: Prozentuale Werte der pAKT-Expression von 13 verschiedenen Spendern nach Inkubation mit verschiedenen Agonisten (TRAP-6, Arachidonsäure (=ARA), Kollagen, ADP) mit und ohne vorherige Inkubation des PRP mit dem AKT-Inhibitor Bay1125976 (=AKT-I), \*Wert wurde aufgrund eines Pipettierfehlers aus der Wertung genommen**

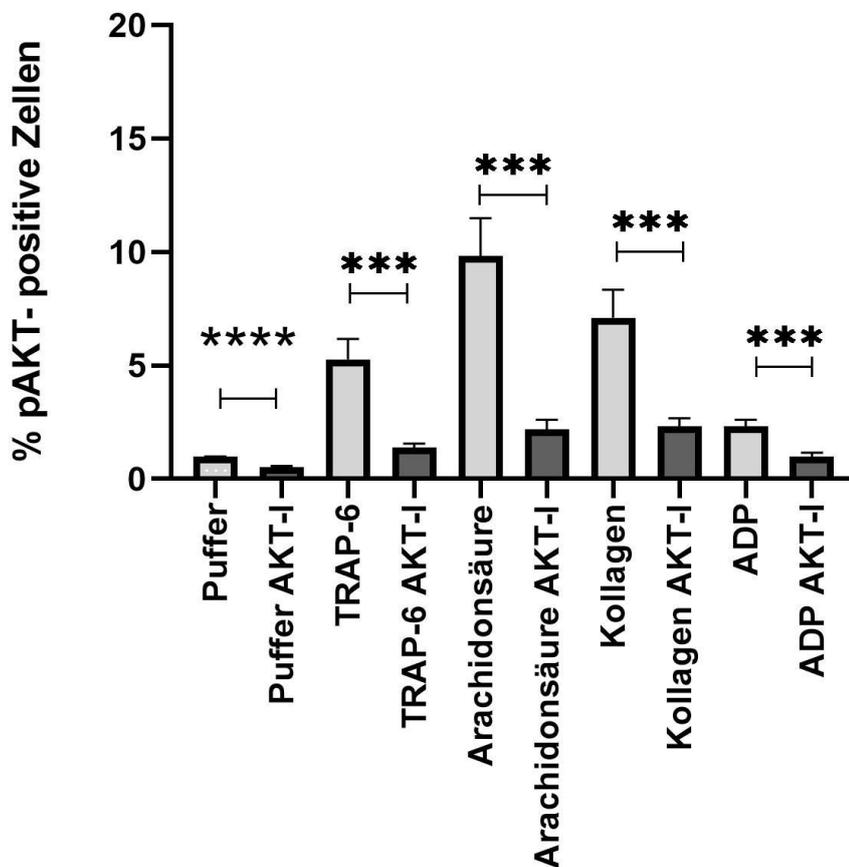
Spender	Puffer	Puffer AKT-I	TRAP6	TRAP6 + AKT-I	ARA	ARA AKT-I	Kollagen	Kollagen AKT-I	ADP	ADP AKT-I
1	1,04	0,47	3,79	0,84	7,22	0,52	0,43*	1,00	0,70	0,52
2	0,95	0,05	8,60	0,06	3,92	0,98	3,83	2,49	2,36	0,08
3	0,96	0,40	2,60	0,59	4,98	1,26	5,12	1,14	0,91	0,66
4	0,93	0,41	2,15	1,34	17,64	1,96	6,8	2,45	1,66	1,15
5	1,00	0,60	6,85	1,69	15,36	2,38	5,51	0,80	2,14	0,25
6	1,05	0,66	1,58	1,31	5,27	1,85	3,71	1,15	1,93	1,42
7	0,99	1,02	7,55	1,54	14,08	4,01	4,49	1,15	1,87	1,16
8	0,82	0,46	4,59	1,33	10,80	1,48	7,99	4,02	2,78	0,35
9	0,99	0,31	11,78	1,77	4,78	5,19	15,42	3,73	3,94	1,30
10	0,98	0,45	3,75	0,96	15,89	1,08	4,50	2,04	3,47	0,63
11	0,99	0,47	9,11	2,19	20,12	4,61	15,11	4,10	3,98	2,05
12	0,96	0,48	1,84	1,44	2,72	1,14	3,03	1,96	1,97	1,34
13	1,00	0,87	4,40	2,71	4,85	2,05	9,74	4,11	2,46	1,85



**Abbildung 26: Durchflusszytometrische Darstellung der pAKT-positiven Events**, A: nach Inkubation mit Puffer (PBS), dient als Negativkontrolle; B: nach Inkubation mit TRAP-6; C: nach Inkubation mit TRAP-6 und vorheriger AKT-Inhibition. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme der pAKT-positiven Events nach Inkubation mit TRAP im Vergleich zur Negativkontrolle (9,11 % vs. 0,99 %). Die zusätzliche Inkubation mit AKT-Inhibitor führte wiederum zu einer Abnahme (2,19 % vs. 9,11 %).

Es zeigte sich, wie auch in Abbildung 27 zu sehen, dass die Präinkubation mit AKT-Inhibitor zu einer signifikanten Abnahme des phosphorylierten Anteils der AKT-Kinase führte. Dabei nahm der prozentuale Anteil der pAKT-exprimierenden Thrombozyten bei der Negativkontrolle von  $0,97 \pm 0,02$  auf  $0,51 \pm 0,07$  ab, p-

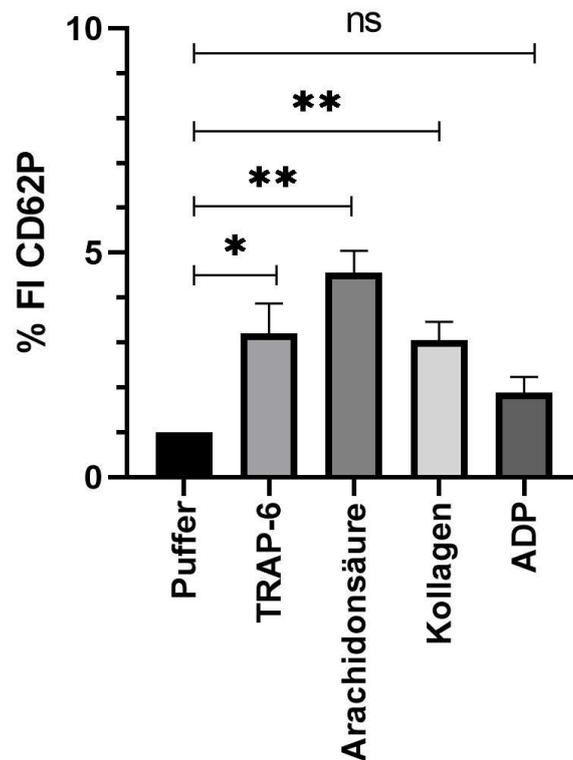
Wert<0,0001. Bei den mit den verschiedenen Agonisten inkubierten Thrombozyten zeigte sich bei TRAP-6 eine signifikante Abnahme von  $5,28 \pm 0,89$  auf  $1,37 \pm 0,19$ ,  $p=0,0008$ , bei Arachidonsäure eine signifikante Abnahme von  $9,82 \pm 1,68$  auf  $2,19 \pm 0,41$ ,  $p\text{-Wert}=0,0004$ , bei Kollagen von  $7,10 \pm 1,23$  auf  $2,32 \pm 0,36$ ,  $p\text{-Wert}=0,0006$  und bei ADP von  $2,32 \pm 0,28$  auf  $0,98 \pm 0,17$ ,  $p\text{-Wert}=0,0004$ . Auch hier wurde unter Annahme einer Normalverteilung der gepaarte, parametrische t-Test angewandt.



**Abbildung 27: Darstellung des prozentualen Anteils der pAKT-positiven Zellen nach Inkubation mit Puffer bzw. den verschiedenen Agonisten im Vergleich mit und ohne vorherige Hemmung der AKT-Kinase durch Bay1125976 (=AKT-I):** Die AKT-Inhibition führte in allen Fällen zu einer signifikanten Abnahme der AKT-Expression (% der pAKT-positiven Zellen Mean ± SEM: Puffer:  $0,51 \pm 0,07$  vs.  $0,97 \pm 0,02$ ,  $p\text{-Wert}<0,0001$ ; TRAP-6:  $1,37 \pm 0,19$  vs.  $5,28 \pm 0,89$ ,  $p\text{-Wert}=0,0008$ ; Arachidonsäure:  $2,19 \pm 0,41$  vs.  $9,82 \pm 1,68$ ;  $p\text{-Wert}=0,0004$ ; Kollagen:  $2,32 \pm 0,36$  vs.  $7,10 \pm 1,23$ ,  $p=0,0006$ ; ADP:  $0,98 \pm 0,17$  vs.  $2,32 \pm 0,28$ ,  $p=0,0004$ , Signifikanzniveaus: \* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ ). Abkürzungen: SEM= Standardfehler des Mittelwertes (engl. „standard error of the mean“).

### 3.1.2 CD62P-Messungen

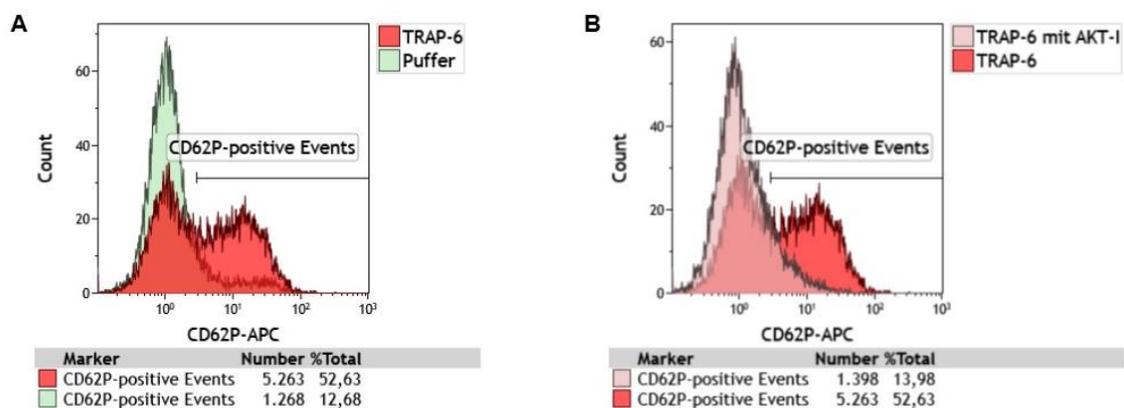
Um die Methode mit etablierten Standardverfahren zu vergleichen, wurde zunächst anhand von fünf Spendern die CD62P-Expression als Thrombozyten-Aktivierungsmarker nach Inkubation mit den gleichen Agonisten bestimmt. Dies geschah im Vergleich zu einer mit Puffer inkubierten Negativkontrolle als bewährtes Maß für den Aktivierungszustand der Thrombozyten (siehe Abb. 28, Abb. 29A).



**Abbildung 28: Darstellung des FI der prozentualen CD62P-Expression nach Inkubation von PRP fünf verschiedener Spender mit TRAP-6, Arachidonsäure, Kollagen sowie ADP:** Bis auf ADP führten alle Agonisten zu einem signifikanten Anstieg der CD62P-Expression im Vergleich zur Negativkontrolle mit Puffer (FI % CD62P Mean±SEM; 3,20±0,67 vs. 1,00, p-Wert=0,030 bei TRAP-6; 4,55±0,49 vs. 1,00, p-Wert =0,0019 bei Arachidonsäure; 3,05±0,41 vs. 1,00, p-Wert=0,0075 bei Kollagen; 1,89±0,35 vs. 1,00, p-Wert=0,0621 bei ADP, Signifikanzniveaus: \* = p≤0,05, \*\* = p≤0,01, \*\*\* = p≤0,001, \*\*\*\* = p≤ 0,0001). Abkürzungen: FI = Fold Increase (entspricht Quotient aus Agonisten-Werten und Negativkontrolle); ns= nicht signifikant (p≥0,05), SEM= Standardfehler des Mittelwertes (engl. „standard error of the mean“)

Wie bei den pAKT-Messungen sah man auch hier nach Inkubation mit den verschiedenen Agonisten jeweils einen Anstieg der CD62P-Expression, was für eine erfolgte Aktivierung der Thrombozyten spricht. In Analogie zur pAKT-Expression zeigte die CD62P-Expression ebenfalls den stärksten Anstieg im Vergleich zur Negativkontrolle (Puffer) nach Inkubation mit Arachidonsäure ( $4,55 \pm 0,49$  vs.  $1,00$ ,  $p=0,0019$ ). Auch die Inkubation mit TRAP-6 erzeugte einen signifikanten Anstieg der CD62P-Expression ( $3,20 \pm 0,67$  vs.  $1,00$ ,  $p\text{-Wert}=0,030$ ), ebenso Kollagen ( $3,05 \pm 0,41$  vs.  $1,00$ ,  $p\text{-Wert}=0,0075$ ). Nach der Inkubation mit ADP war ebenfalls ein Anstieg der CD62P-Expression auszumachen, dieser erreichte jedoch knapp keine Signifikanz ( $1,89 \pm 0,35$  vs.  $1,00$ ,  $p\text{-Wert}=0,0621$ ).

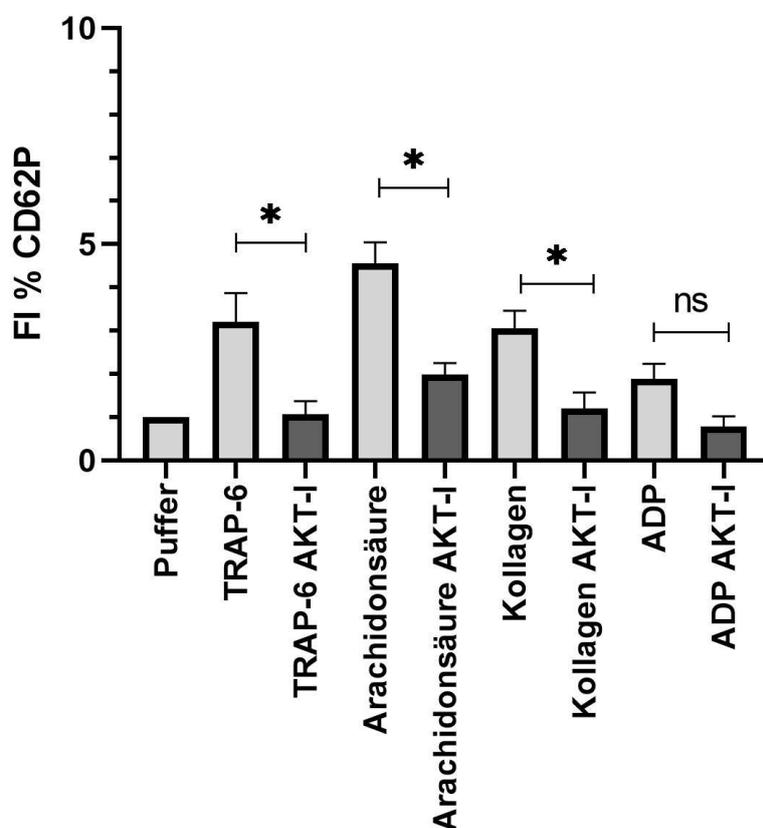
Auch bei der Messung der CD62P-Expression wurde jeweils der Anstieg mit und ohne Präinkubation mit dem AKT-Inhibitor Bay1125976 verglichen (siehe Tab.18, Abb. 29 B, Abb. 30). Hier kam es zu einer deutlichen Abnahme des Aktivierungszustandes, was zeigt, dass die CD62P-Expression abhängig von dem Phosphorylierungsweg der AKT-Kinase ist.



**Abbildung 29: Darstellung der CD62P-Expression im Vergleich zwischen Puffer und TRAP-6 (A) sowie TRAP-6 und TRAP-6 mit AKT-Inhibitor (B):** A: Im Vergleich zur Negativkontrolle mit Puffer führte die Aktivierung zu einem Rechtsshift der Kurve, der prozentuale Anteil von CD62P-exprimierenden Zellen stieg von 12,68 auf 52,63 %. B: Die Inhibition der AKT-Kinase führte zu einem Linksshift der Kurve, die CD62P-exprimierenden Events nahmen ab und erreichten mit 13,98 % nahezu wieder das Niveau der Negativkontrolle.

**Tabelle 18: FI der prozentualen Anteile der CD62P-Expression nach Inkubation mit verschiedenen Agonisten** (TRAP-6, Arachidonsäure, Kollagen oder ADP), Vergleich mit und ohne AKT-Inhibitor, n=5. Abkürzungen: FI = Fold Increase, ARA= Arachidonsäure, AKT-I = AKT-Inhibitor

Spender	Puffer	TRAP	TRAP AKT-I	ARA	ARA AKT-I	Kol- lagen	Kol- lagen AKT-I	ADP	ADP AKT-I
1	1,00	2,46	0,68	5,72	2,46	2,77	2,46	3,01	0,47
2	1,00	3,04	2,20	4,26	2,45	1,75	2,45	1,64	1,66
3	1,00	1,25	0,54	5,70	1,26	3,05	1,26	0,89	0,27
4	1,00	4,15	0,83	3,51	1,40	3,43	0,90	2,15	0,59
5	1,00	5,11	1,10	3,57	2,36	4,25	2,00	1,76	0,89



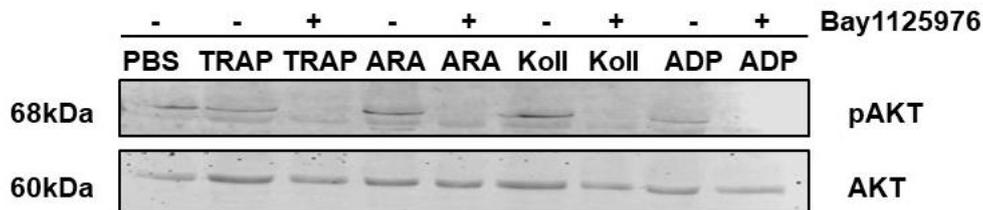
**Abbildung 30: Darstellung des FI der prozentualen Anteile der CD62P-Expression nach Inkubation von PRP fünf verschiedener Spender mit TRAP-6, Arachidonsäure, Kollagen oder ADP im Vergleich mit und ohne vorheriger Inhibition der AKT-Kinase durch Bay1125976 (=AKT-I):** Der Anstieg der CD62P-Expression nach Inkubation mit TRAP, Arachidonsäure und Kollagen ließ sich durch die Hemmung von AKT im Vergleich zur nicht-inhibierten Kontrolle signifikant reduzieren, wohingegen bei ADP keine signifikante Hemmung der CD62P-Expression ausgemacht werden konnte (FI % CD62P Mean±SEM, Vergleich mit vs. ohne AKT-Inhibition: TRAP-6: 1,07±0,30 vs. 3,20±0,67, p-Wert=0,0322; Arachidonsäure: 1,99±0,27 vs. 4,55±0,49, p-Wert=0,0111; Kollagen: 1,20±0,38 vs. 3,05±0,41, p-Wert=0,0328; ADP: 0,78±0,24 vs. 1,89±0,35, p-Wert=0,0634, Signifikanzniveaus: \* = p≤0,05, \*\* = p≤0,01, \*\*\* = p≤0,001, \*\*\*\* = p≤0,000). Abkürzungen: FI = Fold Increase, ns= nicht signifikant (p≥0,05), SEM= Standardfehler des Mittelwertes (engl. „standard error of the mean“).

Die Inhibition der AKT-Kinase führte zu einer signifikant geringeren CD62P-Expression nach Inkubation mit Arachidonsäure verglichen mit den nicht gehemmten Thrombozyten ( $1,99 \pm 0,27$  vs.  $4,55 \pm 0,49$ , p-Wert=0,0111), ebenso nach Inkubation mit TRAP-6 ( $1,07 \pm 0,30$  vs.  $3,20 \pm 0,67$ , p-Wert=0,0322). Mit Kollagen inkubierte AKT-inhibierte Thrombozyten wiesen ebenfalls eine signifikant geringere CD62-Expression auf im Vergleich zum ungehemmten Zustand ( $1,20 \pm 0,38$  vs.  $3,05 \pm 0,41$ , p-Wert=0,0328). Nach Inkubation mit ADP unterschied sich die CD62P-Expression des mit AKT-Inhibitor vorinkubierten PRP nicht signifikant von der des nicht gehemmten PRP ( $0,78 \pm 0,24$  vs.  $1,89 \pm 0,35$ , p-Wert=0,0634). Dies lässt sich vermutlich auf eine geringe Fallzahl von  $n=5$  zurückführen. Die Signifikanzen wurden hier ebenfalls mit dem gepaarten, parametrischen t-Test erhoben.

## **3.2 Vergleich der pAKT-Messungen mit weiteren Standardmethoden**

### **3.2.1 Westernblot**

Um die Ergebnisse der pAKT-Messungen und ihre Aussagekraft besser interpretieren und in einen wissenschaftlichen Kontext einordnen zu können, wurden die Messungen mit bislang etablierten Methoden verglichen. Eine konventionelle Methode zur Messung der Expression von Proteinen stellt der Westernblot dar. Im Westernblot wurden die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt und mit spezifischen Antikörper gegen phosphoryliertes (pAKT) und nicht-phosphoryliertes AKT (AKT) inkubiert, um den Phosphorylierungsgrad zu visualisieren. Dazu wurde PRP wie in Kapitel 2.2.9 beschrieben zu einem Teil mit dem AKT-Inhibitor (Bay1125976) vorbehandelt, ein anderer Teil blieb unbehandelt. Anschließend wurden die Ansätze mit den verschiedenen Agonisten inkubiert. Ein Aliquot der jeweiligen Probe wurde für die FACS-Messung und das zweite Aliquot als Proteinlysate für das Westernblot-System vorbereitet (siehe Abb. 31)



**Abbildung 31: Darstellung der Proteinlevel von AKT und pAKT nach Stimulation der Proben mit verschiedenen Agonisten, jeweils mit und ohne vorherige Präinkubation mit dem AKT-Inhibitor BAY1125976:** Die phosphorylierte Form der AKT-Kinase (pAKT) präsentiert sich auf der 68-kDa-Bande und AKT auf der 60-kDa-Bande. Nach Inkubation der Proben mit den verschiedenen Agonisten (TRAP 20  $\mu$ M, Arachidonsäure 1,5 mmol (=ARA), Kollagen 10  $\mu$ g/ml (=Koll), ADP 15  $\mu$ M) zeigte sich im Vergleich zwischen einer stattgefundenen und nicht stattgefundenen Präinkubation mit Bay1125976 (Konzentration 10  $\mu$ M) bei allen Agonisten eine deutliche verminderte Expression der pAKT-Bande nach Hemmung der AKT-Kinase. Nach Aktivierung durch die Agonisten Arachidonsäure und Kollagen war ebenfalls eine stärkere Expression der pAKT-Bande verglichen mit der Pufferkontrolle zu erkennen. n=6

Es zeigte sich im Westernblot eine deutliche Verringerung oder ein Fehlen der AKT-Phosphorylierung an Ser473 in Blutplättchen mit Vorbehandlung des Inhibitors Bay1125976 nach Zugabe der jeweiligen Agonisten (TRAP-6, Arachidonsäure, Kollagen und ADP) verglichen mit den unbehandelten Proben. Damit ließ sich auch im Westernblot demonstrieren, dass nach der Vorbehandlung mit 10  $\mu$ M BAY1125976 eine Signaltransduktion unterdrückt wird. Die Proteinmenge der AKT blieb nahezu durchgehend gleich exprimiert und stellte hierbei die Baseline dar. Dies bestätigte die verminderte Phosphorylierung der AKT-Kinase nach Inkubation mit dem AKT-Inhibitor auch auf molekularer Ebene. Im Vergleich zur Negativkontrolle mit PBS war nach Inkubation mit Arachidonsäure und Kollagen eine Zunahme der pAKT-Bande auszumachen (siehe Abb.31), was die steigende Phosphorylierung nach Aktivierung mit diesen Agonisten demonstrierte. Diese Beobachtung war auch in den durchflusszytometrischen Messungen der phosphorylierten Form der AKT-Kinase nach Stimulation mit den Agonisten zu erkennen. Dagegen ließ sich nach Inkubation mit den Agonisten TRAP-6 und ADP keine so deutliche Zunahme der pAKT-Bande ausmachen. Diese Agonisten zeigten in den FACS-Messungen zwar eine signifikante Zunahme der pAKT-Expression im Vergleich zu Puffer, jedoch waren die Mittelwerte der prozentualen

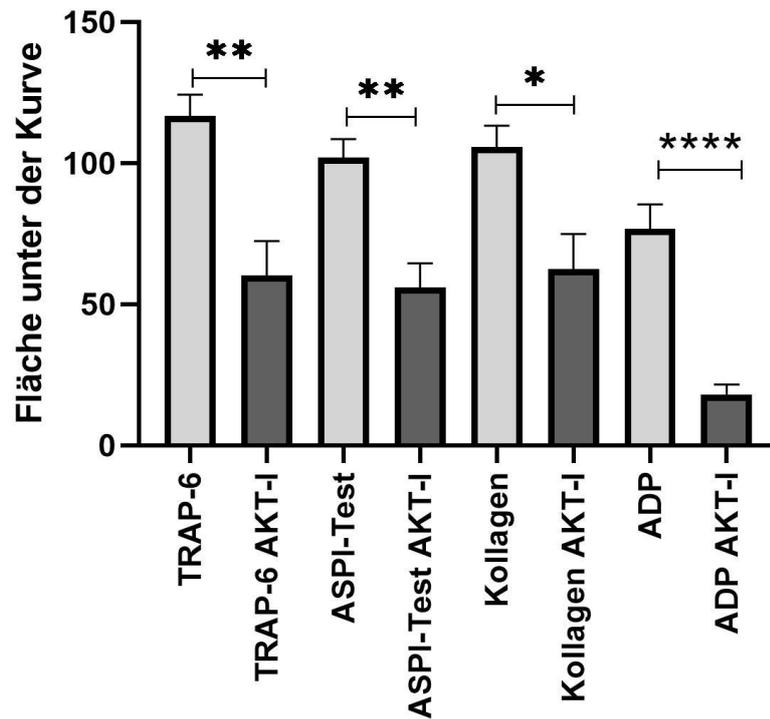
Anteile der pAKT-Expression bei diesen Agonisten auch in den durchflusszytometrischen Messungen geringer als die der Agonisten Arachidonsäure und Kollagen (siehe Abb.25).

### **3.2.2 Vollblutaggregometrie**

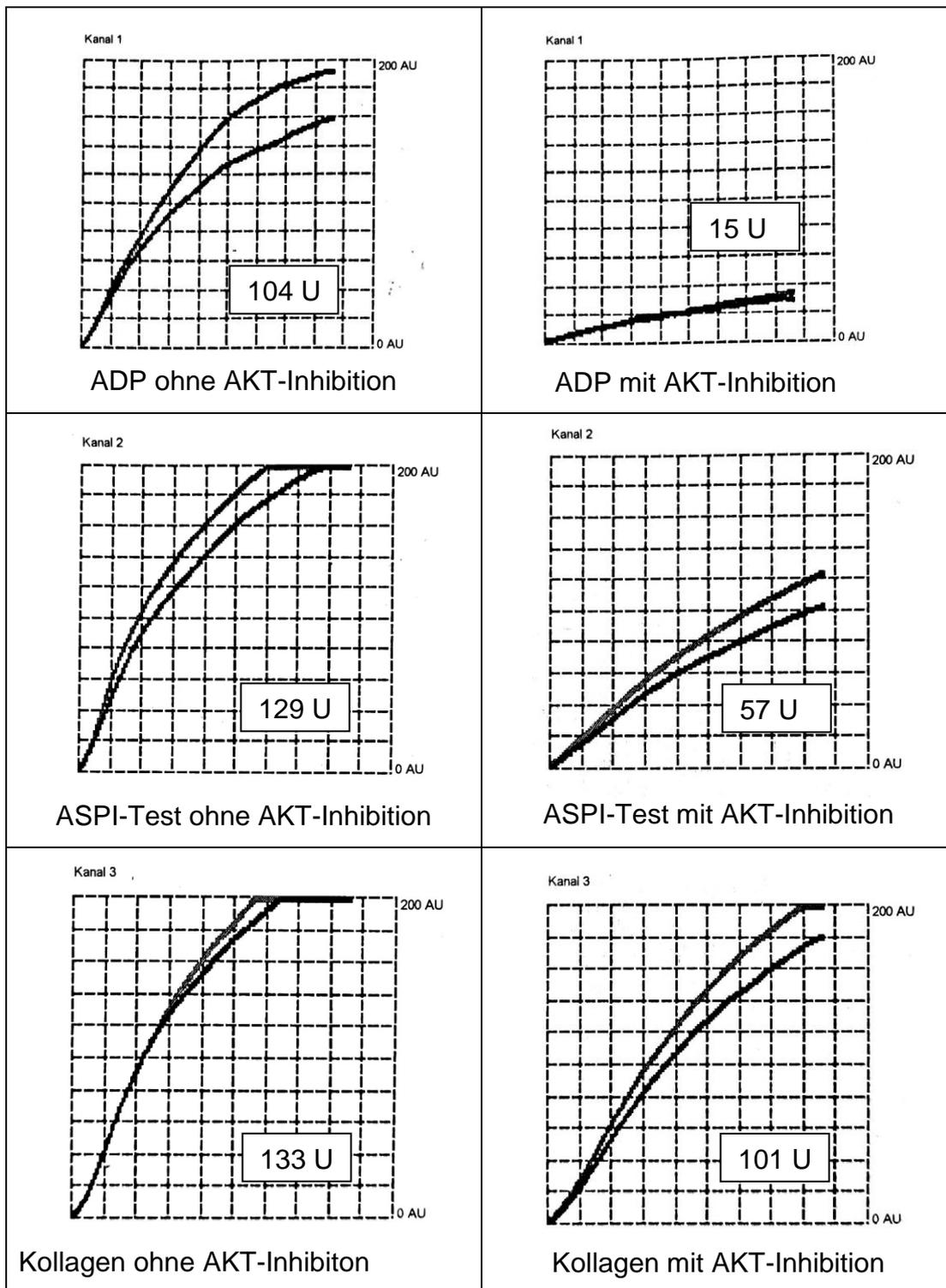
Als weitere Referenz für die Einordnung der pAKT-Messergebnisse wurden bei der Vollblutaggregometrie mit dem Multiplate®-Analyser mögliche Unterschiede im Aggregationsverhalten nach Aktivierung durch verschiedene Agonisten mit und ohne Inhibition der AKT-Kinase an elf Spendern analysiert (Tab. 19, Abb. 32).

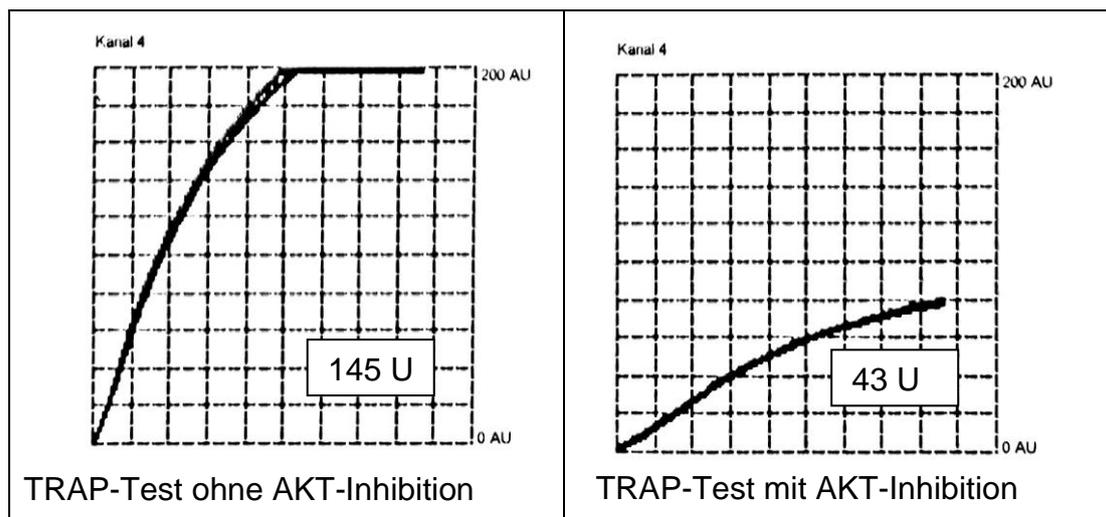
Abbildung 33 stellt anhand eines Beispiels die Ergebnisse der Multiplate®-Analyser-Messungen in Form der originalen Graphen dar. Der ASPI-Test entspricht dabei der Aktivierung mit Arachidonsäure. Zu erkennen war bei allen Agonisten ein deutlich flacherer Kurvenverlauf unter Inhibition der AKT-Kinase, was zu einer Abnahme der Fläche unter der Kurve führte, hier jeweils im rechten unteren Feld in U angegeben.

Mit Bay1125976 vorinkubiertes Vollblut zeigte im Multiplate®-Analyser nach der Inkubation mit allen Agonisten jeweils eine signifikant geringere Aggregation als nicht inhibiertes Vollblut, gemessen an der Fläche unter der Kurve (TRAP-6:  $60,27 \pm 12,13$  vs.  $116,7 \pm 7,58$ , p-Wert=0,0038; Arachidonsäure:  $55,91 \pm 8,70$  vs.  $102,1 \pm 6,49$ , p-Wert=0,0028; Kollagen:  $62,55 \pm 12,43$  vs.  $105,8 \pm 7,48$ , p-Wert=0,0129 ADP:  $18,09 \pm 3,46$  vs.  $76,73 \pm 8,72$ , p<0,0001). Angewandt wurde unter Annahme einer Normalverteilung der parametrische, gepaarte t-Test.



**Abbildung 32: Darstellung Vergleich der Aggregation mit und ohne vorherige AKT-Inhibition durch Bay1125976, gemessen in der Fläche unter der Kurve nach der Aktivierung von Vollblut sechs verschiedener Spender durch die Agonisten TRAP-6, Kollagen, ADP sowie Arachidonsäure (ASPI-Test):** Bei allen Agonisten ließ sich eine signifikante Abnahme der Fläche unter der Kurve nach AKT-Inhibition ausmachen. (Fläche unter der Kurve Mean±SEM: TRAP-6: 60,27±12,13 vs. 116,7±7,58, p-Wert=0,0038; Arachidonsäure: 55,91±8,70 vs. 102,1±6,49, p-Wert=0,0028; Kollagen: 62,55±12,43 vs. 105,8±7,48, p-Wert=0,0129 ADP: 18,09±3,46 vs. 76,73±8,72, p<0,0001, Signifikanzniveaus: \* = p≤0,05, \*\* = p≤0,01, \*\*\* = p≤0,001, \*\*\*\* = p≤ 0,0001). Abkürzungen: SEM= Standardfehler des Mittelwertes (engl. „standard error of the mean“).





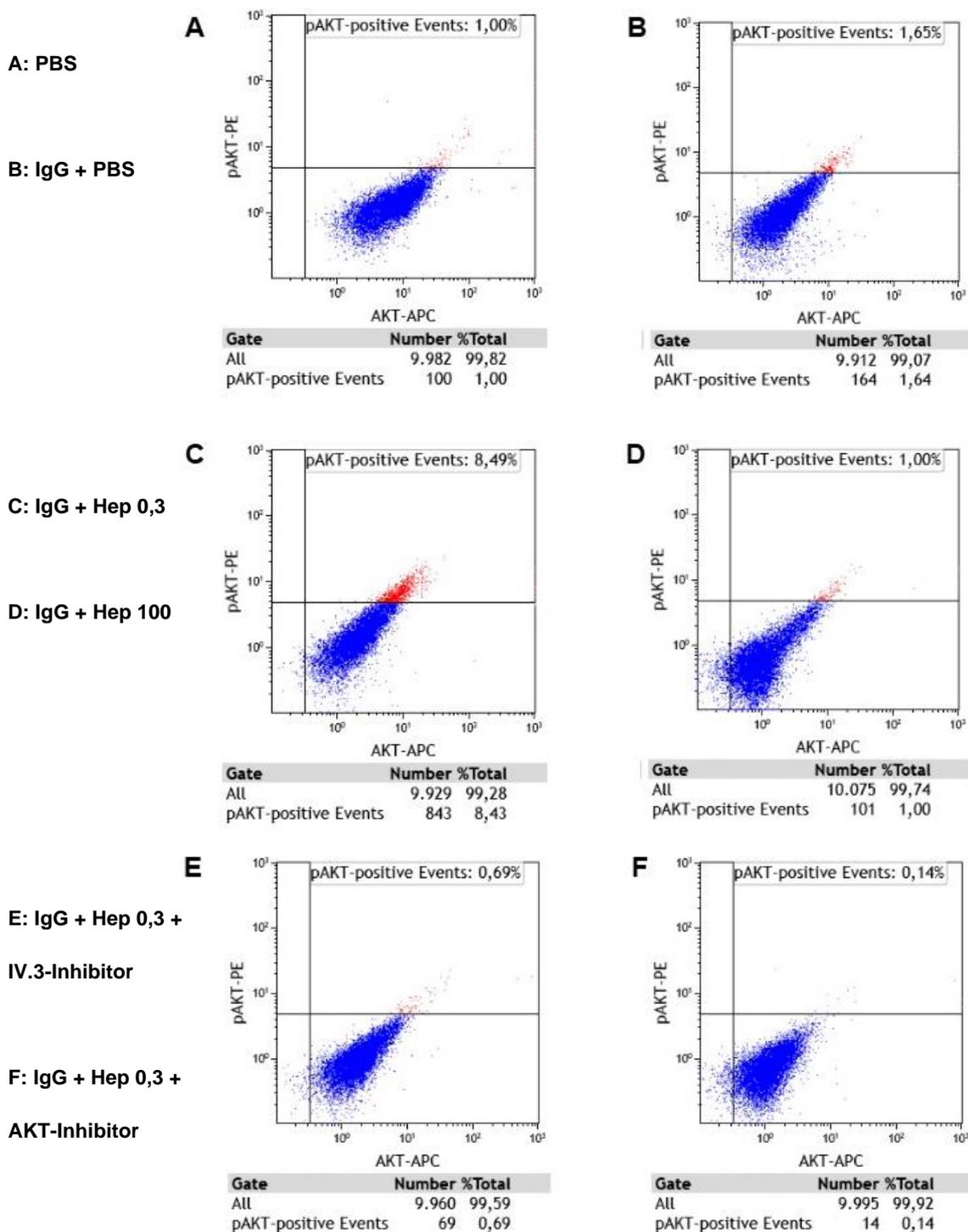
**Abbildung 33: Multiplate-Messungen eines Spenders unter Zugabe verschiedener Agonisten, jeweils im Vergleich mit und ohne AKT-Inhibition:** Es zeigten sich jeweils eine deutliche Abnahme der Fläche unter der Kurve, hier angegeben in U, nach Inhibition mit AKT-Inhibitor

**Tabelle 19: Werte der Vollblutaggregometrie:** Aggregation gemessen in der Fläche unter der Kurve nach Aktivierung von Vollblut sechs verschiedener Spender durch die Agonisten, TRAP-6, ASPI-Test Kollagen oder ADP, jeweils im Vergleich mit und ohne AKT-Inhibition mittels Bay1125976

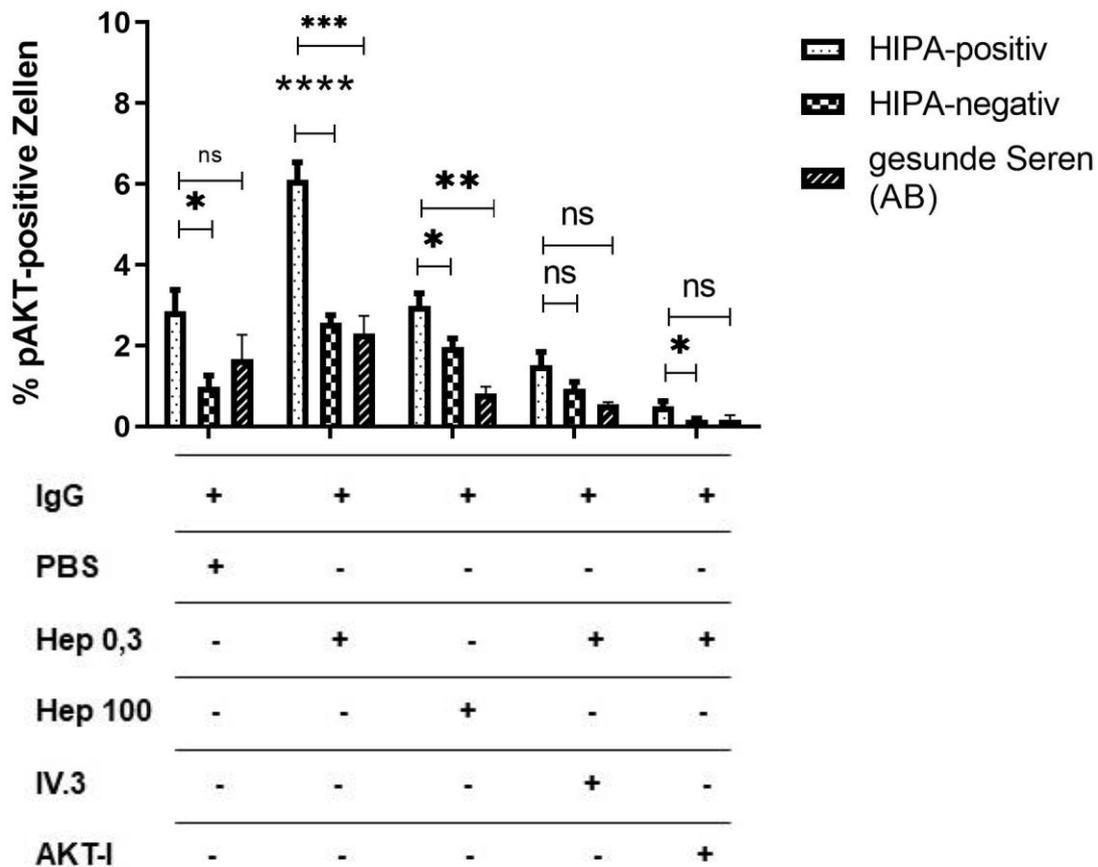
TRAP-6	TRAP-6 AKT-I	ARA	ARA AKT-I	Kollagen	Kollagen AKT-I	ADP	ADP AKT-I
145	43	129	57	133	101	104	15
86	24	82	34	68	30	41	15
80	61	75	65	87	60	71	16
103	95	82	82	77	89	63	9
122	142	111	107	124	139	84	41
103	118	84	97	94	114	62	11
163	36	143	41	135	29	125	29
109	25	102	22	120	22	90	9
107	27	94	26	85	35	28	9
133	47	117	50	135	26	107	10
133	45	104	34	106	43	69	35

### **3.3 Klinische Anwendung des pAKT/AKT-Protokolls: Messung der pAKT- und CD62P-Expression nach Inkubation von Spender-PRP mit HIT-IgG**

Neben der Aktivierung von Thrombozyten im Rahmen ihrer physiologischen Thrombozytenfunktion kann die Visualisierung verschiedener Phosphorylierungsprozesse auch bei der überschießenden Hämostase und so bei verschiedenen prothrombotischen Ereignissen bedeutsam sein. Daher wurde für die Einordnung der neuen Methode in den klinischen Kontext die pAKT-Expression nach Inkubation von PRP bei der HIT untersucht. Hierfür wurden in folgenden Untersuchungen mit isolierten IgG aus Seren von Patienten mit klinisch relevanter HIT, HIT-Verdacht und IgG aus Seren von gesunden Spendern durchgeführt. Dabei wurde der prozentuale Anteil der pAKT-exprimierenden Zellen zwischen mit HIPA-positiven HIT-IgG, HIPA-negativen HIT-IgG und als Negativkontrolle IgG aus gesunden Seren (AB-IgG) verglichen, jeweils unter Inkubation mit Puffer, mit gering konzentriertem Heparin (Hep 0,3) und mit hoch konzentriertem Heparin (Hep 100). Außerdem wurden die Werte verglichen nach Inhibition des Fc $\gamma$ -Rezeptors unter der Inkubation mit gering konzentriertem Heparin (Hep 0,3) sowie nach der Inhibition der AKT-Kinase unter Inkubation mit Heparin 0,3 (Tab. 20, Abb. 34 und 35). Für die Analysen wurde jeweils auf Grundlage der Annahme normalverteilter Daten der ungepaarte, parametrische t-Test angewandt.



**Abbildung 34: Durchflusszytometrische Darstellung des Anteils der pAKT-exprimierenden Zellen nach Inkubation mit positiven HIT-IgG.** A: Negativkontrolle (PBS) B: Pufferkontrolle (IgG + PBS) C: gering konzentriertes Heparin (Hep 0,3) + IgG D: hoch konzentriertes Heparin (Hep 100) + IgG E: IgG + Hep 0,3 + IV.3-Inhibitor F: IgG + Hep 0,3 + AKT-I; es ließ sich eine klare Zunahme der pAKT-positiven Events nach Inkubation mit gering konzentriertem Heparin im Vergleich zur Negativ- und Pufferkontrolle erkennen. Unter Inkubation mit hoch konzentriertem Heparin kam es im Vergleich zu gering konzentriertem Heparin zu einer Suppression der pAKT-Expression auf das Ausgangsniveau. Sowohl unter IV.3-Inhibitor (E) als auch unter AKT-Inhibitor (F) nahm der Anteil der pAKT-positiven Zellen ebenfalls ab.



**Abbildung 35: Darstellung der prozentualen Anteile der pAKT-exprimierenden Thrombozyten nach Inkubation mit den jeweiligen IgG unter verschiedenen Bedingungen (Puffer, Hep 0,3, Hep 100, IV3-Inhibition + Hep 0,3, AKT-Inhibition + Hep 0,3), Vergleich zwischen der pAKT-Expression nach Inkubation mit HIPA-positiven (n=12), HIPA-negativen (n=8) IgG und gesunden Seren (AB-IgG) (n=4):** Zwischen den HIPA-positiven und HIPA-negativen IgG zeigten sich unter den verschiedenen Bedingungen bis auf die Inkubation mit IV.3-Inhibitor signifikante Unterschiede in der pAKT-Expression, am deutlichsten zu sehen bei Hep 0,3. Unter Heparin 0,3 U/ml war auch ein klarer Unterschied zwischen den HIPA-positiven und AB-IgG zu erkennen, welcher schwächer ausgeprägt auch unter Heparin 100 U/ml existierte. (% pAKT-positive Zellen Mean  $\pm$  SEM: PBS: HIPA-positiv vs. HIPA-negativ:  $2,85 \pm 0,54$  vs.  $0,98 \pm 0,29$ , p-Wert=0,0157; HIPA-positiv vs. AB:  $2,84 \pm 0,54$  vs.  $1,66 \pm 0,61$ , p-Wert=0,2586; Hep 0,3: HIPA-positiv vs. HIPA-negativ:  $6,10 \pm 0,43$  vs.  $2,56 \pm 0,19$  p-Wert<0,0001; HIPA-positiv vs. AB:  $6,10 \pm 0,43$  vs.  $2,29 \pm 0,44$ , p-Wert=0,0003; Hep 100: HIPA-positiv vs. HIPA-negativ:  $2,99 \pm 0,31$  vs.  $1,96 \pm 0,22$ , p-Wert=0,0246), HIPA-positiv vs. AB:  $2,99 \pm 0,31$  vs.  $0,82 \pm 0,17$ , p-Wert=0,0015; IV.3-Inhibitor+Hep 0,3: HIPA-positiv vs. HIPA-negativ:  $1,52 \pm 0,33$  vs.  $0,93 \pm 0,18$ , p-Wert=0,1894, HIPA-positiv vs. AB:  $1,52 \pm 0,33$  vs.  $0,55 \pm 0,05$ , p-Wert=0,1210; AKT-Inhibitor+Hep 0,3: HIPA-positiv vs. HIPA-negativ:  $0,17 \pm 0,03$  vs.  $0,51 \pm 0,13$ , p-Wert=0,0441; HIPA-positiv vs. AB:  $0,51 \pm 0,13$  vs.  $0,16 \pm 0,12$ , p-Wert=0,3001; Signifikanzniveaus: \* = p $\leq$ 0,05, \*\* = p $\leq$ 0,01, \*\*\* = p $\leq$ 0,001, \*\*\*\* = p $\leq$  0,0001. Abkürzungen: ns= nicht signifikant (p $\geq$ 0,05), SEM= Standardfehler des Mittelwertes (engl. „standard error of the mean“).

**Tabelle 20: Prozentualer Anteil der pAKT-exprimierenden Thrombozyten nach Inkubation mit HIPA-positiven (12 Patienten), HIPA-negativen (n=8) IgG und gesunden Seren (AB-IgG) (n=4) unter verschiedenen Bedingungen (Puffer, Hep 0,3, Hep 100, IV3-Inhibition + Hep 0,3, AKT-Inhibition+Hep 0,3)**

Puffer			Hep 0,3			Hep 100			IV.3 + Hep 0,3			Akt-I + Hep 0,3		
HIPA-pos.	HIPA-neg.	AB	HIPA-pos.	HIPA-neg.	AB	HIPA-pos.	HIPA-neg.	AB	HIPA-pos.	HIPA-neg.	AB	HIPA-pos.	HIPA-neg.	AB
0,52	0,55	1,55	5,28	2,5	3,32	1,98	2,13	0,45	0,99	0,42	0,65	0,5	0,31	0,28
1,94	0,36	3,41	4,55	2,24	2,68	2,43	1,73	1,12	1,66	0,8	0,59	0,4	0,12	0,04
3,93	0,31	0,95	6,3	2,28	1,85	3,9	2,25	1,09	3,00	2,08	0,40	0,41	0,10	
2,12	0,39	0,74	5,68	2,08	1,32	3,5	0,72	0,63	3,19	1,03	0,55	1,37	0,26	
3,69	1,69		4,48	2,54		3,56	1,58		3,56	0,97		0,61	0,25	
0,77	0,63		5,02	2,12		2,25	2,68		0,69	0,84		0,10	0,1	
2,34	2,43		6,88	3,46		2,92	1,98		1,92	0,49		1,07	0,07	
2,62	1,48		5,85	3,29		2,55	2,61		0,33	0,77		0,03	0,12	
1,65			8,49			1,00			0,69			0,14		
6,61			8,07			3,38			0,50			0,15		
2,17			8,25			5,17			0,61			1,04		
5,78			4,37			3,23			1,07			0,27		

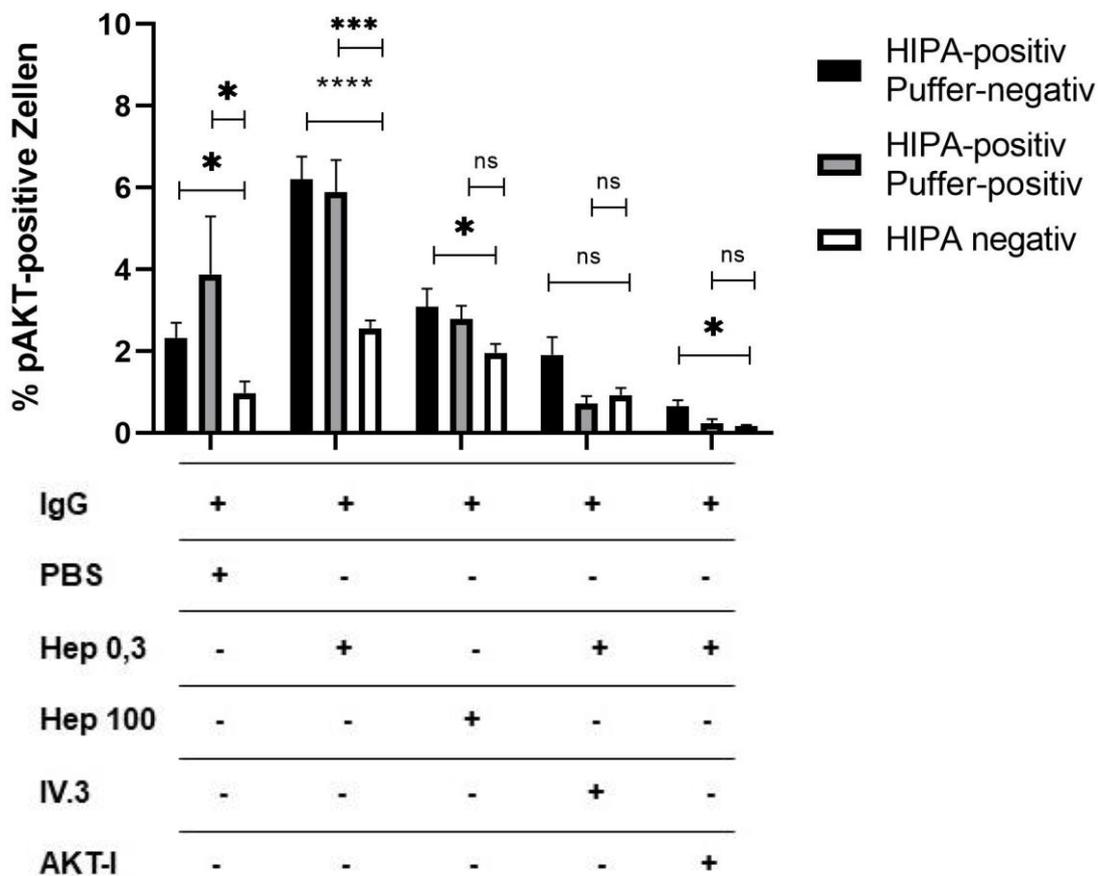
Bei der Negativkontrolle mit PBS ließ sich zwischen den HIPA-positiven und HIPA-negativen IgG ein signifikanter Unterschied in der pAKT-Expression ausmachen ( $2,85 \pm 0,54$  vs.  $0,98 \pm 0,28$ , p-Wert=0,0157). Zwischen den HIPA-positiven IgG und den AB-IgG zeigte sich kein signifikanter Unterschied ( $2,85 \pm 0,54$  vs.  $1,66 \pm 0,61$ , p-Wert=0,2586). Unter Inkubation mit Heparin der Konzentration 0,3U/ml und HIPA-positiven IgG ergab sich mit über 6 % der größte Anteil pAKT-exprimierender Zellen. Dieser war sowohl signifikant größer im Vergleich zu Heparin 0,3U/ml und HIPA-negativen IgG ( $6,10 \pm 0,43$  vs.  $2,56 \pm 0,19$ , p-Wert<0,0001) als auch im Vergleich zu der AB-Kontrolle ( $6,10 \pm 0,43$  vs.  $2,29 \pm 0,44$ , p-Wert=0,0003). Die Inkubation mit hoch konzentriertem Heparin führte zu einer

vergleichsweise Suppression der pAKT-Expression, wobei sich auch hier der prozentuale Anteil an pAKT-positiven Thrombozyten signifikant zwischen dem Ansatz mit HIPA-positiven IgG und HIPA-negativen IgG ( $2,99 \pm 0,31$  vs.  $1,96 \pm 0,22$ ,  $p\text{-Wert}=0,0246$ ) sowie AB-IgG ( $2,99 \pm 0,31$  vs.  $0,82 \pm 0,17$ ,  $p\text{-Wert}=0,0015$ ) unterschied. Eine Präinkubation der Thrombozyten mit dem IV.3-Antikörper führte zu einer sichtbaren Hemmung der pAKT-Expression unter Zugabe der verschiedenen IgG. Dabei stellte sich kein signifikanter Unterschied zwischen HIPA-positiven, HIPA-negativen und AB-IgG heraus (HIPA-positiv vs. HIPA-negativ:  $1,52 \pm 0,33$  vs.  $0,93 \pm 0,18$ ,  $p\text{-Wert}=0,1894$ ; HIPA-positiv vs. AB:  $1,52 \pm 0,33$  vs.  $0,55 \pm 0,053$ ,  $p\text{-Wert}=0,1210$ ). Die Inhibition der Thrombozyten mit dem AKT-Inhibitor Bay1125976 erzielte den geringsten Anteil an pAKT-exprimierenden Zellen und damit eine deutliche Hemmung. Obwohl die prozentualen Anteile der pAKT-positiven Zellen bei allen IgG unter 1 % lagen, kam es bei den HIPA-negativen IgG nochmals zu einer signifikant geringeren pAKT-Expression als im Vergleich zu den HIPA-positiven IgG ( $0,16 \pm 0,03$  vs.  $0,51 \pm 0,13$ ,  $p\text{-Wert}=0,0441$ ), ein Unterschied, der sich zwischen den HIPA-positiven IgG und der AB-Kontrolle nicht herausstellte ( $0,51 \pm 0,13$  vs.  $0,16 \pm 0,12$ ,  $p\text{-Wert}=0,3001$ ).

Seren von manchen Patienten zeigten im HIPA eine gewisse Autoreaktivität, das heißt sie führten auch in Abwesenheit von Heparin und in Anwesenheit von Puffer zu einer deutlichen Thrombozytenaktivierung. Die HIPA-positiven IgG lassen sich anhand ihrer Fähigkeit, eine Pufferreaktion im HIPA-Test auszulösen, in zwei Unterkategorien unterteilen: HIPA-positive Puffer-positiv sowie HIPA-positive Puffer-negativ Seren. Abbildung 36 demonstriert die gleichen Messungen wie Abbildung 35, wobei die in Abbildung 35 dargestellte HIPA-positive Kohorte in HIPA-positive Puffer-positiv und HIPA-positive Puffer-negativ IgG aufgesplittet wurde (Werte siehe Tab. 21).

**Tabelle 21: Prozentualer Anteil der pAKT-exprimierenden Zellen nach Inkubation mit HIPA-positiven Puffer-positiven, HIPA-positiven Puffer-negativen und HIPA-negativen IgG unter verschiedenen Bedingungen (Puffer, Hep 0,3, Hep 100, IV3-Inhibitor + Hep 0,3, AKT-Inhibitor + Hep 0,3)**

Puffer			Hep 0,3			Hep 100			IV.3 + Hep 0,3			Akt-I + Hep 0,3		
HIPA-pos. Puffer-pos.	HIPA-pos. Puffer-neg.	HIPA-neg.												
2,62	0,77	0,55	5,85	4,55	2,50	2,55	2,43	2,13	0,33	1,66	0,42	0,03	0,40	0,31
6,61	3,93	0,36	8,07	6,30	2,24	3,38	3,9	1,73	0,50	3,00	0,8	0,15	0,41	0,12
5,78	2,12	0,31	4,37	5,68	2,28	3,23	3,5	2,25	1,07	3,19	2,08	0,27	1,37	0,10
0,52	3,69	0,39	5,28	4,48	2,08	1,98	3,56	0,72	0,99	3,56	1,03	0,50	0,61	0,26
	0,77	1,69		5,02	2,54		2,25	1,58		0,69	0,97		0,10	0,25
	2,34	0,63		6,88	2,12		2,92	2,68		1,92	0,84		1,07	0,10
	1,65	2,43		8,49	3,46		1,00	1,98		0,69	0,49		0,14	0,07
	2,17	1,48		8,25	3,29		5,17	2,61		0,61	0,77		1,04	0,12

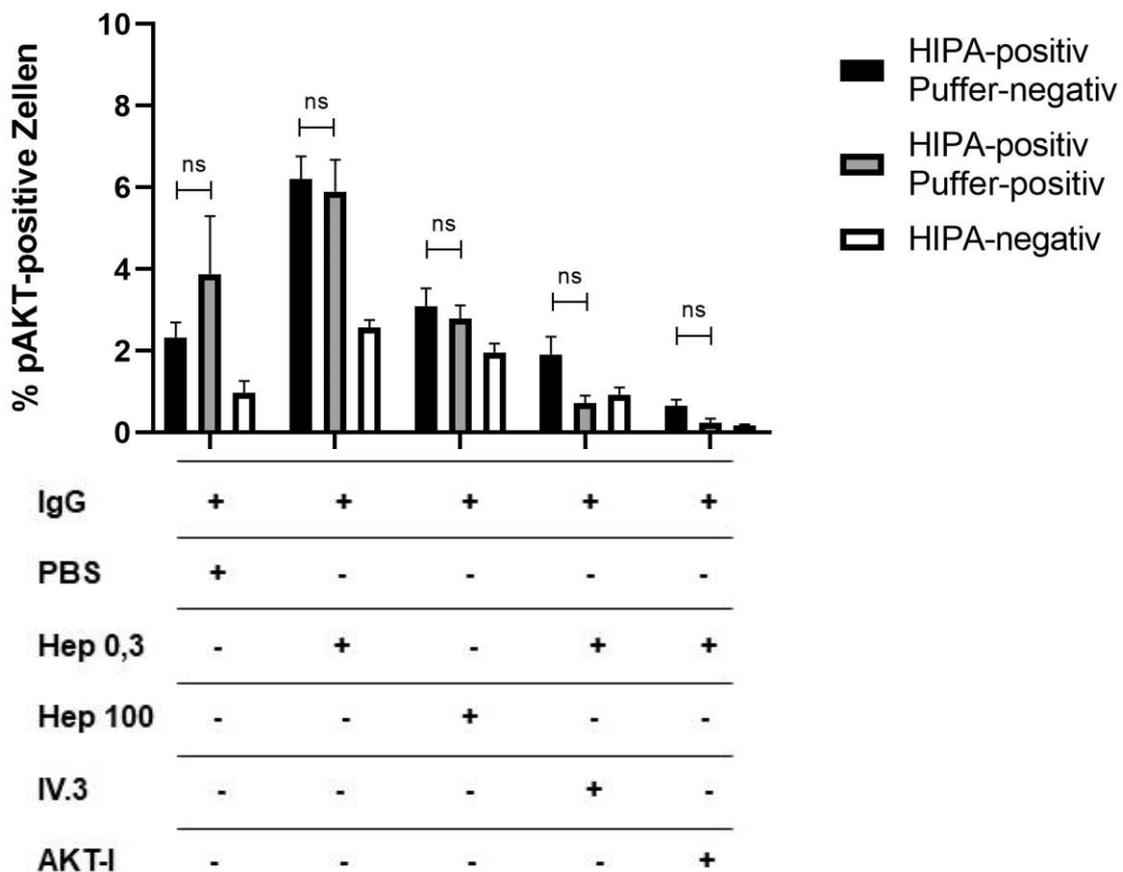


**Abbildung 36: Darstellung des prozentualen Anteils der pAKT-exprimierenden Zellen nach Inkubation mit HIPA-positiven Puffer-positiven, HIPA-positiven Puffer-negativen und HIPA-negativen IgG unter verschiedenen Bedingungen (Puffer, Hep 0,3, Hep 100, IV3-Inhibitor+Hep 0,3, AKT-Inhibitor+Hep 0,3), Vergleich zwischen HIPA-positiven Puffer-negativen IgG bzw. HIPA-positiven Puffer-positiven IgG und HIPA-negativen IgG:** Zwischen den HIPA-positiven Puffer-negativen und HIPA-negativen IgG fanden sich signifikante Unterschiede in der pAKT-Expression unter Inkubation mit PBS, gering konzentriertem Heparin (Hep 0,3), hoch konzentriertem Heparin (Hep 100) sowie der AKT-Inhibition + Hep 0,3, wobei die Unterschiede am deutlichsten unter Hep 0,3 ausgeprägt waren. Zwischen HIPA-positiven Puffer-positiven und HIPA-negativen IgG fanden sich lediglich bei PBS und Hep 0,3 signifikante Differenzen in der pAKT-Expression, wobei auch hier der größere Unterschied bei Hep 0,3 zu sehen waren. (% der pAKT-positiven Zellen Mean±SEM; PBS: HIPA-positiv Puffer positiv vs. HIPA-negativ: 3,88±1,41 vs. 0,98±0,28, p-Wert=0,0182; HIPA-positiv Puffer-negativ vs. HIPA-negativ: 2,18±0,41 vs. 0,98±0,28, p-Wert=0,0307; Hep 0,3: HIPA-positiv Puffer-positiv vs. HIPA-negativ: 5,89±0,79 vs. 2,56±0,19, p-Wert=0,0002; HIPA-positiv Puffer-negativ vs. HIPA-negativ: 6,21±0,56 vs. 2,56±0,19, p-Wert<0,0001; Hep 100: HIPA-positiv Puffer-positiv vs. HIPA-negativ: 2,79±0,32 vs. 1,96±0,22, p-Wert=0,0602; HIPA-positiv Puffer-negativ vs. HIPA-negativ: 3,09±0,44 vs. 1,96±0,22, p-Wert=0,0383; IV.3-Inhibitor+Hep 0,3: HIPA-positiv Puffer-positiv vs. HIPA-negativ: 0,72±0,18 vs. 0,93±0,18, p-Wert=0,5001; HIPA-positiv Puffer-negativ vs. HIPA-negativ: 1,92±0,43 vs. 0,93±0,18, p-Wert=0,0516; AKT-Inhibitor+Hep 0,3: HIPA-positiv Puffer-positiv vs. HIPA-negativ: 0,24±0,10 vs. 0,17±0,03, p-Wert=0,4005; HIPA-positiv Puffer-negativ vs. HIPA-negativ: 0,64±0,17 vs. 0,17±0,03, p-Wert=0,0135, Signifikanzniveaus: \* = p≤0,05, \*\* = p≤0,01, \*\*\* = p≤0,001, \*\*\*\* = p≤0,0001. Abkürzungen: ns= nicht signifikant (p≥0,05), SEM= Standardfehler des Mittelwertes (engl. „standard error of the mean“).

Die Visualisierung der Phosphorylierung stimmt mit den Ergebnissen der HIPA-Testungen überein. Sowohl die HIPA-positiven Puffer-positiven als auch die HIPA-positiven Puffer-negativen IgG zeigten in der Pufferkontrolle einen signifikant höheren Anteil der pAKT-positiven Zellen im Vergleich zu den HIPA-negativen IgG (HIPA-positiv Puffer-positiv vs. HIPA-negativ:  $3,88 \pm 1,41$  vs.  $0,98 \pm 0,28$ , p-Wert=0,0182; HIPA-positiv Puffer-negativ vs. HIPA-negativ:  $2,18 \pm 0,41$  vs.  $0,98 \pm 0,28$ , p-Wert=0,0307). Nach der Inkubation mit gering konzentriertem Heparin wiesen HIPA-positive Puffer-positive sowie HIPA-positive Puffer-negative IgG eine signifikante Erhöhung des Anteils der pAKT-exprimierenden Thrombozyten im Vergleich zu den HIPA-negativen IgG auf mit  $5,89 \pm 0,79$  vs.  $2,56 \pm 0,19$ , p-Wert=0,0002 (HIPA-positiv Puffer-positiv vs. HIPA-negativ) bzw.  $6,21 \pm 0,56$ , p-Wert<0,0001 (HIPA-positiv Puffer-negativ vs. HIPA-negativ).

Bei der Inkubation mit hoch konzentriertem Heparin kam es in allen Fällen zu einer Abnahme des Anteils der pAKT-positiven Events. Zwischen den HIPA-positiven Puffer-negativen und den HIPA-negativen IgG fand sich ein gering signifikanter Unterschied ( $3,09 \pm 0,44$  vs.  $1,96 \pm 0,22$ , p-Wert=0,0383), zwischen den HIPA-positiven Puffer-positiven und HIPA-negativen IgG war dieser nicht signifikant ( $2,79 \pm 0,32$  vs.  $1,96 \pm 0,22$ , p-Wert=0,0602). Unter Inhibition des Fcγ-Rezeptors durch den Anti-Human CD32-Antikörper Clone IV.3 exprimierten noch weniger Zellen nach Inkubation mit den HIPA-positiven bzw. HIPA-negativen IgG pAKT. Dabei waren die Unterschiede weder zwischen HIPA-positiven Puffer-positiven und HIPA-negativen IgG ( $0,72 \pm 0,18$  vs.  $0,93 \pm 0,18$ , p-Wert=0,5001) noch zwischen HIPA-positiven Puffer-negativen und HIPA-negativen IgG ( $1,92 \pm 0,43$  vs.  $0,93 \pm 0,18$ , p-Wert=0,0516) signifikant.

Die geringsten prozentualen Anteile an Zellen mit phosphoryliertem AKT wurden durch Vorinkubation der Thrombozyten mit dem AKT-Inhibitor Bay1125976 erzielt. Sie lagen bei allen Ansätzen unter einem Prozent. Während zwischen HIPA-positiven Puffer-positiven und HIPA-negativen IgG kein signifikant unterschiedlicher Effekt beobachtet werden konnte ( $0,23 \pm 0,10$  vs.  $0,17 \pm 0,03$ , p-Wert=0,4005), war dieser zwischen den HIPA-positiven Puffer-negativen und den HIPA-negativen IgG zu finden ( $0,64 \pm 0,17$  vs.  $0,17 \pm 0,03$ , p-Wert=0,0135).



**Abbildung 37:** Darstellung des prozentualen Anteils der pAKT-exprimierenden Zellen nach Inkubation mit HIPA-positiven Puffer-positiven, HIPA-positiven Puffer-negativen und HIPA-negativen IgG unter verschiedenen Bedingungen (Puffer, Hep 0,3, Hep 100, IV3-Inhibitor + Hep 0,3, AKT-Inhibitor + Hep 0,3), Vergleich zwischen HIPA-positiven Puffer-negativen IgG und HIPA-positiven Puffer-positiven IgG: Zwischen den HIPA-positiven Puffer-positiven und HIPA-positiven Puffer-negativen IgG waren keine signifikanten Unterschiede auszumachen (% der pAKT-positiven Zellen Mean±SEM; PBS: HIPA-positiv Puffer positiv vs. HIPA-positiv Puffer-positiv:  $3,88 \pm 1,41$  vs.  $0,218 \pm 0,41$ , p-Wert=0,1601; Hep 0,3: HIPA-positiv Puffer-positiv vs. HIPA-positiv Puffer-negativ:  $5,89 \pm 0,79$  vs.  $6,21 \pm 0,56$ , p-Wert=0,7511; Hep 100: HIPA-positiv Puffer-positiv vs. HIPA-positiv Puffer-negativ:  $2,78 \pm 0,32$  vs.  $3,09 \pm 0,44$ , p-Wert=0,6599; IV.3-Inhibitor + Hep 0,3: HIPA-positiv Puffer-positiv vs. HIPA-positiv Puffer-negativ:  $0,72 \pm 0,18$  vs.  $1,92 \pm 0,43$ , p-Wert=0,0888; AKT-Inhibitor + Hep 0,3: HIPA-positiv Puffer-positiv vs. HIPA-positiv Puffer-negativ:  $0,24 \pm 0,10$  vs.  $0,64 \pm 0,17$ , p-Wert=0,1347. Abkürzungen: ns= nicht signifikant ( $p \geq 0,05$ ), SEM= Standardfehler des Mittelwertes (engl. „standard error of the mean“).

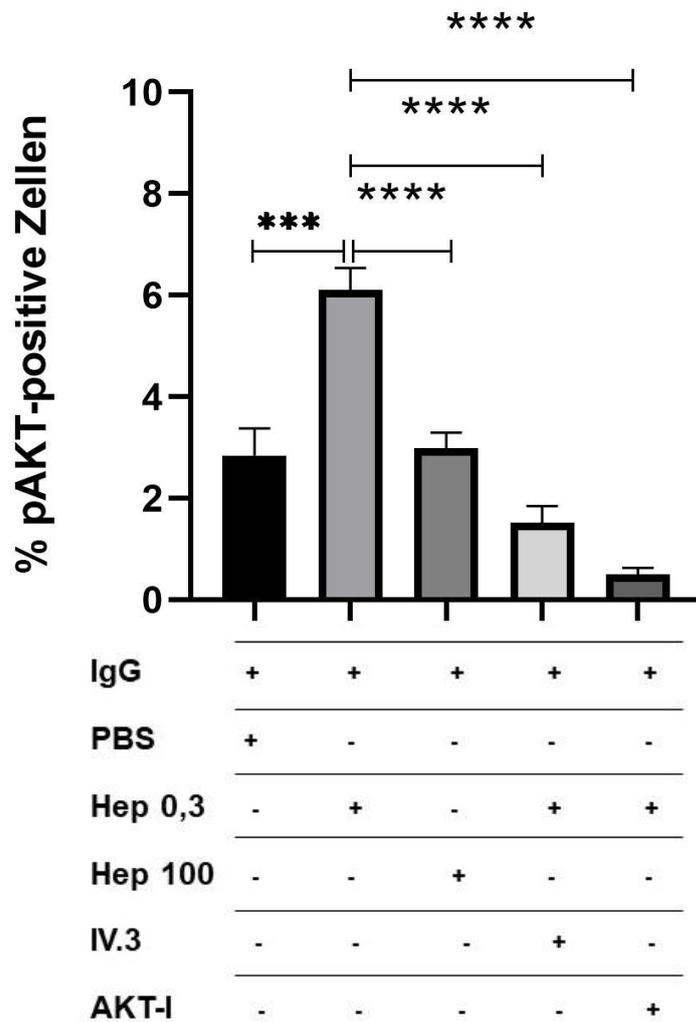
Zwischen den HIPA-positiven Puffer-positiven und HIPA-positiven Puffer-negativen IgG zeigte sich unter den jeweiligen Bedingungen kein signifikanter Unterschied, wie in Abbildung 37 demonstriert (HIPA-positiv Puffer-positiv vs. HIPA-positiv Puffer-negativ; PBS:  $3,88 \pm 1,41$  vs.  $2,18 \pm 0,41$ , p-Wert=0,1601; Hep 0,3:  $5,90 \pm 0,79$  vs.  $6,21 \pm 0,56$ , p-Wert=0,7511; Hep 100:  $2,79 \pm 0,32$  vs.  $3,09 \pm 0,44$ , p-

Wert=0,6599; IV.3:  $0,72 \pm 0,18$  vs.  $1,92 \pm 0,43$ , p-Wert=0,0888; AKT-I:  $0,24 \pm 0,10$  vs.  $0,64 \pm 0,17$ , p-Wert=0,1347). Das deutet darauf hin, dass zwischen den auto-reaktiven Seren und den nicht autoreaktiven Seren in diesem Test nicht unterschieden werden kann.

Betrachtet man nur die HIPA-positiven Antikörper (siehe Tab. 22, Abb. 38), lässt sich hier noch einmal deutlich erkennen, dass der mit Abstand stärkste Effekt der HIPA-positiven IgG durch Inkubation mit Heparin 0,3 U/ml erzielt wurde. Dieser war signifikant höher als die Pufferkontrolle ( $6,102 \pm 0,435$  vs.  $2,85 \pm 0,54$ , p-Wert=0,0005). Mit hoch konzentriertem Heparin war im Vergleich zu gering konzentriertem Heparin eine signifikante Hemmung auszumachen ( $2,99 \pm 0,31$  vs.  $6,10 \pm 0,43$ , p-Wert<0,0001). Eine klare Inhibition wurde außerdem durch die Präinkubation mit dem IV.3-Antikörper erzielt ( $1,52 \pm 0,33$  vs.  $6,10 \pm 0,43$ , p-Wert<0,0001) und war am deutlichsten nach der vorherigen Hemmung der AKT-Kinase mit Bay1125976 zu erkennen ( $0,51 \pm 0,13$ , p-Wert<0,0001). Die Analysen basierten auf dem gepaarten, parametrischen t-Test.

**Tabelle 22: Prozentualer Anteil der pAKT-positiven Zellen nach Inkubation von PRP mit HIPA-positiven IgG und PBS (Pufferkontrolle) bzw. gering konzentriertem, hoch konzentriertem Heparin, IV.3-Inhibitor + Hep 0,3 oder AKT-Inhibitor + Hep 0,3.**

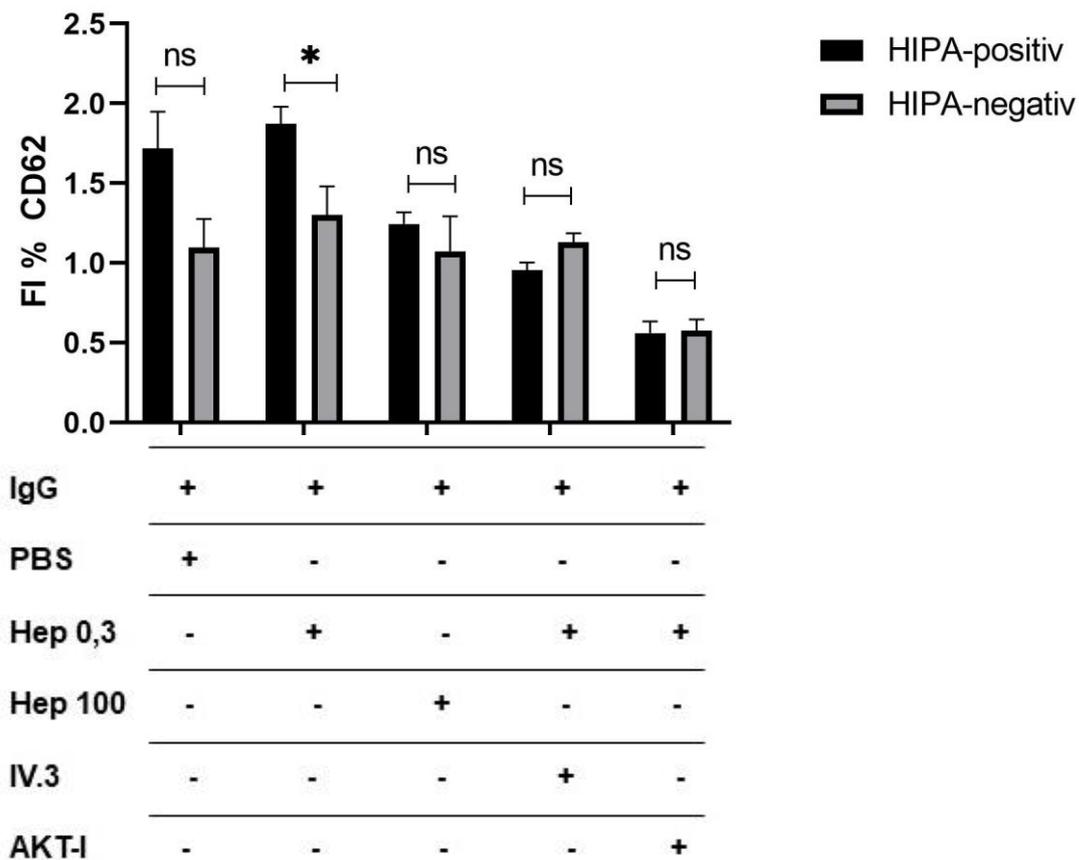
HIPA-positiv				
IgG + PBS	IgG + Hep 0,3	IgG + Hep 100	IgG+ IV.3 + Hep 0,3	IgG + AKT-I + Hep 0,3
0,52	5,28	1,98	0,99	0,50
1,94	4,55	2,43	1,66	0,40
3,93	6,30	3,90	3,00	0,41
2,12	5,68	3,50	3,19	1,37
3,69	4,48	3,56	3,56	0,61
0,77	5,02	2,25	0,69	0,10
2,34	6,88	2,92	1,92	1,07
2,62	5,85	2,55	0,33	0,03
1,65	8,49	1,00	0,69	0,14
6,61	8,07	3,38	0,5	0,15
2,17	8,25	5,17	0,61	1,04
5,78	4,37	3,23	1,07	0,27



**Abbildung 38: Darstellung der prozentualen Anteile der pAKT-positiven Zellen nach Inkubation von mit HIPA-positiven IgG und PBS (Pufferkontrolle), gering konzentriertem (Hep 0,3), hoch konzentriertem Heparin (Hep 100), IV.3-Inhibitor + Hep 0,3 oder AKT-Inhibitor + Hep 0,3:** Im Vergleich der verschiedenen Bedingungen zu Heparin 0,3 U/ml als Bedingung, unter der der höchste prozentuale Anteil pAKT-positiver Zellen exprimiert wurde, zeigte sich durchgehend ein signifikanter Unterschied, IgG+Hep 0,3 erzielt signifikant höhere Werte als IgG + PBS (Mean±SEM 6,10±0,43 vs. 2,85±0,54, p-Wert=0,0005), IgG+Hep 100 (6,10±0,43 vs. 2,99±0,31, p-Wert<0,0001), IgG+IV.3+Hep 0,3 (1,52±0,33 vs. 6,10±0,43, p-Wert<0,0001) oder IgG+AKT-I+Hep 0,3 (0,51±0,13, p-Wert<0,0001), Signifikanzniveaus: \* = p≤0,05, \*\* = p≤0,01, \*\*\* = p≤0,001, \*\*\*\* = p≤0,0001. Abkürzungen: SEM= Standardfehler des Mittelwertes (engl. „standard error of the mean“).

## CD62-Messungen:

Für eine Vergleichbarkeit der pAKT-Ergebnisse mit bisherigen Standardmethoden wurde ebenfalls die CD62P-Expression nach Inkubation von PRP mit HIPA-positiven und HIPA-negativen IgG gemessen unter Zugabe von je nach Ansatz PBS, gering konzentriertem Heparin, hoch konzentriertem Heparin, IV.3-Antikörper oder AKT-Inhibitor (Tab.23, Abb.39).



**Abbildung 39: Darstellung des FI der prozentualen CD62P-Expression nach Inkubation von PRP mit HIPA-positiven (n=6) bzw. HIPA-negativen (n=3) IgG (FI= Werte der jeweiligen Proben/ Wert der reinen Negativkontrolle); Vergleich der Werte von HIPA-positiven und HIPA-negativen IgG:** Nach Inkubation mit gering konzentriertem Heparin zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen HIPA-positiven und HIPA-negativen IgG (FI % CD62P Mean±SEM 1,87±0,11 vs. 1,30±0,18, p-Wert=0,0277), dieser war weder bei hoch konzentriertem Heparin (1,25±0,07 vs. 1,07±0,22, p-Wert=0,3693) noch bei IV.3-Inhibition+Hep 0,3 (0,96±0,045 vs. 1,13±0,6, p-Wert=0,0663) oder AKT-Inhibition + Hep 0,3 (0,56±0,07 vs. 0,58±0,07, p-Wert=0,9017) auszumachen. Signifikanzniveaus: \* = p≤0,05, \*\* = p≤0,01, \*\*\* = p≤0,001, \*\*\*\* = p≤ 0,0001. Abkürzungen: FI = Fold Increase, ns= nicht signifikant (p≥0,05), SEM= Standardfehler des Mittelwertes (engl. „standard error of the mean“).

**Tabelle 23: Werte der prozentualen CD62P-Expression nach Inkubation von PRP mit HIPA-positiven (n=6) bzw. HIPA negativen (n=3) IgG im Verhältnis zur Negativkontrolle (nur PBS), Angabe als Fold Increase = Wert der jeweiligen Probe / Wert der Negativkontrolle**

PBS		Hep 0,3		Hep 100		IV.3 + Hep 0,3		AKT-I+ Hep 0,3	
HIPA-pos.	HIPA-neg.	HIPA-pos.	HIPA-neg.	HIPA-pos	HIPA-neg.	HIPA-pos.	HIPA-neg.	HIPA-pos.	HIPA-neg.
2,29	1,24	1,47	1,47	1,06	1,06	0,84	1,05	0,36	0,55
1,96	0,74	2,27	0,94	1,56	0,7	0,95	1,24	0,7	0,47
2,38	1,31	2,02	1,49	1,26	1,46	1,09	1,1	0,81	0,71
1,06		1,80		1,11		0,8		0,37	
1,39		1,85		1,3		1,08		0,61	
1,23		1,83		1,18		0,97		0,52	

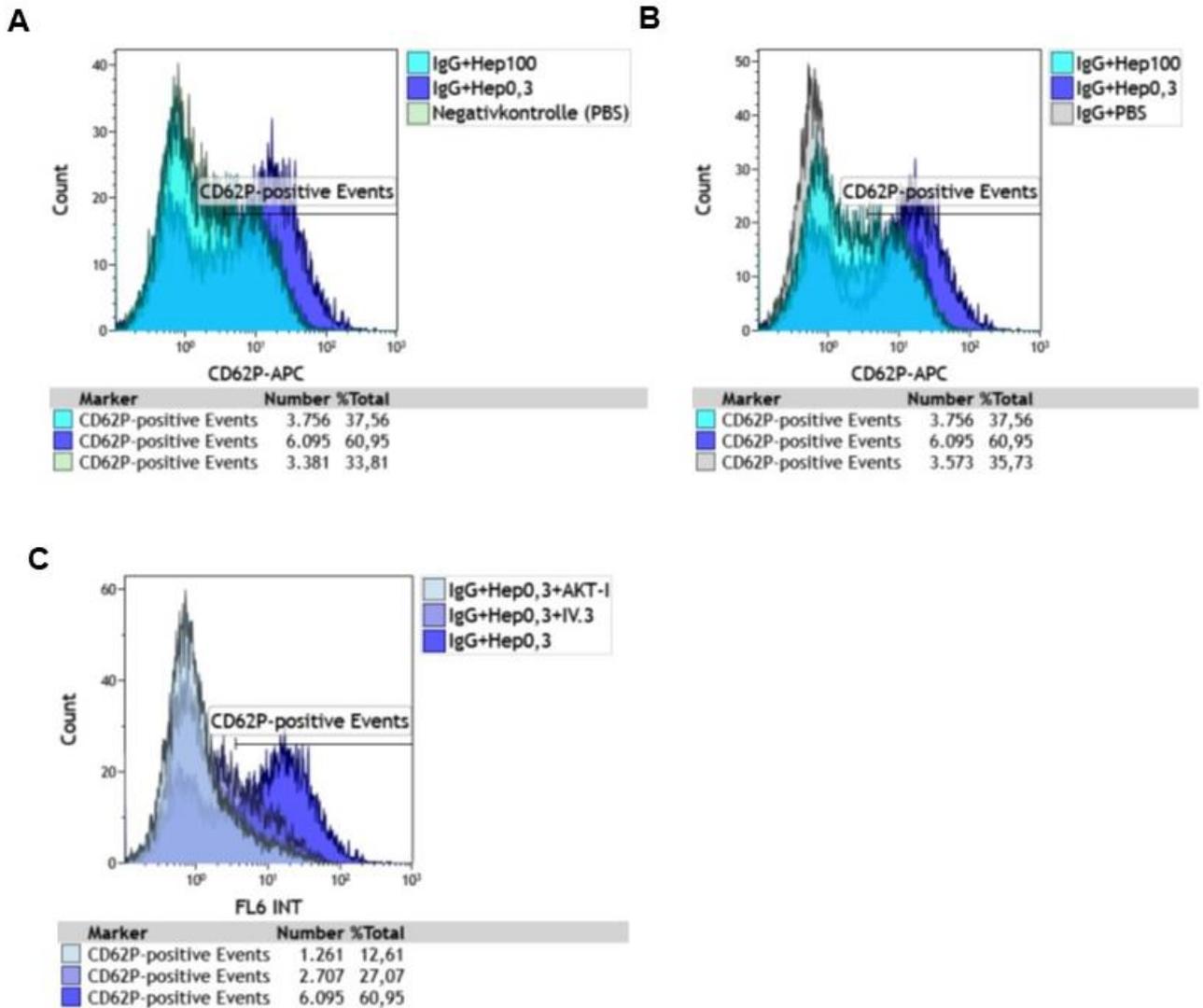
Ein signifikanter Unterschied in der CD62P-Expression zwischen HIPA-positiven und HIPA-negativen IgG war hier nur unter Inkubation mit Heparin 0,3 U/ml auszumachen ( $1,87 \pm 0,11$  vs.  $1,30 \pm 0,18$ , p-Wert=0,0277). Im Gegensatz zur Visualisierung der pAKT-Methode war die CD62P-Expression nicht in der Lage, unter den anderen Bedingungen zwischen HIPA-positiven und HIPA-negativen Seren zu differenzieren. Sowohl bei der Pufferkontrolle ( $1,72 \pm 0,23$  vs.  $1,10 \pm 0,18$ , p=0,1262) als auch unter Heparin 100 U/ml ( $1,25 \pm 0,07$  vs.  $1,07 \pm 0,22$ , p-Wert=0,3693) war keine signifikant unterschiedliche CD62P-Expression zwischen den HIPA-positiven und HIPA-negativen IgG festzustellen. Ebenso zeigte sich sowohl unter Verwendung des IV.3-Antikörpers als auch unter Inhibition der AKT-Kinase eine Abnahme der CD62P-Expression, diese war jedoch ähnlich hoch bei HIPA-positiven und HIPA-negativen IgG (IV.3:  $0,96 \pm 0,049$  vs.  $1,13 \pm 0,06$ , p-Wert=0,0663; AKT-I:  $0,56 \pm 0,07$  vs.  $0,58 \pm 0,07$ , p-Wert=0,9017). Es wurde ein nicht-gepaarter, parametrischer t-Test durchgeführt.

Die Abbildungen 40 und 41 demonstrieren den Effekt positiver HIPA-IgG auf die CD62P-Expression (siehe auch Tab. 24). Der Anteil an CD62P-exprimierenden Events unterschied sich nach Zugabe von gering konzentriertem Heparin nicht signifikant von der Pufferkontrolle mit PBS ( $1,87 \pm 0,11$  vs.  $1,72 \pm 0,23$ , p-

Wert=0,5622), was für eine Pufferreaktion unter PBS spricht. Dagegen nahm der Anteil der CD62P-Expression nach Zugabe von hoch konzentriertem Heparin im Vergleich zu gering konzentriertem Heparin signifikant ab ( $1,87 \pm 0,11$  vs.  $1,25 \pm 0,07$ , p-Wert < 0,0001). Auch eine Präinkubation mit IV.3-Antikörper führte nach Inkubation mit gering konzentriertem Heparin zu einer signifikant verminderten CD62P-Expression im Vergleich zur nicht mit IV.3-Antikörper präinkubierten Probe ( $1,87 \pm 0,11$  vs.  $0,96 \pm 0,05$ , p-Wert = 0,0002). Eine signifikante Hemmung der CD62P-Expression war außerdem unter Verwendung des AKT-Inhibitors zu sehen ( $1,87 \pm 0,11$  vs.  $0,56 \pm 0,07$ , p-Wert < 0,0001). Grundlage der Signifikanzprüfungen war der gepaarte, parametrische t-Test.

**Tabelle 24: FI der prozentualen CD62P-Expression nach Inkubation von PRP mit HIPA-positiven IgG unter gering konzentriertem Heparin, hoch konzentriertem Heparin, IV.3-Inhibition und AKT-Inhibition im Verhältnis zur Pufferkontrolle.** Abkürzungen: FI= Fold Increase, PRP= thrombozytenreiches Plasma (engl. „platelet rich plasma“)

HIPA-positiv				
IgG + PBS	IgG + Hep 0,3	IgG + Hep 100	IgG + IV.3 + Hep 0,3	IgG + AKT-I + Hep 0,3
2,29	1,47	1,06	0,84	0,36
1,96	2,27	1,56	0,95	0,7
2,38	2,02	1,26	1,09	0,81
1,06	1,8	1,11	0,8	0,37
1,39	1,85	1,3	1,08	0,61
1,23	1,83	1,18	0,97	0,52
2,29	1,47	1,06	0,84	0,36
1,96	2,27	1,56	0,95	0,7
2,38	2,02	1,26	1,09	0,81

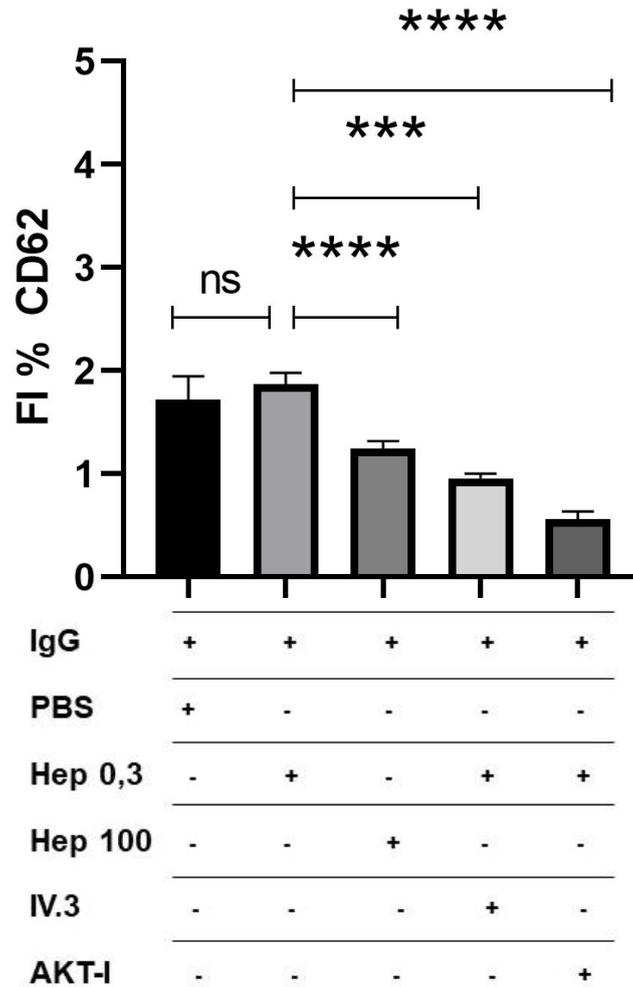


**Abbildung 40: Darstellung der prozentualen CD62P-Expression im Vergleich unter versch. Bedingungen**

A: Vergleich zwischen der Negativkontrolle und HIT-positiven IgG mit gering sowie hoch konzentriertem Heparin: Es zeigte sich im Vergleich zu der Negativkontrolle mit 33,81 % CD62P-exprimierenden Zellen ein schwacher Rechtsshift der Kurve nach Inkubation mit hoch konzentriertem Heparin auf 37,56 %. Im Vergleich mit gering konzentriertem Heparin zeigte sich dagegen ein starker Rechtsshift der Kurve, also eine Zunahme der CD62P-exprimierenden Zellen auf 60,95 %.

B: Vergleich zwischen der Pufferkontrolle und HIT-positiven IgG mit gering sowie hoch konzentriertem Heparin: Es zeigte sich im Vergleich zur Pufferkontrolle (35,73 %) eine geringe Zunahme der CD62P-positiven Events unter HIT-positiven IgG und hoch konzentriertem Heparin auf 37,56 %, unter HIT-positiven IgG und gering konzentriertem Heparin kam es zu einer starken Zunahme auf 60,95 %.

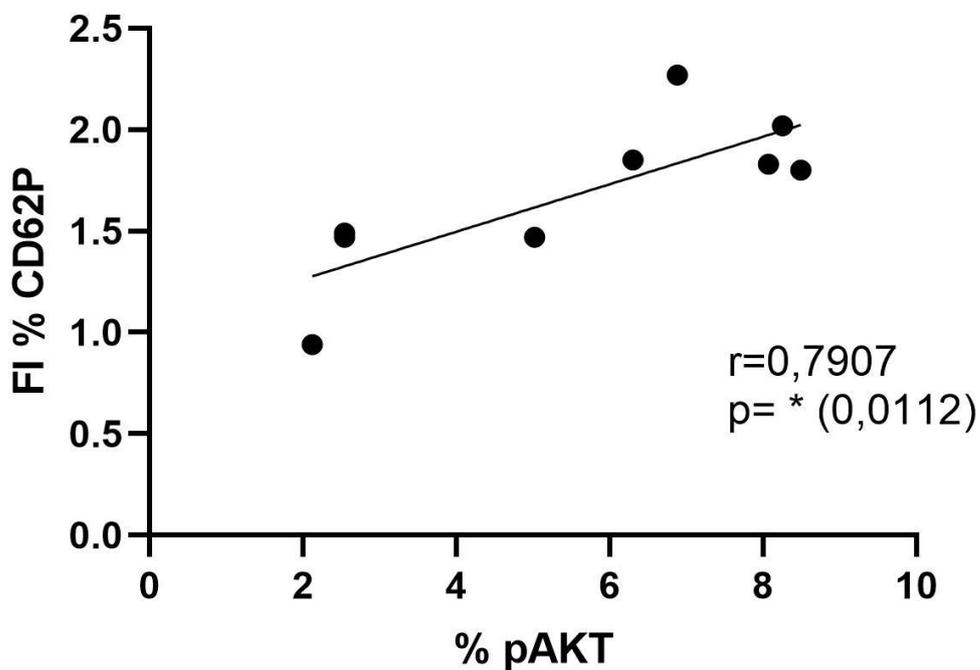
C: Vergleich zwischen HIT-positiven IgG mit gering konzentriertem Heparin und HIT-positiven IgG mit gering konzentriertem Heparin plus zusätzlich AKT- bzw. IV.3-Inhibition: Sowohl die Präinkubation mit AKT-Inhibitor als auch mit IV.3-Inhibitor führte zu einem Linksshift der Kurve und damit zu einer Abnahme der CD62P-positiven Events von 60,95 % auf 12,61 % mit AKT-Inhibitor bzw. 27,07 % mit IV.3-Inhibitor



**Abbildung 41: Darstellung des FI der prozentualen CD62P-Expression im Verhältnis zur Negativkontrolle (nur PBS) nach Inkubation mit HIPA-positiven IgG, Vergleich der Aktivierung unter IgG+Hep 0,3 mit den anderen Bedingungen (IgG + PBS, IgG + Hep 100, IgG +I V.3+Hep 0,3, IgG + AKT-I + Hep 0,3):** Unter IgG + Hep 0,3 zeigte sich eine signifikant höhere CD62P-Expression verglichen mit IgG + Hep 100 ( $1,87 \pm 0,11$  vs.  $1,25 \pm 0,07$ , p-Wert  $< 0,0001$ ), IgG + IV.3 + Hep 0,3 ( $1,87 \pm 0,11$  vs.  $0,96 \pm 0,05$ , p-Wert  $= 0,0002$ ) und IgG + AKT-I + Hep 0,3 ( $1,87 \pm 0,11$  vs.  $0,56 \pm 0,07$ , p-Wert  $< 0,0001$ ). Im Verhältnis zur Pufferkontrolle (IgG + PBS) zeigte sich kein signifikanter Unterschied ( $1,87 \pm 0,11$  vs.  $1,72 \pm 0,23$ , p-Wert  $= 0,5622$ ). Signifikanzniveaus: \* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\*\*\* =  $p \leq 0,0001$ . Abkürzungen: FI= Fold Increase, ns= nicht signifikant ( $p \geq 0,05$ ), SEM= Standardfehler des Mittelwertes (engl. „standard error of the mean“).

### 3.4 Korrelation der pAKT-Messungen mit den CD62P-Werten, dem 4-T-Score, der optischen Dichte im ELISA sowie der time to aggregation im HIPA

Als Ergänzung zur Beurteilung der Vergleichbarkeit mit den Standardmethoden wurden die pAKT-Werte nach Inkubation von Thrombozyten mit HIT-IgG unter Heparin 0,3 U/ml mit den jeweiligen CD62P-Werten auf das Vorhandensein einer Korrelation geprüft (siehe Tab.25, Abb. 42). Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der pAKT-Expression und der CD62P-Expression.



**Abbildung 42: Korrelation der prozentualen Werte der pAKT-Expression nach Inkubation mit den HIT-IgG und Hep 0,3 mit den jeweiligen CD62P-Werten der Patienten:** Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen den Werten ( $n=9$ , Pearson-R-Koeffizient = 0,7907,  $p=0,0112$ ). Abkürzungen: FI= Fold Increase.

**Tabelle 25: Vergleich des prozentualen Anteils der pAKT-Expression der jeweiligen HIT-IgG mit den jeweiligen CD62P-Werten nach Inkubation mit HIT-IgG unter Hep 0,3, n=9**

<b>% pAKT-positive Zellen</b>	<b>FI % CD62P</b>
5,02	1,47
6,88	2,27
8,25	2,02
8,49	1,8
6,3	1,85
8,07	1,83
2,54	1,47
2,12	0,94
2,54	1,49

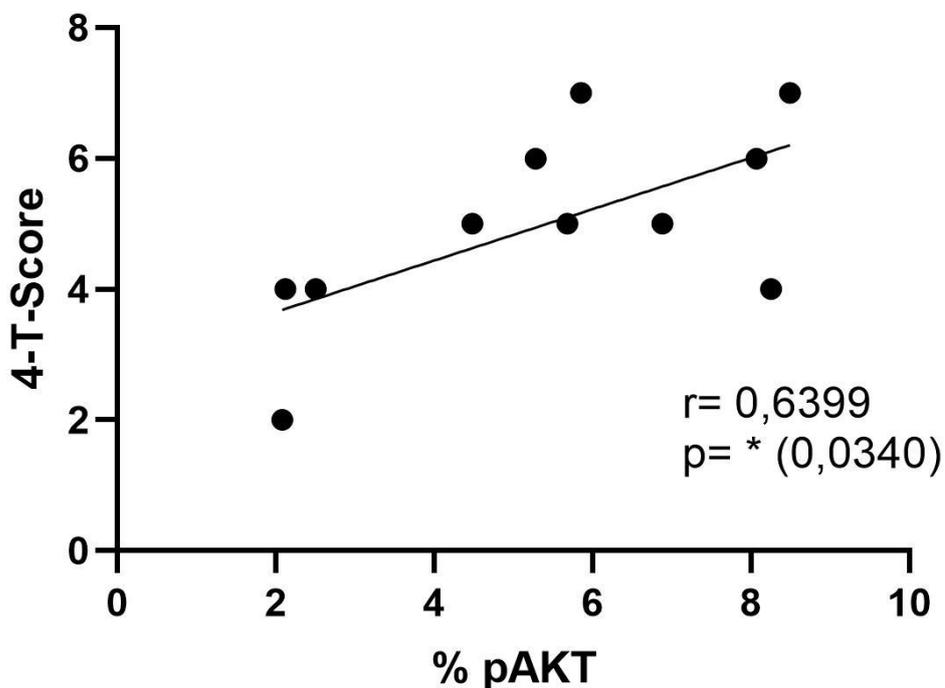
Um die Ergebnisse der pAKT-Messungen mit den bislang existierenden Diagnostikmethoden der HIT zu vergleichen, wurden bei einigen HIT-Seren neben dem HIPA-Test auch ein ELISA-Test mit Messung der optischen Dichte zur Beurteilung der Bindungskapazität der Antikörper durchgeführt. Außerdem wurde bei einigen Patienten der 4-T-Score erhoben, der in Kapitel 1.2.4.1 erklärt wird. Diese Werte wurden auf eine Korrelation mit den Werten der pAKT-Messungen nach Inkubation mit den jeweiligen HIT-IgG unter Heparin 0,3 U/ml untersucht.

Tabelle 26 vergleicht die Werte der pAKT-Messungen nach Inkubation mit HIT-IgG unter Heparin 0,3 U/ml mit dem jeweils klinisch ermittelten 4-T-Score der Patienten, welcher in Kapitel 1.2.4 erläutert wird.

**Tabelle 26: Vergleich des prozentualen Anteils der pAKT-Expression der jeweiligen HIT-IgG mit dem klinischen 4-T-Score der Patienten, n=11**

% pAKT-positive Zellen	4T-Score
2,50	4
5,28	6
2,08	2
5,68	5
4,48	5
6,88	5
5,85	7
8,49	7
2,12	4
8,07	6
8,25	4

Wie in Abbildung 43 zu erkennen ist, wiesen die Werte eine signifikante Korrelation auf mit  $p=0,0340$ , der Pearson-Korrelationskoeffizient  $r$  betrug  $0,6399$ .



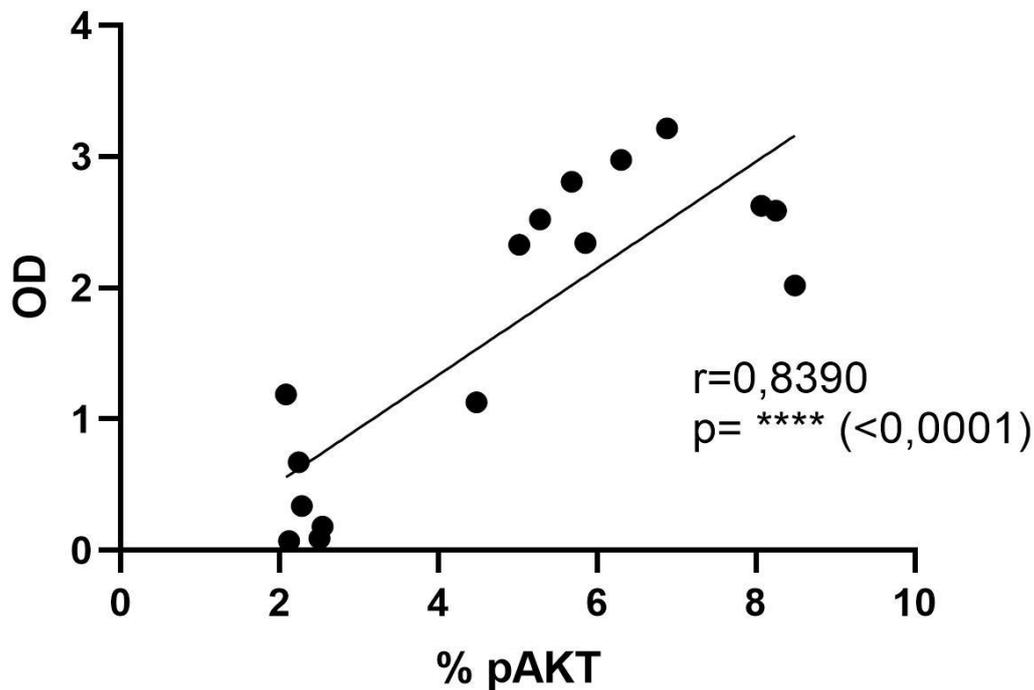
**Abbildung 43: Korrelation der prozentualen Werte der pAKT-Expression nach Inkubation mit den HIT-IgG und Hep 0,3 mit dem klinischen 4-T-Score der Patienten: Es zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen den Werten (n=11, Pearson-R-Koeffizient =  $0,6399$ ,  $p=0,0340$ )**

Tabelle 27 stellt die prozentualen Werte der pAKT-Expression nach Inkubation mit den HIT-IgG unter Heparin 0,3 U/ml den jeweilig ermittelten Werten der optischen Dichte im ELISA gegenüber.

**Tabelle 27: Vergleich der pAKT-Expression nach Inkubation mit den HIT-IgG und Heparin 0,3 U/ml mit den jeweiligen Werten der optischen Dichte (OD) der Antikörper im ELISA, n=16**

<b>% pAKT-positiver Zellen</b>	<b>optische Dichte (OD)</b>
2,50	0,091
5,28	2,520
2,08	1,190
5,68	2,807
4,48	1,130
6,88	3,216
5,85	2,342
8,49	2,017
2,12	0,073
8,07	2,624
8,25	2,590
2,24	0,673
2,28	0,337
2,54	0,183
6,30	2,974
5,02	2,328

Auch diese Werte wiesen, wie Abbildung 44 demonstriert, eine stark signifikante Korrelation auf ( $p < 0,0001$ ,  $r = 0,8390$ ).



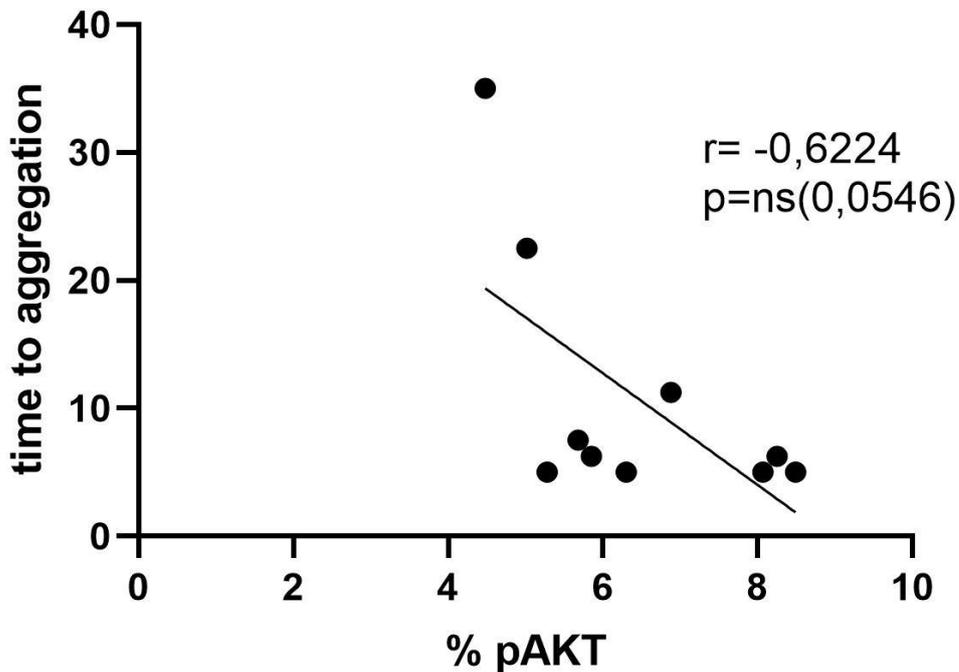
**Abbildung 44: Korrelation der prozentualen Werte der pAKT-Expression nach Inkubation mit den HIT-IgG und Hep.0,3 mit den Werten der optischen Dichte (OD) im ELISA der jeweiligen HIT-Antikörper:** Es zeigte sich eine stark signifikante Korrelation zwischen den Werten ( $p<0,0001$ ,  $r=0,8390$ ). Abkürzungen: OD= optische Dichte.

Die pAKT-Werte wurden außerdem mit der time to aggregation der jeweiligen HIT-Seren im HIPA-Test, also der Zeitspanne, bis eine Transparenzzunahme auftrat, verglichen (siehe Tab.28). Mit einem p-Wert von 0,0546 und  $r= -0,6224$  verfehlte die Prüfung der Werte auf eine Korrelation knapp das Erreichen einer statistischen Signifikanz (siehe Abb. 45).

**Tabelle 28: Vergleich der pAKT-Expression nach Inkubation mit den HIT-IgG und Heparin 0,3 mit der jeweiligen Time to Aggregation im HIPA, n=10**

% pAKT-positive Zellen	time to aggregation (min)
5,28	5
6,3	5
5,68	7,5
4,48	35
5,02	22,5

6,88	11,25
5,85	6,25
8,49	5
8,07	5
8,25	6,25



**Abbildung 45: Korrelation der prozentualen Werte der pAKT-Expression nach Inkubation mit den HIT-IgG und Hep.0,3 mit Werten der time to aggregation im HIPA:** Es zeigte sich knapp keine signifikante Korrelation zwischen den Werten ( $p = 0,0546$ ,  $r = -0,6224$ ).

In der Zusammenschau der Ergebnisse zeigte sich also bei allen getesteten Agonisten, heißt TRAP-6, Arachidonsäure, Kollagen und ADP, ein signifikanter Anstieg des prozentualen Anteils an pAKT-positiven Zellen. Durch die Zugabe des AKT-Inhibitors Bay1125976 nahm der Anteil der pAKT-positiven Zellen jeweils signifikant ab im Vergleich zum Ansatz ohne AKT-Inhibitor. Diese Beobachtungen ließen sich auch bei der Messung des Fold Increases der CD62P-Expression machen. Allerdings bildete der Ansatz mit ADP eine Ausnahme. Hier zeigte sich weder eine signifikante Zunahme der CD62P-Expression im Vergleich zur Pufferkontrolle noch eine signifikante Abnahme nach Inkubation mit AKT-Inhibitor.

Die getesteten Agonisten zeigten auch im Methodenvergleich in der Vollblutaggregometrie eine signifikante Zunahme der Fläche unter der Kurve sowie nach AKT-Inhibition eine signifikante Abnahme der Fläche unter der Kurve. Die Abnahme des phosphorylierten Anteils der AKT-Kinase nach Präinkubation von Bay1125976 war ebenfalls im Westernblot sichtbar.

Im zweiten Teil der Experimente wurde die Reaktion nach Zugabe von IgG isoliert aus vorher mit dem HIPA-Test beurteilten HIT-Seren getestet. Hier zeigte sich unter Inkubation mit Heparin 0,3 U/ml ein stark signifikanter Unterschied nach Zugabe von HIPA-positiven IgG im Vergleich zu den HIPA-negativen IgG oder der Kontrolle, den AB-IgG gesunder Spender. Der Anteil an pAKT-positiven Zellen war unter Zugabe von HIPA-positiven IgG unter Heparin 0,3 U/ml signifikant höher als bei der Pufferkontrolle oder unter Heparin 100 U/ml. Ebenso zeigte sich eine signifikante Abnahme bei den HIPA-positiven IgG nach Inkubation mit dem Fc-Rezeptor-Inhibitor IV.3 sowie dem AKT-Inhibitor. Diese Beobachtungen entsprachen in weiten Teilen den Messungen der CD62P-Expression. Auch hier gab es unter Heparin 0,3 U/ml einen signifikanten Unterschied zwischen HIPA-positiven und HIPA-negativen IgG. Genauso zeigte sich bei der Inkubation mit HIPA-positiven IgG ein signifikanter Unterschied der CD62P-Expression nach Zugabe von Heparin 0,3 U/ml im Vergleich zu Heparin 100 U/ml. Auch eine signifikante Hemmung der CD62P-Expression ließ sich nach Zugabe von IV.3 oder dem AKT-Inhibitor ausmachen.

Die durchflusszytometrisch gemessenen Werte der pAKT-Expression korrelierten ebenso mit den CD62P-Werten sowie den jeweiligen klinisch ermittelten Werten des 4-T-Score der Patienten und den im ELISA gemessenen Werten der optischen Dichte. Eine Korrelation der pAKT-Werten mit den jeweiligen gemessenen Werten der time to aggregation im HIPA verfehlte knapp statistische Signifikanz.

## 4 Diskussion

### 4.1 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der Arbeit war, eine Methode zur Charakterisierung der Signaltransduktion in Thrombozyten zu etablieren, die die Palette der aktuell existierenden Methoden zur Diagnose von Thrombozytenfunktionsstörungen erweitern beziehungsweise ergänzen kann. Trotz eines bereits existierenden breiten Spektrums an Diagnostikmethoden gelingt es bei beobachteter klinischer Blutungstendenz oft nicht, die zugrundeliegende Ursache auszumachen und eine Diagnose zu stellen. Vor allem die Diagnose von milden angeborenen Blutgerinnungsstörungen bei Patienten mit beobachteter Blutungstendenz stellt oftmals eine Herausforderung dar (Boender et al., 2016). So kann aktuell nur bei circa 30-40 % der Patienten mit einer klinisch beobachteten milden Blutungstendenz eine konkrete Diagnose wie beispielsweise ein von-Willebrand-Syndrom gestellt werden. Der überwiegende Teil der Patienten fällt unter die Arbeitsdiagnose „Bleeding disorder of unknown case“ (BDUC). Sie ist definiert als auffällig erhöhte Blutungstendenz, die keine Abnormalitäten in den Standardgerinnungstests zeigt. Die Diagnose BDUC wird in den letzten Jahren immer öfter vergeben, sie ist jedoch mit vielen klinischen Herausforderungen verbunden (Baker & O'Donnell, 2021; Thomas et al., 2020). So stellt diese Diagnose eine Ausschlussdiagnose dar, was die Durchführung exzessiver Laboruntersuchungen erfordert, die teils sehr aufwändig sind (Dovlatova et al., 2014). Die Diagnose der BDUC umfasst eine sehr heterogene Gruppe an Krankheitsbildern mit unterschiedlichen Ätiologien wie undiagnostizierte monogenetische Störungen, polygenetische Störungen oder Störungen anderer Ursache. Labortests, die zugrundeliegende Ursachen einer BDUC charakterisieren und diese so diagnostizieren können, haben sich noch nicht etabliert. Dies kann mitunter dem Zusammenschließen heterogener Krankheitsbilder unbekannter, diverser Ursachen zu einer Diagnose geschuldet sein. Gleichzeitig weist es aber auch auf die geringe Sensitivität der bislang existierenden Tests bezüglich Ursachen für Blutungsstörungen hin (Thomas et al., 2020; van Asten et al., 2018). Dadurch ist eine passende Therapie und ein angepasstes Management im klinischen Alltag erschwert. Zwar existieren Empfehlungen und Fallstudien zum Umgang mit diesen Patienten, jedoch gibt es bislang aufgrund

fehlender Kenntnis der Pathogenese keine kausale Therapie. Die Diagnose BDUC geht zudem mit einer erhöhten Angst seitens der Patienten und einer erhöhten Morbidität einher (Thomas et al., 2020). Dies unterstreicht die Relevanz einer möglichst genauen Diagnostik und Ursachenklärung von Blutungsstörungen. Für eine korrekte Diagnostik von Thrombozytenfunktionsstörungen müssen allerdings verschiedene Level der Labordiagnostik durchlaufen werden, die zum Teil zeit- und kostenintensiv sind, Speziallabore erfordern, oft nur gering standardisiert sind und für eine breitere klinische Anwendung weitere Validierung benötigen (Bourguignon et al., 2022; van Asten et al., 2018; Wagner et al., 2022). Außerdem sind viele dieser Methoden nicht sensitiv genug, um eine pathophysiologische Ursache zu diagnostizieren und eine konkrete Diagnose stellen zu können (Wagner et al., 2022). Gerade Defekte in der Signaltransduktion sind schwer zu diagnostizieren, da das Zusammenspiel zwischen inhibitorischen und aktivierenden Netzwerken, das im Zuge der Thrombose und Hämostase stattfindet, sehr komplex ist. So müssen viele Aspekte verschiedener Signalnetzwerke integriert werden, um ein einigermaßen repräsentatives Modell der Thrombozytenfunktion- und interaktion zu erhalten, das zum Verständnis der komplexen Mechanismen beiträgt. Hinzu kommt erschwerend die Variabilität innerhalb der Thrombozytenreaktionen verschiedener Spender, sodass trotz kontinuierlichem Erkenntnisgewinn das Verstehen und Analysieren der komplexen Prozesse weiterhin eine Herausforderung darstellt (Bye et al., 2016). Weil Defekte der Thrombozytenfunktion jedoch mit signifikant höheren Blutungsrisiken einhergehen, ist eine Diagnose essentiell um perioperative Risiken zu stratifizieren, ein adäquates Management zu gewährleisten und eine zielgerichtete Therapie zu ermöglichen (Wagner et al., 2022). Es besteht somit der Bedarf an weiteren Diagnostikmethoden, um Blutungstendenzen besser und schneller einzuordnen und so spezifischere Therapien einleiten zu können (van Asten et al., 2018). Um bislang existierenden Methoden sinnvoll zu ergänzen oder ersetzen zu können, sollten neue Methoden einfach und universell durchführbar sein, einen spezifischen Weg der Signaltransduktion darstellen und auch für die Anwendung im klinischen Kontext geeignet sein. In diesem Kapitel werden die Vorteile und die Eignung der

Messung der Phosphorylierung der AKT-Kinase als Methode für die Thrombozytenfunktionsdiagnostik dargelegt und diskutiert.

## **4.2 Bewertung der Ergebnisse**

Der Fokus wurde in dieser Arbeit auf die Untersuchung der AKT-Kinase gerichtet, dem Haupteffektor downstream der PI3-Kinase, da die AKT-Kinase eine der wichtigsten Kinasen für die Thrombozytenfunktion darstellt. Sie spielt eine zentrale Rolle bei der Thrombozytenaktivierung und der durch sie hervorgerufenen Prozesse wie die der Integrinaktivierung, Thrombozytenaggregation sowie Thrombusformation und ist außerdem wichtig für die Thrombusstabilität (Guidetti et al., 2015; Zou et al., 2022). Ihre Aktivierung wird durch Phosphorylierung initiiert und stellt einen wichtigen Schritt für die Aktivierung von Thrombozyten dar (Pelzl et al., 2022). Dass die Signaltransduktion via AKT-Kinase mittels durchflusszytometrischer Bestimmung ihres Phosphorylierungsgrades dargestellt werden kann und mit dem Aktivierungsgrad von Thrombozyten korreliert, zeigen Pelzl et al. in ihrer Arbeit, in der Thrombozyten mit Serum von COVID-19-Patienten inkubiert und die pAKT-Expression sowie die CD62P-Expression gemessen wurde (Pelzl et al., 2022).

Auch die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen, dass es möglich ist, die Signaltransduktion und den Aktivierungszustand von Thrombozyten mittels durchflusszytometrischer Bestimmung der AKT-Phosphorylierung darzustellen. Da eine Reaktivität auf verschiedene extrazelluläre Agonisten essenziell für die Thrombozytenfunktion und -aktivierung ist (Guidetti et al., 2015), wurde im ersten Teil der Arbeit das Ausmaß der Phosphorylierung und damit Aktivierung der AKT-Kinase in Abhängigkeit der Inkubation mit verschiedenen Agonisten bestimmt und mit etablierten Standardmethoden verglichen.

Bei Betrachtung der im vorherigen Kapitel dargestellten Ergebnisse lässt sich deutlich erkennen, dass die Zugabe aller verwendeten Agonisten, also TRAP-6, Arachidonsäure, Kollagen sowie ADP zu einer stark signifikanten Zunahme der prozentualen Expression der phosphorylierten Form der AKT-Kinase bei Thrombozyten führt. Dies zeigt, dass die im Zuge dieser Dissertation etablierte

Methode, die durchflusszytometrischen Messung des phosphorylierten Anteils der AKT-Kinase, erfolgreich ist und in der Lage, aktivierte Thrombozyten anhand ihrer pAKT-Expression darzustellen. Die signifikante Abnahme des prozentualen Anteils der pAKT-positiven Zellen nach vorheriger Inkubation der Thrombozyten mit dem AKT-Inhibitors Bay1125976 bei allen Agonisten zeigt, dass die Methode spezifisch die Expression der phosphorylierten AKT darstellt, da eine Hemmung dieses Phosphorylierungsschrittes zu einer deutlichen Abnahme des Signales führte. Dass auch durch die Zugabe von Puffer ohne vorherige AKT-Inhibition, deutet darauf hin, dass es allein schon durch die Zugabe und Inkubation mit Puffer zu einer geringen Aktivierung kommt. Es zeigt sich jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen der Aktivierung durch Puffer im Vergleich zu den Agonisten, was auf eine deutliche Aktivierung durch die Agonisten schließen lässt.

Vergleicht man die Ergebnisse der in der Dissertation präsentierten Methode mit der bereits weit verbreiteten durchflusszytometrischen Messung der CD62P-Expression von Thrombozyten als Aktivierungsmarker, wird anschaulich, dass die Ergebnisse sich in großem Ausmaß ähneln. Auch hier erzeugen die Agonisten TRAP-6, Arachidonsäure und Kollagen eine signifikante Steigerung der CD62P-Expression im Vergleich zur Pufferkontrolle. Lediglich in der Untersuchungsreihe nach Aktivierung mit ADP fand keine signifikante Steigerung der CD62P-Expression statt. Das war jedoch sehr wahrscheinlich der kleinen Probenanzahl (n=5) geschuldet. Die Messungen sollten zu einem späteren Zeitpunkt in einer größeren Kohorte nochmals überprüft werden. Die vorherige Inhibition der AKT-Kinase mittels Bay1125976 führte zu einer signifikanten Abnahme der CD62P-präsentierenden Zellen nach Aktivierung mit TRAP-6, Arachidonsäure sowie Kollagen im Vergleich zu den nicht inhibierten Zellen. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung der AKT-Kinase durch Phosphorylierung einen entscheidenden Signalweg in der Thrombozytenaktivierung und infolgedessen P-Selektin-Expression darstellt.

Als Vergleich mit einer weiteren Standardmethode wurde die Aktivierung durch die Agonisten TRAP-6, Arachidonsäure, Kollagen sowie ADP ebenfalls mittels

Vollblutaggregometrie (Multiplate) gemessen. Auch hier wurden sowohl Messungen an unbehandeltem Vollblut sowie mit Bay1125976 präinkubiertem Vollblut durchgeführt und die Ergebnisse miteinander verglichen. Dabei zeigte sich bei allen Agonisten eine signifikante Abnahme der Fläche unter der Kurve als Maß der Aggregation nach Inkubation mit dem AKT-Inhibitor im Vergleich zu unbehandeltem Vollblut. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der AKT-Signalweg neben der Granulasekretion auch für die Aggregation der Thrombozyten essenziell ist und die Messung der pAKT-Expression als Darstellung des Aktivierungszustandes von Thrombozyten sich mit einer weiteren Standardmethode vergleichen lässt und somit valide scheint.

Auch der Westernblot zeigte einen klaren Unterschied in den Banden zwischen mit AKT-Inhibitor vorbehandelten Proben und nicht inhibierten Proben. Die Bande auf Höhe der 68 kDa, die die Proteinlevel der phosphorylierten AKT-Kinase repräsentiert, war nach Inhibition konstant schwächer abgebildet als ohne Bay1125976. Dass in dieser Darstellung keine deutliche Signalverstärkung nach Aktivierung durch TRAP-6 und ADP im Vergleich zur Pufferkontrolle zu erkennen war, lässt sich am wahrscheinlichsten durch eine geringe Probeanzahl sowie das Fehlen an Erfahrung mit dieser Methode erklären. Eine weitere Erklärung könnte eine gewisse Pufferreaktion durch PBS sein.

Neben der physiologischen Thrombozytenaktivierung und -aggregation ist die AKT-Kinase jedoch auch an pathophysiologischen Prozessen wie der Thrombusformation beteiligt (Chen et al., 2019). So ist der PI3/AKT-Signalweg beispielsweise an der erhöhten Thromboseneigung von COVID-Patienten beteiligt (Pelzl et al., 2022) und auch bei der ITP führen AKT-vermittelte Prozesse zu einer Elimination von Thrombozyten (Chen et al., 2018). Beide Krankheitsbilder führen Antikörper-vermittelt zu einer Aktivierung der AKT-Kinase, welche entscheidend zum Pathomechanismus beiträgt. Um die Methode auch im klinischen Kontext unter dem Aspekt der Beteiligung der AKT-Kinase an verschiedenen Erkrankungen anzuwenden und somit ihre klinische Bedeutung zu untermauern, wurde in dieser Arbeit die Beteiligung der AKT-Kinase bei der HIT untersucht. Dazu wurden Thrombozyten mit aus von HIPA-positiven Spenderseren isolierten Antikörpern inkubiert und der Effekt auf die AKT-Phosphorylierung als Maß der

Aktivierung von Thrombozyten durch diese Antikörper gemessen. Als Vergleich wurden sowohl aus AB-Seren isolierte Antikörper als auch aus HIPA-negativen Spenderseren isolierte Antikörper verwendet. Die Pufferkontrolle zeigte, dass eine reine Inkubation von Thrombozyten mit den verschiedenen Antikörpern unter Zugabe von Puffer zu einem geringen Unterschied in der pAKT-Expression zwischen HIPA-positiven und HIPA-negativen Seren führte. Dies kann auf eine minimale unspezifische Grundaktivierung der Thrombozyten infolge einer Manipulation der Thrombozyten im Test durch Prozesse wie die Zentrifugation oder Rotation sowie auf eine gewisse Grundaktivität der HIPA-positiven Antikörper auch ohne externe Zugabe von Heparin zurückgeführt werden. Es war jedoch keine signifikante Steigerung zwischen den HIPA-positiven IgG und der Negativkontrolle mit den AB-IgG auszumachen. Dies spricht insgesamt für eine geringe Aktivierung durch Probenprozessierung oder durch unspezifische Aktivierungsprozesse infolge des Vorhandenseins von Antikörpern aus Seren kritisch kranker Patienten. Es demonstriert vor allem die Bedeutung des Vorhandenseins von Heparin für die durch HIPA-positive Antikörper induzierte Aktivierung von Thrombozyten. Denn im Gegensatz zur Pufferkontrolle führt eine Inkubation mit HIPA-positiven IgG unter Zugabe von Heparin in der Konzentration 0,3 U/ml zu einer signifikanten Zunahme der Phosphorylierung, sowohl im Vergleich zu den HIPA-negativen IgG als auch der AB-Kontrolle. Das spricht für eine spezifische Reaktion und Aktivierung der Thrombozyten durch die HIPA-positiven IgG unter Heparin 0,3 U/ml. Diese Reaktion fällt unter Zugabe von Heparin in der Konzentration 0,3 U/ml deutlich stärker aus und wird durch Heparin in höherer Konzentration, hier 100 U/ml, supprimiert. So wird die Spezifität der Reaktion untermauert. Eine Hemmung durch Heparin in höheren Konzentrationen ist in der Literatur gut bekannt und lässt sich dadurch erklären, dass bei geringeren Heparinkonzentrationen das Verhältnis zwischen Heparin und PF4 stöchiometrisch optimaler ist (Greinacher et al., 2008). Dass diese Reaktion auf eine Aktivierung der Thrombozyten durch die IgG zurückzuführen ist, wird dadurch deutlich, dass eine Inhibition der Bindungsstelle für IgG auf Thrombozyten mittels IV.3-Inhibitor die signifikanten Expressionsunterschiede zwischen HIPA-positiven, HIPA-negativen und AB-IgG verschwinden lässt. Die fehlenden beziehungsweise nur gering

signifikanten Unterschiede nach Inkubation mit dem AKT-Inhibitor zeigen erneut, dass die Methode gezielt den Phosphorylierungszustand der thrombozytären AKT-Kinase darstellt, da eine Inhibition dieses Vorgangs zu einer starken Abnahme des Signals führte. Zudem wird die Bedeutung dieses Signalweges auch bei der Pathogenese der HIT untermauert.

Die Spezifität der Reaktion zwischen HIPA-positiven IgG unter Heparin in niedriger Konzentration (0,3 U/ml) im Vergleich zu hoch konzentriertem Heparin (100 U/ml) oder der Pufferkontrolle wird durch eine klare Signifikanz zwischen der pAKT-Expression unter Zugabe von Heparin in der Konzentration 0,3 U/ml im Vergleich zu der Pufferkontrolle sowie der mit Heparin in hoher Konzentration inkubierten Probe unterstrichen. Die signifikante Hemmung unter Präinkubation mit IV.3-Inhibitor demonstriert, dass es sich um ein Signal handelt, das hauptsächlich durch die HIPA-positiven IgG hervorgerufen wird. Die Hemmung nach Präinkubation durch den AKT-Inhibitor belegt, wie bereits beschrieben, die spezifische Darstellung des Phosphorylierungszustandes und die Rolle der AKT-Kinase bei der HIT.

Der Vergleich zwischen HIPA-negativen IgG sowohl mit HIPA-positiven IgG, die eine Pufferreaktion im HIPA zeigten, als auch mit HIPA-positiven Seren, die keine Pufferreaktion zeigten, lässt dagegen keine eindeutigen Unterschiede in der Stärke der Reaktion zwischen Puffer-positiven und Puffer-negativen Seren ausmachen. Zwar existiert ein signifikanter Unterschied in der Aktivierung zwischen HIPA-positiven Puffer-positiven IgG im Vergleich zu den HIPA-negativen IgG unter Inkubation mit Puffer, dieser ist jedoch auch bei den HIPA-positiven Puffer-negativen IgG auszumachen. Da auch kein signifikanter Unterschied zwischen HIPA-positiven Puffer-positiven und HIPA-positiven Puffer-negativen IgG unter Heparin 0,3 festzustellen ist, lässt sich vermuten, dass die Pufferreaktivität der Antikörper keinen entscheidenden Einfluss auf die Aktivierung der Thrombozyten unter gering konzentriertem Heparin hat. Bei der Pufferkontrolle zeigte sich ebenfalls zwischen den HIPA-positiven Puffer-positiven IgG und HIPA-positiven Puffer-negativen IgG kein signifikanter Unterschied. Somit scheint die Methode im Gegensatz zum HIPA-Test nicht geeignet, um die Pufferreaktivität der IgG zu beurteilen.

Als Referenz wurde die Aktivierungsreaktion von HIPA-positiven sowie HIPA-negativen IgG an Thrombozyten auch anhand der Steigerung der CD62P-Expression gemessen. Dabei zeigt sich zwischen den HIPA-positiven und HIPA-negativen Antikörpern ein signifikanter Unterschied in der P-Selektion-Expression der Thrombozyten unter gleichzeitiger Inkubation mit gering konzentriertem Heparin. Dies deckte sich damit mit den Ergebnissen der pAKT-Messung. Die pAKT-Werte unter niedermolekularem Heparin korrelierten statistisch signifikant mit den Werten der CD62P-Messungen. Es fällt jedoch auf, dass die pAKT-Messungen zwischen den HIPA-positiven und HIPA-negativen Antikörpern im Vergleich zu den CD62P-Werten eine deutlich stärkere Signifikanz aufwiesen, was für die hohe Sensitivität der neuen Methode spricht. Sowohl unter PBS als auch unter dem hoch konzentrierten Heparin ließ sich kein signifikanter Unterschied in der Aktivierung zwischen HIPA-positiven und HIPA-negativen IgG bei der CD62P-Messung ausmachen, anders als bei den pAKT/AKT-Messungen. Nach Inkubation mit HIPA-positiven IgG fiel auch die CD62-Expression unter gering konzentriertem Heparin signifikant stärker aus als unter hoch konzentriertem Heparin, so dass sich daraus schließen lässt, dass die Kombination aus HIPA-positiven IgG und niedrig konzentriertem Heparin zu einer deutlich stärkeren Thrombozytenaktivierung führt. Die signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Inkubation mit IV.3 sowie AKT-Inhibitor zeigen hier ebenfalls, dass es sich um die Darstellung einer Aktivierung durch Antikörper handelt und die Phosphorylierung der AKT-Kinase an diesem Aktivierungsschritt maßgeblich beteiligt ist. Dass sich die CD62P-Expression zwischen PBS und dem niedrig konzentrierten Heparin nicht stark unterschied, lässt auf eine vergleichsweise geringe Spezifität der CD62P-Messung im Vergleich zur pAKT-Messung schließen. Dies stellt einen entscheidenden Vorteil der neuen Methode dar.

Zusammenfassend zeigt sich mit der durchflusszytometrischen Messung des Phosphorylierungsgrades der AKT-Kinase eine robuste Methode, um funktionelle Antikörper zu detektieren. Allerdings weisen die durchgeführten Experimente Limitationen hinsichtlich ihrer Aussagekraft auf. So muss berücksichtigt werden, dass die Experimente an einer kleinen Fallzahl durchgeführt wurden unter Annahme einer Normalverteilung. Dies sollte in prospektiven Studien mit großen

Fallzahlen weiterverfolgt werden, um eine ausreichende Validierung und Standardisierung zu erhalten.

Aus den Ergebnissen lässt sich auch im Vergleich zur bereits häufig verwendeten CD62P-Methode als funktioneller Test für die HIT festhalten, dass die durchflusszytometrische Messung der pAKT-Expression geeignet scheint, um den Aktivierungszustand der Thrombozyten darzustellen. Sie funktioniert bei verschiedenen Agonisten und die Ergebnisse sind vergleichbar mit denen von schon etablierten Standardmethoden wie der Messung der CD62P-Expression sowie der Vollblutaggregometrie. Auch in der klinischen Anwendung scheint die Methode erfolgreich einsetzbar zu sein. So ist sie in der Lage, die Aktivierung von Thrombozyten durch Antikörper aus HIPA-positiven Seren unter Heparin darzustellen und zu unterscheiden zwischen der spezifischen Aktivierung unter gering konzentriertem Heparin und unspezifischeren Aktivierungen. Dies stellt einen essenziellen Aspekt für einen potenziellen Einsatz in der Diagnostik dar. Dass die Methode geeignet für die Diagnostik sein könnte, wird auch durch die signifikante Korrelation mit dem 4-T-Score sowie den Werten der optischen Dichte im ELISA deutlich. Beide Methoden sind wichtige Bestandteile der aktuellen Diagnostik einer HIT. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Werte der optischen Dichte im ELISA, die das Level der vorhandenen Anti-Heparin/PF4-Antikörper widerspiegeln, sowohl mit der Wahrscheinlichkeit eines positiven funktionellen Tests als auch mit der Wahrscheinlichkeit des Auftretens von klinischen Manifestationen wie Thrombosen korrelieren (Kerényi et al., 2017; Kim et al., 2011; Tomer, 1997; Warkentin et al., 2008; Zeleznik et al., 2021; Zwicker et al., 2004). Dass auch die Werte der pAKT-Messungen mit der optischen Dichte korrelieren, legt nahe, dass sie geeignet für die Diagnose einer klinisch relevanten HIT sein können. Bei der Bewertung dieser Ergebnisse gilt es jedoch zu beachten, dass auch diese Ergebnisse auf einer kleinen Fallzahl basieren und bislang noch kein klarer biologischer Zusammenhang zwischen den Parametern beschrieben wurde. Auch hier bedarf es also einer breiteren Testung der Methode für eine bessere Aussagekraft. Die Korrelation mit der pAKT-Werte mit den jeweiligen time-to-aggregation-Werten der Seren im HIPA erreicht knapp keine statistische Signifikanz, was jedoch ebenfalls darauf zurückzuführen sein könnte, dass nur

eine recht geringe Anzahl an Seren (n=10) verglichen wurde. Das unterstreicht den Bedarf an einer breiteren Testung der Methode.

### **4.3 Wissenschaftliche Bedeutung und Einordnung der Ergebnisse**

Das Ziel meiner Arbeit war die Untersuchung, ob die durchflusszytometrische Messung der Phosphorylierung der AKT-Kinase nach Aktivierung durch verschiedene Agonisten eine mögliche, valide Methode zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion darstellt. Mehrere Studien haben bereits demonstriert, dass die AKT-Kinase als Downstream-Effektor der PI3K-Kinase essenziell für die Thrombozytenaktivierung und -aggregation ist. Ihr Ausschalten in Knockout-Mäusen führt zu einer starken Funktionsbeeinträchtigung der Thrombozytenfunktion (Althaus et al., 2020; Chen et al., 2004; O'Brien et al., 2011; Woulfe et al., 2004).

Im Zuge der Arbeit konnten wir bestätigen, dass der AKT-Signalweg geeignet ist, um die Aktivierung von Thrombozyten aufzuzeigen und mit den Ergebnissen bisheriger Standardmethoden einhergeht. Damit könnte diese Methode eine geeignete neue Diagnostikmethode für die Untersuchung der Thrombozytenfunktion darstellen (Althaus et al., 2020). Insbesondere für die Diagnostik bei Kindern bietet die Methode Vorteile, da sie mit geringen Blutvolumina auskommt und auch bei Patienten mit Thrombozytopenien aussagekräftig ist (Althaus et al., 2020; Michelson, 2006; Navred et al., 2019). So reichen geringe Mengen aus für funktionelle Testungen und gleichzeitig für morphologische Untersuchungen wie die Immunfluoreszenzmikroskopie, was für die Diagnose von Thrombozytenfunktionsstörungen bei kleinen Kindern hilfreich sein kann (Althaus et al., 2020; Greinacher et al., 2017; Israels et al., 2011). Ein weiterer Vorteil gegenüber der Lichttransmissionsaggregometrie ist die Fixierbarkeit der Proben. So können sie über Nacht gelagert und am nächsten Tag in der Routinediagnostik untersucht werden (Althaus et al., 2020). Außerdem ermöglicht dies durch einen Versand von Proben eine breitere Anbindung und Untersuchung von Patienten, die aufgrund räumlicher Distanz nur erschwert Zugang zu größeren diagnostischen Zentren haben. Viele Untersuchungen wie die Lichttransmissionsaggregometrie sind nur in Speziallaboren durchführbar und damit räumlich sehr gebunden. Des

Weiteren existiert bei der LTA noch ein Mangel an Standardisierung (Navred et al., 2019). Die durchflusszytometrischen Untersuchungen könnten hier wichtige Vorteile mit sich bringen. Studien haben gezeigt, dass die Durchführung einer durchflusszytometrischen Messung der CD62P sowie CD63-Messung als Screeningtest vor der Durchführung aufwändiger Diagnostikmethoden sinnvoll sein können, um Patienten mit möglichen Defekten herauszufiltern und unnötige Diagnostik zu vermeiden (Dovlatova et al., 2014). Auch andere Studien zeigen einen hohen negativen prädiktiven Wert der durchflusszytometrischen Analysen verglichen mit der Lichttransmissionsaggregometrie, was die Bedeutung als Screeningassay unterstreicht (Navred et al., 2019). Die durchflusszytometrische Messung der CD62P und CD63P-Expression hat allerdings Defizite in der Detektion von GPVI-Defekten aufgezeigt, sodass eine weitere Entwicklung solcher Testmethoden notwendig ist (Dovlatova et al., 2014). Hier könnte die durchflusszytometrische Bestimmung der Phosphorylierung der AKT-Kinase ihren Einsatz finden, da sie, wie die Ergebnisse zeigen, auch bei der Verwendung von Kollagen als Agonist anwendbar ist. Weil die verschiedenen Methoden unterschiedliche Dynamiken und unterschiedliche Endpunkte der Thrombozytenaktivierung darstellen, ist es sehr wahrscheinlich, dass sie auch je nach Fragestellung und Defektursache unterschiedliche Sensitivitäten aufweisen, was von Vorteil bei der Diagnose von Thrombozytenfunktionsstörungen sein kann (Navred et al., 2019). Dass durchflusszytometrische Assays in der Lage sind, verschiedene Thrombozytendefekte zu detektieren und somit das diagnostische Spektrum, um wertvolle Möglichkeiten zu ergänzen, zeigen mehrere Studien (Andres et al., 2018; Navred et al., 2019; Rubak et al., 2016; van Asten et al., 2018). Insbesondere für die Diagnose von Plättchenfunktionsstörungen bei Patienten mit hohem Blutungsscore scheint die Durchflusszytometrie akkurater zu sein als die Lichttransmissionsaggregometrie. Auch bei Patienten mit Thrombozytopenien ist die Durchflusszytometrie in der Detektion von Funktionsstörungen überlegen. Dies kann gerade bei der Vorhersage von Blutungsrisiken bei Patienten mit ITP entscheidend sein kann (Frelinger et al., 2015; van Asten et al., 2018). Die in dieser Arbeit beschriebene Messung des pAKT-Anteils kann die Diagnostik um einen weiteren Aspekt ergänzen und somit das Panel erweitern.

Des Weiteren kann diese Test- und Diagnostikmethode eine Bedeutung für die Überwachung und die Risikobewertung von Patienten haben, die Thrombozytenaggregationshemmer einnehmen, sowie der Risikoüberwachung bei kardiovaskulären Krankheiten dienen (Althaus et al., 2020). Insbesondere da PI3-Kinase-Inhibitoren einen immer breiteren klinischen Einsatz sowohl in der Tumortherapie als auch als Therapieoption bei Thrombosen und kardiovaskulären Erkrankungen erfahren, könnte die Messung der pAKT-Expression als eine vielversprechende diagnostische Alternative zum Monitoring der Medikamentenfunktion sowie der Risikostratifizierung kardiovaskulärer Krankheiten dienen (Althaus et al., 2020; Durrant & Hers, 2020; Ribes et al., 2020; Stojanovic et al., 2006). So ist beispielsweise der PI3-Kinase-Inhibitor Alpelisib für die Behandlung von Brustkrebs bei postmenopausalen Frauen mit Hormonrezeptor-positivem, HER2-negativem, PIK3CA-mutiertem Brustkrebs zugelassen (Ellis & Ma, 2019). Gerade bei der bislang erprobten Anwendung von vor allem pan-PI3-Kinase-Inhibitoren in der Tumortherapie wurden jedoch einige Nebenwirkungen und Komplikationen beobachtet, da die PI3-Kinase ubiquitär im menschlichen Körper vorkommt und an multiplen Prozessen beteiligt ist (Durrant & Hers, 2020; Ellis & Ma, 2019). So stellt der PI3-Kinase-Signalweg ein attraktives Ziel diverser Therapien dar, seine Komplexität und seine Omnipräsenz bringt jedoch einige Herausforderungen mit sich (Bheemanaboina, 2020). Trotz vieler offener Fragen und dem Bedarf an weiterer Forschung bringt dieser neue Therapieansatz viel Potential und Möglichkeiten mit sich (Vanhaesebroeck et al., 2010). Mit der Überwachung der Thrombozytenfunktion via durchflusszytometrischer Untersuchung der AKT-Kinase könnte zumindest das Risiko der Entwicklung einer Thrombozytenfunktionsstörung und damit Blutungskomplikationen solcher Therapien überwacht werden (Althaus et al., 2020). Des Weiteren kann diese Methode als Screeningmethode für das Ansprechen der PI3-Kinase-Inhibitoren dienen und damit potentiell ihre Anwendung bei verschiedenen Erkrankungen ermöglichen (Bheemanaboina, 2020), da vor allem Patienten mit Mutationen in diesem Signalweg auf eine Inhibition desselben ansprechen (Ellis & Ma, 2019). Durch ihre zentrale Stellung in der Signalweiterleitung verschiedener Zellen sind die Effekte der PI3-Kinase und somit auch ihrer Hemmung jedoch sehr vielfältig, sodass der

Einsatz selektiver Inhibitoren von Bedeutung ist. Neben der Hemmung spezifischer Isoformen der PI3-Kinase könnte vor allem die Hemmung nachgeschalteter Effektoren wie der AKT-Kinase zu einer höheren funktionellen Selektivität sowie einer zielgerichteteren Therapie führen (Durrant & Hers, 2020). Der PI3K/AKT-Signalweg stellt einen wichtigen Signalweg für Zellwachstum, -metabolismus, -überleben, -migration und -differenzierung dar, der bei vielen menschlichen Tumorarten dereguliert ist (Revathidevi & Munirajan, 2019; Uko et al., 2020). Damit dient die AKT-Kinase als attraktives Ziel für verschiedene Tumorerkrankungen. Mehrere Studien haben eine Korrelation zwischen der AKT-Aktivität und klinisch-pathologischen Kriterien wie Tumorstadium, Differenzierungsgrad und Prognose demonstriert (Uko et al., 2020). Ebenso haben sie gezeigt, dass die Verwendung von AKT-Inhibitoren zu einer Reduktion der Tumorpheriferation und damit in der Therapie von verschiedenen Tumorentitäten, beispielsweise bei Brustkrebs oder hämatologischen Krebserkrankungen zu vielversprechenden Ergebnissen führt (Bertacchini et al., 2015; Ellis & Ma, 2019; Uko et al., 2020). Die Inhibitoren stellen gerade bei Tumoren, die resistent gegenüber herkömmlichen Therapien sind, oder auch als Ergänzung synergistisch zu anderen Therapien eine neue Möglichkeit zur effektiveren Tumorthherapie dar (Hirai et al., 2010; Hua et al., 2021). Damit kommt dem Monitoring dieses Signalweges eine weitere wichtige Bedeutung zu, da so eine bessere Prognose für das Ansprechen solcher Therapien sowie ein Therapiemonitoring erfolgen könnte. Verschiedene Tumorarten sprechen unterschiedlich auf AKT-Inhibitoren an in Abhängigkeit vom Level der AKT-Phosphoproteine. So ist beispielsweise bei manchen Brustkrebsarten ein hohes Level an AKT-Phosphoprotein ein Marker für ein gutes Ansprechen von AKT-Inhibitoren, bei anderen Brustkrebsformen dagegen ein niedriges Level (Hua et al., 2021). Auch außerhalb der Behandlung von Tumoren kommt PI3-Kinase-Inhibitoren sowie AKT-Inhibitoren eine immer größere Bedeutung zu. Sie stellen beispielsweise auch für die Behandlung für Entzündungen wie Osteoarthritis eine potenzielle Therapieoption dar (Liu et al., 2019; Xue et al., 2017). Dies hebt die Bedeutung eines gezielten Monitorings der AKT-Kinase erneut hervor.

Thrombozyten stellen durch ihren weniger komplexen Aufbau als Tumorzellen und einem damit verbundenen geringeren Risiko für Komplikationen auch ein

potentielles eigenes therapeutisches Ziel für PI3-Kinase-Inhibitoren dar (Durrant & Hers, 2020). Sie führen, wie bereits in verschiedenen Experimenten gezeigt, zu einer signifikanten Inhibition der Thrombozytenaktivierung und haben so einen Effekt auf die Thrombusformation ohne die Hämostase zu beeinträchtigen oder das Blutungsrisiko zu erhöhen (Bheemanaboina, 2020; Durrant & Hers, 2020). Das könnte ein entscheidender Vorteil der PI3-Kinase-Inhibitoren sein, da der Einsatz der bislang existierenden Thrombozytenaggregationshemmer durch Blutungskomplikationen limitiert wird. Gerade in der Therapie von akuten Ereignissen wie Schlaganfällen und in der Herz-Thorax-Chirurgie könnte ihr Einsatz von großer Bedeutung sein, da Studien einen schnellen Wirkungseintritt, eine schnelle Normalisierung der Thrombozytenfunktion nach Beendigung der Infusion und damit ein geringes Blutungsrisiko zeigten (Nylander et al., 2012). Auch im Zusammenhang mit extrakorporalen Zirkulationssystemen, die zu einer Störung der Thrombozytenfunktion führen können, hat sich die Verwendung von PI3K-Inhibitoren als wertvoll erwiesen, sodass auch ein Einsatz in der kardiopulmonalen Bypasschirurgie oder bei Drug-Eluting-Stents möglich wäre, um Blutungskomplikationen sowie Thrombosen zu vermeiden (Bheemanaboina, 2020; Durrant & Hers, 2020; Jackson & Schoenwaelder, 2012). Außerdem ist die Wirkung einiger der bislang etablierten Medikamente wie beispielsweise Clopidogrel stark von dem individuellen Stoffwechsel des Patienten und verschiedenen CYP-Mutationen abhängig (Durrant & Hers, 2020). Intoleranzen gegen diese Medikamente schränken in einigen Fällen ihre Anwendung zusätzlich ein (Eisenreich & Rauch, 2011). Somit besteht ein Bedarf an neuen antithrombozytären Therapien, wobei die Hemmung der PI3-Kinase ein attraktives potentielles Ziel darstellt (Durrant & Hers, 2020). Neben der Thrombusformation ist die PI3-Kinase durch die Regulation wichtiger Zellfunktionen auch an Prozessen wie der Angiogenese oder der Genese der Atherosklerose, Hypertension, Herzinsuffizienz, Myokardinfarkten sowie Entzündungsprozessen beteiligt. Dies unterstreicht ihre Rolle im kardiovaskulären Bereich und kann von enormer klinischer Bedeutung sein (Bheemanaboina, 2020; Durrant & Hers, 2020; Eisenreich & Rauch, 2011). Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen bis heute eine der Haupttodesursachen weltweit dar, was den Bedarf an neuen Medikamenten und therapeutischen

Ansatzpunkten hervorhebt (Eisenreich & Rauch, 2011). Auch wenn für den breiten Einsatz der PI3K-Inhibitoren in der Klinik noch weitere Forschung und ein breiteres Verständnis wichtig sind, kommt ihnen schon jetzt ein immenses Potential zu (Eisenreich & Rauch, 2011). Auch im Zuge der weiteren Erforschung des PI3-Kinase-Signalweges kann die Analyse des Ausmaßes der pAKT-Phosphorylierung von Bedeutung sein, um den Signalweg besser zu verstehen und Vorhersagen über das Ansprechen und die Effekte der Medikamente treffen zu können.

Wie in Kapitel 1.2.3. dargestellt, interferieren sehr viele im klinischen Alltag standardmäßig angewandte Medikamente mit der Thrombozytenfunktion. Neben Medikamenten, die bekannterweise mit einem erhöhten Blutungsrisiko einhergehen, wie NSAIDs oder P2Y12-Inhibitoren, können auch viele weitere Standardtherapeutika wie Betablocker oder viele Antidepressiva die Thrombozytenfunktion beeinträchtigen, eine Wechselwirkung, die häufig verkannt wird (Konkle, 2011). Gerade bei der gleichzeitigen Gabe mehrerer Medikamente, die zu Interaktionen und einer potenziellen Beeinträchtigung der Thrombozytenfunktion führen können, kommt dem Monitoring des Aktivierungszustand von Thrombozyten als Indikator ihrer Funktion und Beeinträchtigung eine große Bedeutung zu. In diesem Kontext könnte die Messung des Phosphorylierungszustandes der AKT-Kinase von Bedeutung sein, da diese ein Maß für die Aktivierung von Thrombozyten darstellt und schnell, ohne die Notwendigkeit spezieller Gerinnungslabore, durchführbar ist.

Die spezifische Betrachtung eines weiteren Signalweges könnte auch als Ergänzung in der Diagnostik von Thrombozytopathien an Relevanz gewinnen, da bislang etablierte Diagnostikmethoden in einigen Fällen nicht ausreichende Ergebnisse liefern können (Lassila, 2016).

AKT-Inhibitoren stellen bei der Behandlung der ITP ebenfalls einen vielversprechenden Therapieansatz dar. Vor allem Patienten mit Anti-GPIIb-IX-Antikörpern zeigen einen stärkeren Abfall der Thrombozytenwerte und sprechen oft nicht gut auf die konventionellen Therapien wie auf eine Behandlung mit Steroiden, intravenös verabreichten IgG-Antikörpern oder die Splenektomie an. Chen et al.

zeigten in ihrer Studie, dass Anti-GPIIb $\alpha$ -Antikörper die AKT-Kinase aktivieren und so über die Aktivierung der Phosphodiesterase PDE3A und der damit verbundenen Inhibition der PKA zu einer AKT-vermittelten Induktion der Apoptose und Thrombozytenaktivierung führen (Chen et al., 2018). Die apoptotischen Thrombozyten werden durch eine Präsentation von Phosphatidylserin von Makrophagen in der Leber phagozytiert, was zu einer Elimination der Thrombozyten und einem daraus resultierenden Thrombozytenabfall führt. Die Inhibierung oder genetische Ablation der AKT-Kinase beziehungsweise die Ausschaltung des durch sie induzierten Signalweges verhindert die Elimination der Thrombozyten. Damit stellt die Inhibition der AKT-Kinase ein therapeutisches Ziel in der Behandlung der ITP vermittelt durch Anti-GPIIb $\alpha$ -Antikörper dar (Chen et al., 2018). Diese Erkenntnisse unterstreichen erneut die Relevanz einer Methode für das Monitoring der AKT-Kinase und ihres Aktivierungsgrades.

Der klinische Teil meiner Arbeit demonstriert, dass die Inkubation von Thrombozyten mit HIT-Seren von Patienten mit vorher diagnostizierter klinisch relevanter HIT zu einem signifikanten Anstieg der AKT-Phosphorylierung im Vergleich zu einer Inkubation mit HIT-negativen Seren führt. Damit stellt die durchflusszytometrische Messung der AKT-Phosphorylierung eine potenzielle Diagnostikmethode zur Detektion einer klinisch relevanten HIT dar. Gerade weil die Diagnostik der HIT oftmals immer noch eine Herausforderung darstellt (Nagler & Bakchoul, 2016), kommt der Etablierung weiterer Methoden eine große Bedeutung zu. Zwar existieren bereits einige Tests und Scoringssysteme, jedoch haben Tests wie der 4-T-Score eine hohe Interobserver-Variabilität und die Immunoassays einen niedrigen positiven prädiktiven Wert sowie eine eingeschränkte Verfügbarkeit. Funktionelle Tests zur Bestätigung wie der HIPA oder SRA, die den aktuellen diagnostischen Goldstandard darstellen, sind bislang hochspezialisierten Laboren mit ausreichend Expertise vorbehalten. Da jedoch sowohl eine falsch-negative als auch eine falsch-positive Diagnostik fatale klinische Konsequenzen haben kann, ist eine akkurate Diagnosestellung von enormer klinischer Relevanz. (Nagler & Bakchoul, 2016). Funktionelle Tests sind zur Beurteilung der Aktivität neben den Enzymimmunoassays für den Nachweis von Anti-Heparin/PF4-Antikörpern in der Diagnostik essenziell (Zeleznik et al., 2021), allerdings weisen

sowohl der SRA als auch der HIPA Einschränkungen auf. Neben der geringen Verfügbarkeit stellt bei dem SRA die Verwendung von radioaktivem Material sowie die komplexe Handhabung ein Problem dar. Der HIPA erfordert ausreichend Expertise und strikte Kontrollmessungen, um verlässliche Ergebnisse zu erhalten (Poley & Mempel, 2001). Des Weiteren sind die funktionellen Tests zeitaufwändig, teuer und nicht rund um die Uhr verfügbar (Nagler & Bakchoul, 2016). Außerdem benötigen diese funktionellen Tests gewaschene Thrombozyten, deren Herstellung jedoch aufwändig ist und durch Isolationsprozesse zu einer Voraktivierung der Thrombozyten führen kann (Greinacher et al., 1994; Kerényi et al., 2017). Durchflusszytometrische Messungen haben den Vorteil, dass sie schneller durchführbar sowie kosteneffizienter sind, zusätzlich können mehrere Proben gleichzeitig getestet werden. Bislang wurden bereits durchflusszytometrische Tests durchgeführt, die auf der Messung der Aktivierungsmarker CD62P oder Annexin V basieren (Poley & Mempel, 2001). Diese Tests zeigten eine hohe Sensitivität und Spezifität sowie eine gute Vergleichbarkeit mit dem SRA und dem HIPA. Zudem zeigte sich eine Assoziation mit dem Auftreten klinischer Ereignisse wie Thrombosen, was ihre Eignung als funktionelle Tests für die Diagnose der HIT demonstriert (Kerényi et al., 2017; Poley & Mempel, 2001; Tomer, 1997). Da die durchflusszytometrische Messung der pAKT-Expression sowohl mit dem 4-T-Score als auch mit der optischen Dichte im ELISA korreliert, welche wiederum einen Zusammenhang mit dem Auftreten positiver Ergebnisse in funktionellen Tests sowie klinischen Manifestationen aufweisen (Kerényi et al., 2017; Kim et al., 2011; Tomer, 1997; Warkentin et al., 2008; Zeleznik et al., 2021; Zwicker et al., 2004), scheint auch die Messung des pAKT-Anteils geeignet als funktionelle Testalternative für die Diagnostik einer HIT.

Dadurch, dass mittels Darstellung des Phosphorylierungsgrades der AKT-Kinase der Aktivierungszustand von Thrombozyten beurteilt werden kann, kann der Methode auch bei der Identifizierung von Subgruppen mit einem hohen Risiko für Thrombose sowie in der Schweregradbeurteilung der HIT eine enorme Bedeutung zukommen. So zeigten in der von Pelzl et al. beschriebenen Arbeit kritisch kranke Patienten eine signifikant höhere AKT-Phosphorylierung, die mit einer höheren Rate an Thrombosen einhergeht (Pelzl et al., 2022). Die bislang etablierten

Goldstandards stellen funktionelle Tests dar, die das Maß der Aggregation oder die Serotoninfreisetzung nach Zugabe von HIT-Seren beurteilen. Nicht jeder Patient mit einem positiven HIPA-Test hat jedoch auch eine klinisch relevante HIT (Warkentin, 2011). Eine genauere Unterscheidung ist jedoch von großer Bedeutung, da, wie oben schon beschrieben, die Diagnose einer HIT erhebliche Konsequenzen für den Patienten hat. Hier könnte die durchflusszytometrische Methode durch die Beurteilbarkeit des Ausmaßes der Aktivierung von Thrombozyten eine potenzielle Erweiterung der Diagnostik mit besserer Aussagekraft bezüglich der klinischen Folgen darstellen.

Dass HIT-Antikörper zu einer Aktivierung der AKT-Kinase führen, wurde in dieser Arbeit demonstriert, ebenso, dass eine AKT-Inhibition zu einer verminderten Phosphorylierung der AKT-Kinase unter Inkubation mit aktivierenden HIT-Antikörpern führt. Dies demonstriert die Beteiligung der AKT-Kinase am Pathomechanismus der HIT und könnte, ähnlich wie bei COVID-19 oder der ITP, als potenzielles Therapieziel für weitere Behandlungsmethoden der HIT dienen (Chen et al., 2018; Pelzl et al., 2022). Studien zeigen, dass MAP4K4-Inhibitoren potenziell in der Lage sind, vaskuläre Ereignisse wie Thrombosen und Embolien zu reduzieren, indem sie die agonisteninduzierte Thrombozytenaggregation, Thromboxanproduktion und Integrinaktivierung durch eine Aktivierung des cAMP-Signalweges und Inhibierung des PI3K/AKT-Pathways abschwächen (Nam et al., 2021). Auch Ginseng (*Panax ginseng*) zeigt durch die enthaltenen Ginsenoside einen kardioprotektiven und antithrombozytären Effekt, der auf einer Hemmung der Thrombozytenaktivierung durch Inhibierung der Granulasekretion, der Integrinaktivierung, des MAPK-Signalweges sowie des PI3K/AKT-Signalweges beruht. Damit ergibt sich ein enormes therapeutisches Potential für die Behandlung von thrombozytenassoziierten kardiovaskulären Erkrankungen (Irfan et al., 2018). Diese aussagekräftigen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass bei antikörpervermittelten thrombozytären Erkrankungen ein Einsatz dieser oder anderer Substanzen, die die genannten Signalwege inhibieren, zu vielversprechenden Resultaten führen könnte.

#### **4.4 Schlussfolgerung**

Als Fazit dieser Arbeit lässt sich ziehen, dass die durchflusszytometrische Messung des phosphorylierten Anteils der AKT-Kinase eine geeignete Methode ist, um den Aktivierungszustand von Thrombozyten zu beurteilen. Sie stellt eine attraktive, potenzielle alternative oder ergänzende Methode in der Diagnostik von Thrombozytenfunktionsstörungen dar durch die Vorteile einer schnellen, einfachen Durchführbarkeit, einer Fixierbarkeit und dem Auskommen mit geringen Blutvolumina. Dadurch, dass die Messung einen gezielten Schritt in einem für die Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten essenziellen Signalweg untersucht, könnte sie gerade hinsichtlich der Diagnose von Signaltransduktionsstörungen sehr hilfreich sein. Durch den Bedeutungsgewinn von spezifischen Kinase-Inhibitoren in der Therapie verschiedener Erkrankungen wie Tumoren, Entzündungskrankheiten, Thrombosen oder kardiovaskulären Erkrankungen in der Forschung und auch in der Klinik kommt der Überwachung der Aktivität der AKT-Kinase eine immer wichtigere Rolle zu. Die durchflusszytometrische Messung ihres Aktivierungszustandes kann für eine Prognose des Therapieansprechens sowie für ein Monitoring der Therapie und eine Überwachung von Nebenwirkungen relevant sein. Auch das Überwachen der Wirkungen anderer ubiquitär eingesetzter Medikamente mit potenziellen Wirkungen auf die Thrombozytenfunktion kann ein weiteres mögliches Einsatzgebiet der in dieser Arbeit beschriebenen Methode sein. Da beim Pathomechanismus antikörpervermittelter Erkrankungen wie der HIT oder ITP der PI3K/AKT-Signalweg eine entscheidende Rolle spielt, könnte die FACS-Analyse des prozentualen Anteils der pAKT-Kinase sowohl als erweiterte Diagnostikmethode als auch bei der Überwachung neuer, zielgerichteter Therapien Anwendung finden.

Damit präsentiert sich die im Rahmen dieser Dissertation beschriebene Methode der durchflusszytometrischen Analyse des Phosphorylierungsgrades der AKT-Kinase als vielversprechende neue Methode zur Detektion der Thrombozytenfunktion. Es bedarf noch weiterer Forschungsarbeit und einer breiteren klinischen Testung, um genauere Aussagen treffen zu können, jedoch lässt sich ein großes Potential in diversen klinischen Anwendungen prognostizieren, was zu wichtigen wissenschaftlichen Fortschritten beitragen könnte.

## 5 Zusammenfassung

Die Diagnose von Thrombozytenfunktionsstörungen stellt aktuell immer noch eine Herausforderung dar. Gründe hierfür sind, dass die zugrundeliegenden Ursachen sehr heterogen sein können, außerdem sind die bisherigen Standardmethoden wie die Lichttransmissionsaggregometrie mitunter sehr zeit- und kostenintensiv. Ihre Verfügbarkeit ist bislang nur auf Speziallabore begrenzt und sie erfordern oftmals größere Blutvolumina, was gerade bei der Diagnostik von Defekten bei Kindern ein Problem darstellt. Diese Arbeit fokussiert sich auf die durchflusszytometrische Untersuchung der AKT-Kinase, einer Kinase mit essenzieller Bedeutung für die Thrombozytenaktivierung, -aggregation und Thrombusstabilisation. Mittels Testung mehrerer Agonisten wurde eruiert, ob die Methode valide ist für die Beurteilung des Aktivierungszustandes von Thrombozyten. Dazu wurde PRP aus Citratblut gesunder Spender hergestellt und mit verschiedenen Agonisten inkubiert. Nach der Aktivierung durch diese wurde die Expression der phosphorylierten Form der AKT-Kinase sichtbar gemacht durch Antikörper, die spezifisch an pAKT binden, und mittels Durchflusszytometer gemessen. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Anteils der pAKT bei allen Agonisten verglichen mit einer Pufferkontrolle, die den nicht-aktivierten Zustand repräsentierte. Eine Hemmung der AKT-Kinase reduzierte den Effekt signifikant. Um zu bestätigen, dass die Messung der pAKT-Kinase den Aktivierungszustand von Thrombozyten abbildet, wurden die Messungen ebenfalls mit Standardmethoden wie der durchflusszytometrischen Messung der CD62P-Expression, der Vollblutaggregometrie sowie dem Westernblot durchgeführt. Diese zeigten ähnliche Ergebnisse: Es kam zu einer Aktivierung der Thrombozyten durch die Agonisten, welche durch eine Präinkubation mit AKT-Inhibitor gehemmt wurde.

Im zweiten Teil wurden IgG-Antikörper aus zuvor mittels HIPA getesteten HIT-Patientenseren isoliert und mit Thrombozyten gesunder Spender unter Zugabe verschiedener Konzentrationen an Heparin inkubiert, um den Einfluss der HIT-IgG auf die Aktivität der AKT-Kinase zu untersuchen. Unter dem gering konzentrierten Heparin (0,3 U/l) kam es zu einem signifikant höheren Anstieg des pAKT-Anteils nach Zugabe von HIPA-positiven IgG im Vergleich zu HIPA-negativen IgG sowie IgG aus AB-Seren gesunder Spender. Das zeigt, dass die bei

einer HIT vorhandenen Antikörpern gegen Heparin und PF4 zu einer AKT-vermittelten Aktivierung von Thrombozyten führen, was entscheidend zur Pathogenese beiträgt.

Im Zuge dieser Arbeit konnte also bestätigt werden, dass durchflusszytometrisch die Aktivierung des AKT-Signalweges dargestellt werden kann und die durchflusszytometrische Messung des Phosphorylierungsgrades der AKT-Kinase eine weitere Methode für die Detektion des Aktivierungszustandes von Thrombozyten repräsentiert. Zwar wurden die Experimente mit einer geringen Anzahl an Spendern/Patienten durchgeführt, was die Aussagekraft einschränkt und weiterer Validierung bedarf, jedoch zeigen die Ergebnisse eine klare, erfolgsversprechende Tendenz. Damit könnte die Methode eine potenzielle Erweiterung des bislang existierenden Kontingentes an Untersuchungsmethoden für Thrombozytendefekte darstellen mit entscheidenden Vorteilen wie ihrer einfachen Durchführbarkeit, der Möglichkeit der Fixierung und dem Bedarf an nur geringen Blutvolumina.

Durch den immer breiteren Einsatz von PI3-Kinase- sowie AKT-Inhibitoren auf verschiedenen Gebieten wie beispielsweise der Onkologie gewinnt die Analyse dieses Signalweges eine große Bedeutung. Das ubiquitäre Vorkommen der Kinase und ihre Inhibition im Zuge verschiedener neuer Therapieansätze sind mit einem breiten Spektrum an Nebenwirkungen verbunden, unter anderem Thrombozytenfunktionsstörungen und Blutungskomplikationen, sodass ein Monitoring dieses Signalweges in Thrombozyten wichtig ist. Gleichzeitig kann die Darstellung des Aktivierungszustandes der AKT-Kinase prognostische Bedeutung für das Ansprechen von Therapien haben. Darüber hinaus haben viele weitere Medikamente einen Einfluss auf die Thrombozytenfunktion, sodass auch in diesem Kontext eine Überwachung des Aktivierungsgrades bedeutend ist. Zudem kann die gezielte AKT-Inhibition in Thrombozyten einen möglichen Angriffspunkt bei verschiedenen Antikörper-vermittelten Erkrankungen sowie eine Ergänzung der bisher existierenden antithrombotischen Therapien darstellen. Resümierend zeigt sich also ein breites potenzielles Einsatzgebiet der in dieser Arbeit präsentierten Methode, die mithilfe weiterer Forschungsarbeiten im klinischen Alltag Einzug halten und so zu vielen Fortschritten führen könnte.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163-176.  
<https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>
- Althaus, K., Faul, C., & Bakchoul, T. (2021). New Developments in the Pathophysiology and Management of Primary Immune Thrombocytopenia. *Hamostaseologie*, 41(4), 275-282.  
<https://doi.org/10.1055/a-1311-8264>
- Althaus, K., Najm, J., & Greinacher, A. (2011). MYH9 related platelet disorders - often unknown and misdiagnosed. *Klin Padiatr*, 223(3), 120-125.  
<https://doi.org/10.1055/s-0031-1275664>
- Althaus, K., Wagner, M., & Bakchoul, T. (2019). The Diagnosis of Platelet Function Disorders - A Challenge in the Laboratory. *Transfusionsmedizin*, 9(2), 96-108. <https://doi.org/10.1055/a-0626-6467>
- Althaus, K., Wagner, M., Marini, I., Bakchoul, T., & Pelzl, L. (2020). Flow Cytometric Assessment of AKT Signaling in Platelet Activation: An Alternative Diagnostic Tool for Small Volumes of Blood. *Hamostaseologie*, 40(S 01), S21-S25. <https://doi.org/10.1055/a-1282-1989>
- Amiral, J., Bridey, F., Dreyfus, M., Vissoc, A. M., Fressinaud, E., Wolf, M., & Meyer, D. (1992). Platelet factor 4 complexed to heparin is the target for antibodies generated in heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost*, 68(1), 95-96.
- Amiral, J., Bridey, F., Wolf, M., Boyer-Neumann, C., Fressinaud, E., Vissac, A. M., Peynaud-Debayle, E., Dreyfus, M., & Meyer, D. (1995). Antibodies to macromolecular platelet factor 4-heparin complexes in heparin-induced thrombocytopenia: a study of 44 cases. *Thromb Haemost*, 73(1), 21-28.
- Amiral, J., Marfaing-Koka, A., Wolf, M., Alessi, M. C., Tardy, B., Boyer-Neumann, C., Vissac, A. M., Fressinaud, E., Poncz, M., & Meyer, D. (1996). Presence of autoantibodies to interleukin-8 or neutrophil-activating peptide-2 in patients with heparin-associated thrombocytopenia. *Blood*, 88(2), 410-416.
- Andres, O., Henning, K., Strauß, G., Pflug, A., Manukjan, G., & Schulze, H. (2018). Diagnosis of platelet function disorders: A standardized, rational, and modular flow cytometric approach. *Platelets*, 29(4), 347-356.  
<https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1386297>
- Bakchoul, T. (2016). An update on heparin-induced thrombocytopenia: diagnosis and management. *Expert Opin Drug Saf*, 15(6), 787-797.  
<https://doi.org/10.1517/14740338.2016.1165667>
- Bakchoul, T., & Hinz, A. (2017). Diagnostik von angeborenen und erworbenen Thrombozyten-Erkrankungen. *Hämotherapie*, 28/2017
- Bakchoul, T., & Marini, I. (2018). Drug-associated thrombocytopenia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2018(1), 576-583.  
<https://doi.org/10.1182/asheducation-2018.1.576>

- Baker, R. I., & O'Donnell, J. S. (2021). How I treat bleeding disorder of unknown cause. *Blood*, *138*(19), 1795-1804.  
<https://doi.org/10.1182/blood.2020010038>
- Balduini, C. L., Cattaneo, M., Fabris, F., Gresele, P., Iolascon, A., Pulcinelli, F. M., Savoia, A., & Italian Gruppo di Studio delle, P. (2003). Inherited thrombocytopenias: a proposed diagnostic algorithm from the Italian Gruppo di Studio delle Piastrine. *Haematologica*, *88*(5), 582-592.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12745278>
- Balduini, C. L., Pecci, A., & Noris, P. (2012). Inherited thrombocytopenias: the evolving spectrum. *Hamostaseologie*, *32*(4), 259-270.  
<https://doi.org/10.5482/ha12050001>
- Ballmaier, M., Balduini, C., Welte, K., & Germeshausen, M. (2006). Erbliche bedingte Thrombozytopenien. *Monatsschrift Kinderheilkunde*, *154*(6), 510-521. <https://doi.org/10.1007/s00112-006-1346-z>
- Bertacchini, J., Heidari, N., Mediani, L., Capitani, S., Shahjahani, M., Ahmadzadeh, A., & Saki, N. (2015). Targeting PI3K/AKT/mTOR network for treatment of leukemia. *Cell Mol Life Sci*, *72*(12), 2337-2347.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-015-1867-5>
- Bheemanaboina, R. R. Y. (2020). Isoform-Selective PI3K Inhibitors for Various Diseases. *Curr Top Med Chem*, *20*(12), 1074-1092.  
<https://doi.org/10.2174/1568026620666200106141717>
- Boender, J., Kruij, M. J. H. A., & Leebeek, F. W. G. (2016). A diagnostic approach to mild bleeding disorders. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *14*(8), 1507-1516.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jth.13368>
- Born, G. V. (1962). Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*, *194*, 927-929. <https://doi.org/10.1038/194927b0>
- Bourguignon, A., Tasneem, S., & Hayward, C. P. (2022). Screening and diagnosis of inherited platelet disorders. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, *59*(6), 405-444.  
<https://doi.org/10.1080/10408363.2022.2049199>
- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, *112*(2), 195-203.  
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90281-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5)
- Bye, A. P., Unsworth, A. J., & Gibbins, J. M. (2016). Platelet signaling: a complex interplay between inhibitory and activatory networks. *J Thromb Haemost*, *14*(5), 918-930. <https://doi.org/10.1111/jth.13302>
- Chen, J., De, S., Damron, D. S., Chen, W. S., Hay, N., & Byzova, T. V. (2004). Impaired platelet responses to thrombin and collagen in AKT-1-deficient mice. *Blood*, *104*(6), 1703-1710. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-10-3428>
- Chen, M., Yan, R., Zhou, K., Li, X., Zhang, Y., Liu, C., Jiang, M., Ye, H., Meng, X., Pang, N., Zhao, L., Liu, J., Xiao, W., Hu, R., Cui, Q., Zhong, W., Zhao, Y., Zhu, M., Lin, A., . . . Dai, K. (2018). Akt-mediated platelet apoptosis and its therapeutic implications in immune thrombocytopenia.

- Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(45), E10682-E10691.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1808217115>
- Chen, Z., Li, T., Kareem, K., Tran, D., Griffith, B. P., & Wu, Z. J. (2019). The role of PI3K/Akt signaling pathway in non-physiological shear stress-induced platelet activation. *Artif Organs*, 43(9), 897-908.  
<https://doi.org/10.1111/aor.13465>
- Cooper, N., & Ghanima, W. (2019). Immune Thrombocytopenia. *N Engl J Med*, 381(10), 945-955. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp1810479>
- Deutch, N., Broadbridge, E., Cunningham, L., & Liu, P. (1993). RUNX1 Familial Platelet Disorder with Associated Myeloid Malignancies. In M. P. Adam, G. M. Mirzaa, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, K. W. Gripp, & A. Amemiya (Eds.), *GeneReviews*(®). University of Washington, Seattle
- Copyright © 1993-2023, University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.
- Dovlatova, N., Lordkipanidze, M., Lowe, G. C., Dawood, B., May, J., Heptinstall, S., Watson, S. P., Fox, S. C., & Group, U. G. S. (2014). Evaluation of a whole blood remote platelet function test for the diagnosis of mild bleeding disorders. *J Thromb Haemost*, 12(5), 660-665.  
<https://doi.org/10.1111/jth.12555>
- Durrant, T. N., & Hers, I. (2020). PI3K inhibitors in thrombosis and cardiovascular disease. *Clin Transl Med*, 9(1), 8.  
<https://doi.org/10.1186/s40169-020-0261-6>
- Eisenreich, A., & Rauch, U. (2011). PI3K inhibitors in cardiovascular disease. *Cardiovasc Ther*, 29(1), 29-36. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5922.2010.00206.x>
- Ellis, H., & Ma, C. X. (2019). PI3K Inhibitors in Breast Cancer Therapy. *Curr Oncol Rep*, 21(12), 110. <https://doi.org/10.1007/s11912-019-0846-7>
- Estevez, B., & Du, X. (2017). New Concepts and Mechanisms of Platelet Activation Signaling. *Physiology (Bethesda)*, 32(2), 162-177.  
<https://doi.org/10.1152/physiol.00020.2016>
- Farm, M., Bakchoul, T., Frisk, T., Althaus, K., Odenrick, A., Norberg, E. M., Berndtsson, M., & Antovic, J. P. (2017). Evaluation of a diagnostic algorithm for Heparin-Induced Thrombocytopenia. *Thromb Res*, 152, 77-81. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2017.02.015>
- Flaumenhaft, R. (2013). Chapter 18 - Platelet Secretion. In A. D. Michelson (Ed.), *Platelets (Third Edition)* (pp. 343-366). Academic Press.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387837-3.00018-3>
- Frelinger, A. L., 3rd, Grace, R. F., Gerrits, A. J., Berny-Lang, M. A., Brown, T., Carmichael, S. L., Neufeld, E. J., & Michelson, A. D. (2015). Platelet function tests, independent of platelet count, are associated with bleeding severity in ITP. *Blood*, 126(7), 873-879.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2015-02-628461>
- Gothwal, M., Sandrock-Lang, K., & Zieger, B. (2014). Genetics of inherited platelet disorders. *Hamostaseologie*, 34(2), 133-141.  
<https://doi.org/10.5482/HAMO-13-09-0049>

- Greinacher, A. (2003). Heparininduzierte Thrombozytopenie. *Dtsch Arztebl International*, 100(34-35), 2220-  
<https://www.aerzteblatt.de/int/article.asp?id=38178>
- Greinacher, A., Alban, S., Omer-Adam, M. A., Weitschies, W., & Warkentin, T. E. (2008). Heparin-induced thrombocytopenia: a stoichiometry-based model to explain the differing immunogenicities of unfractionated heparin, low-molecular-weight heparin, and fondaparinux in different clinical settings. *Thromb Res*, 122(2), 211-220.  
<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2007.11.007>
- Greinacher, A., Amiral, J., Dummel, V., Vissac, A., Kiefel, V., & Mueller-Eckhardt, C. (1994). Laboratory diagnosis of heparin-associated thrombocytopenia and comparison of platelet aggregation test, heparin-induced platelet activation test, and platelet factor 4/heparin enzyme-linked immunosorbent assay. *Transfusion*, 34(5), 381-385.  
<https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1994.34594249047.x>
- Greinacher, A., Michels, I., Kiefel, V., & Mueller-Eckhardt, C. (1991). A rapid and sensitive test for diagnosing heparin-associated thrombocytopenia. *Thromb Haemost*, 66(6), 734-736.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1796420>
- Greinacher, A., Pecci, A., Kunishima, S., Althaus, K., Nurden, P., Balduini, C. L., & Bakchoul, T. (2017). Diagnosis of inherited platelet disorders on a blood smear: a tool to facilitate worldwide diagnosis of platelet disorders. *J Thromb Haemost*, 15(7), 1511-1521. <https://doi.org/10.1111/jth.13729>
- Gremmel, T., Frelinger, A. L., 3rd, & Michelson, A. D. (2016). Platelet Physiology. *Semin Thromb Hemost*, 42(3), 191-204.  
<https://doi.org/10.1055/s-0035-1564835>
- Gross, L., Aradi, D., & Sibbing, D. (2016). Platelet Function Testing in Patients on Antiplatelet Medications. *Semin Thromb Hemost*, 42(3), 306-320.  
<https://doi.org/10.1055/s-0035-1570083>
- Guidetti, G. F., Canobbio, I., & Torti, M. (2015). PI3K/Akt in platelet integrin signaling and implications in thrombosis. *Adv Biol Regul*, 59, 36-52.  
<https://doi.org/10.1016/j.jbior.2015.06.001>
- Hach-Wunderle, V. (2012). Physiologie und Pathophysiologie des Gerinnungssystems. In E. S. Debus & W. Gross-Fengels (Eds.), *Operative und interventionelle Gefäßmedizin* (pp. 81-96). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-01709-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-01709-4_4)
- Hidiatov, O., Gaupp, A., Marini, I., Pelzl, L., Wagner, M., Rigoni, F., Witzemann, A., Haberle, H., Martus, P., Ngamsri, K. C., Konrad, F. M., Rosenberger, P., Straub, A., Bakchoul, T., & Althaus, K. (2023). Characterization of Shear Stress Mediated Platelet Dysfunction: Data from an Ex Vivo Model for Extracorporeal Circulation and a Prospective Clinical Study. *Thromb Haemost*. <https://doi.org/10.1055/a-1988-3174>
- Hirai, H., Sootome, H., Nakatsuru, Y., Miyama, K., Taguchi, S., Tsujioka, K., Ueno, Y., Hatch, H., Majumder, P. K., Pan, B. S., & Kotani, H. (2010). MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*, 9(7), 1956-1967.  
<https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-1012>

- Hirsch, E., Bosco, O., Tropel, P., Laffargue, M., Calvez, R., Altruda, F., Wymann, M. P., & Montrucchio, G. (2001). Resistance to thromboembolism in PI3Ky-deficient mice. *The FASEB Journal*, *15*(11), 2019-2021. <https://doi.org/https://doi.org/10.1096/fj.00-0810fje>
- Hua, H., Zhang, H., Chen, J., Wang, J., Liu, J., & Jiang, Y. (2021). Targeting Akt in cancer for precision therapy. *J Hematol Oncol*, *14*(1), 128. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01137-8>
- Hvas, A.-M., & Favaloro, E. J. (2017). Platelet Function Analyzed by Light Transmission Aggregometry. In E. J. Favaloro & G. Lippi (Eds.), *Hemostasis and Thrombosis: Methods and Protocols* (pp. 321-331). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7196-1\\_25](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7196-1_25)
- Hvas, A. M., & Grove, E. L. (2017). Platelet Function Tests: Preanalytical Variables, Clinical Utility, Advantages, and Disadvantages. *Methods Mol Biol*, *1646*, 305-320. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7196-1\\_24](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7196-1_24)
- Irfan, M., Jeong, D., Kwon, H. W., Shin, J. H., Park, S. J., Kwak, D., Kim, T. H., Lee, D. H., Park, H. J., & Rhee, M. H. (2018). Ginsenoside-Rp3 inhibits platelet activation and thrombus formation by regulating MAPK and cyclic nucleotide signaling. *Vascul Pharmacol*, *109*, 45-55. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2018.06.002>
- Israels, S. J., Kahr, W. H., Blanchette, V. S., Luban, N. L., Rivard, G. E., & Rand, M. L. (2011). Platelet disorders in children: A diagnostic approach. *Pediatr Blood Cancer*, *56*(6), 975-983. <https://doi.org/10.1002/pbc.22988>
- Jackson, S. P., & Schoenwaelder, S. M. (2012). Antithrombotic phosphoinositide 3-kinase  $\beta$  inhibitors in humans: a 'shear' delight! *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *10*(10), 2123-2126. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2012.04912.x>
- Jurk, K. (2015). Analysis of platelet function and dysfunction. *Hamostaseologie*, *35*(1), 60-72. <https://doi.org/10.5482/HAMO-14-09-0047>
- Jurk, K., & Kehrel, B. E. (2005). Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost*, *31*(4), 381-392. <https://doi.org/10.1055/s-2005-916671>
- Jurk, K., & Walter, U. (2019). New Insights into Platelet Signalling Pathways by Functional and Proteomic Approaches. *Hamostaseologie*, *39*(2), 140-151. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1675356>
- Kerényi, A., Beke Debreceni, I., Oláh, Z., Ilonczai, P., Bereczky, Z., Nagy, B., Jr., Muszbek, L., & Kappelmayer, J. (2017). Evaluation of flow cytometric HIT assays in relation to an IgG-Specific immunoassay and clinical outcome. *Cytometry B Clin Cytom*, *92*(5), 389-397. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21362>
- Kim, S., Jin, J., & Kunapuli, S. P. (2006). Relative contribution of G-protein-coupled pathways to protease-activated receptor-mediated Akt phosphorylation in platelets. *Blood*, *107*(3), 947-954. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-3040>
- Kim, S. Y., Kim, H. K., Han, K. S., Kim, I., Yoon, S. S., Park, S., & Kim, B. K. (2011). Utility of ELISA optical density values and clinical scores for the diagnosis of and thrombosis prediction in heparin-induced thrombocytopenia. *Korean J Lab Med*, *31*(1), 1-8. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2011.31.1.1>

- Konkle, B. A. (2011). Acquired disorders of platelet function. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011, 391-396.  
<https://doi.org/10.1182/asheducation-2011.1.391>
- Lassila, R. (2016). Platelet Function Tests in Bleeding Disorders. *Semin Thromb Hemost*, 42(3), 185-190. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1571307>
- Latger-Cannard, V., Philippe, C., Bouquet, A., Baccini, V., Alessi, M. C., Ankri, A., Bauters, A., Bayart, S., Cornillet-Lefebvre, P., Daliphard, S., Mozziconacci, M. J., Renneville, A., Ballerini, P., Leverger, G., Sobol, H., Jonveaux, P., Preudhomme, C., Nurden, P., Lecompte, T., & Favier, R. (2016). Haematological spectrum and genotype-phenotype correlations in nine unrelated families with RUNX1 mutations from the French network on inherited platelet disorders. *Orphanet J Rare Dis*, 11, 49.  
<https://doi.org/10.1186/s13023-016-0432-0>
- Laurent, P. A., Severin, S., Gratacap, M. P., & Payrastre, B. (2014). Class I PI 3-kinases signaling in platelet activation and thrombosis: PDK1/Akt/GSK3 axis and impact of PTEN and SHIP1. *Adv Biol Regul*, 54, 162-174. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2013.09.006>
- Li, A., Kang, X., Edelman, F., & Waclawik, A. J. (2019). Stormorken Syndrome: A Rare Cause of Myopathy With Tubular Aggregates and Dystrophic Features. *Journal of Child Neurology*, 34(6), 321-324.  
<https://doi.org/10.1177/0883073819829389>
- Li, Z., Delaney, M. K., O'Brien, K. A., & Du, X. (2010). Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30(12), 2341-2349. <https://doi.org/10.1161/atvbaha.110.207522>
- Liu, S., Cao, C., Zhang, Y., Liu, G., Ren, W., Ye, Y., & Sun, T. (2019). PI3K/Akt inhibitor partly decreases TNF-alpha-induced activation of fibroblast-like synoviocytes in osteoarthritis. *J Orthop Surg Res*, 14(1), 425.  
<https://doi.org/10.1186/s13018-019-1394-4>
- Lordkipanidze, M. (2016). Platelet Function Tests. *Semin Thromb Hemost*, 42(3), 258-267. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1564834>
- Mandy, F. F., Bergeron, M., & Minkus, T. (1995). Principles of flow cytometry. *Transfus Sci*, 16(4), 303-314.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10159501>
- Marini, I., Uzun, G., Jamal, K., & Bakchoul, T. (2022). Treatment of drug-induced immune thrombocytopenias. *Haematologica*, 107(6), 1264-1277.  
<https://doi.org/10.3324/haematol.2021.279484>
- McKinnon, K. M. (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*, 120, 5 1 1-5 1 11. <https://doi.org/10.1002/cpim.40>
- Meng, D., Luo, M., & Liu, B. (2021). The Role of CLEC-2 and Its Ligands in Thromboinflammation. *Front Immunol*, 12, 688643.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.688643>
- Michelson, A. D. (2006). Evaluation Of Platelet Function By Flow Cytometry. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, 35(1-2), 67-82.  
<https://doi.org/10.1159/000093547>
- Morello, F., Perino, A., & Hirsch, E. (2008). Phosphoinositide 3-kinase signalling in the vascular system. *Cardiovascular research*, 82, 261-271.  
<https://doi.org/10.1093/cvr/cvn325>

- Moroi, A. J., & Watson, S. P. (2015). Impact of the PI3-kinase/Akt pathway on ITAM and hemITAM receptors: haemostasis, platelet activation and antithrombotic therapy. *Biochem Pharmacol*, *94*(3), 186-194. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.02.004>
- Nagler, M., & Bakchoul, T. (2016). Clinical and laboratory tests for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Thromb Haemost*, *116*(5), 823-834. <https://doi.org/10.1160/TH16-03-0240>
- Nam, G. S., Kim, S., Kwon, Y. S., Kim, M. K., & Nam, K. S. (2021). A new function for MAP4K4 inhibitors during platelet aggregation and platelet-mediated clot retraction. *Biochem Pharmacol*, *188*, 114519. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114519>
- Navred, K., Martin, M., Ekdahl, L., Zetterberg, E., Andersson, N. G., Strandberg, K., & Norstrom, E. (2019). A simplified flow cytometric method for detection of inherited platelet disorders-A comparison to the gold standard light transmission aggregometry. *PLoS One*, *14*(1), e0211130. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211130>
- Nylander, S., Kull, B., Björkman, J. A., Ulvinge, J. C., Oakes, N., Emanuelsson, B. M., Andersson, M., Skärby, T., Inghardt, T., Fjellström, O., & Gustafsson, D. (2012). Human target validation of phosphoinositide 3-kinase (PI3K) $\beta$ : effects on platelets and insulin sensitivity, using AZD6482 a novel PI3K $\beta$  inhibitor. *J Thromb Haemost*, *10*(10), 2127-2136. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2012.04898.x>
- O'Brien, K. A., Stojanovic-Terpo, A., Hay, N., & Du, X. (2011). An important role for Akt3 in platelet activation and thrombosis. *Blood*, *118*(15), 4215-4223. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-323204>
- Olas, B. (2018). Dietary Supplements with Antiplatelet Activity: A Solution for Everyone? *Adv Nutr*, *9*(1), 51-57. <https://doi.org/10.1093/advances/nmx014>
- Paniccia, R., Priora, R., Liotta, A. A., & Abbate, R. (2015). Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag*, *11*, 133-148. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S44469>
- Pecci, A., & Balduini, C. L. (2021). Inherited thrombocytopenias: an updated guide for clinicians. *Blood Rev*, *48*, 100784. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2020.100784>
- Pelzl, L., Singh, A., Funk, J., Witzemann, A., Marini, I., Zlamal, J., Weich, K., Abou-Khalel, W., Hammer, S., Uzun, G., Althaus, K., & Bakchoul, T. (2022). Antibody-mediated procoagulant platelet formation in COVID-19 is AKT dependent. *J Thromb Haemost*, *20*(2), 387-398. <https://doi.org/10.1111/jth.15587>
- Poley, S., & Mempel, W. (2001). Laboratory diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia: advantages of a functional flow cytometric test in comparison to the heparin-induced platelet-activation test. *Eur J Haematol*, *66*(4), 253-262. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0609.2001.066004253.x>
- Politz, O., Siegel, F., Bärfacker, L., Bömer, U., Hägebarth, A., Scott, W. J., Michels, M., Ince, S., Neuhaus, R., Meyer, K., Fernández-Montalván, A. E., Liu, N., von Nussbaum, F., Mumberg, D., & Ziegelbauer, K. (2017). BAY 1125976, a selective allosteric AKT1/2 inhibitor, exhibits high

- efficacy on AKT signaling-dependent tumor growth in mouse models [https://doi.org/10.1002/ijc.30457]. *International Journal of Cancer*, 140(2), 449-459. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ijc.30457
- Reid, V. L., & Webster, N. R. (2012). Role of microparticles in sepsis. *Br J Anaesth*, 109(4), 503-513. https://doi.org/10.1093/bja/aes321
- Revathidevi, S., & Munirajan, A. K. (2019). Akt in cancer: Mediator and more. *Semin Cancer Biol*, 59, 80-91. https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.06.002
- Ribes, A., Oprescu, A., Viaud, J., Hnia, K., Chicanne, G., Xuereb, J. M., Severin, S., Gratacap, M. P., & Payrastre, B. (2020). Phosphoinositide 3-kinases in platelets, thrombosis and therapeutics. *Biochem J*, 477(22), 4327-4342. https://doi.org/10.1042/bcj20190402
- Rosa, J. P., Raslova, H., & Bryckaert, M. (2019). Filamin A: key actor in platelet biology. *Blood*, 134(16), 1279-1288. https://doi.org/10.1182/blood.2019000014
- Rubak, P., Nissen, P. H., Kristensen, S. D., & Hvas, A. M. (2016). Investigation of platelet function and platelet disorders using flow cytometry. *Platelets*, 27(1), 66-74. https://doi.org/10.3109/09537104.2015.1032919
- Sandrock-Lang, K., Wentzell, R., Santoso, S., & Zieger, B. (2016). Inherited platelet disorders. *Hamostaseologie*, 36(3), 178-186. https://doi.org/10.5482/HAMO-14-11-0067
- Satta, N., Toti, F., Fressinaud, E., Meyer, D., & Freyssinet, J. M. (1997). Scott syndrome: an inherited defect of the procoagulant activity of platelets. *Platelets*, 8(2-3), 117-124. https://doi.org/10.1080/09537109709169326
- Saultier, P., Vidal, L., Canault, M., Bernot, D., Falaise, C., Pouymayou, C., Bordet, J. C., Saut, N., Rostan, A., Baccini, V., Peiretti, F., Favier, M., Lucca, P., Deleuze, J. F., Olasso, R., Boland, A., Morange, P. E., Gachet, C., Malergue, F., . . . Alessi, M. C. (2017). Macrothrombocytopenia and dense granule deficiency associated with FLI1 variants: ultrastructural and pathogenic features. *Haematologica*, 102(6), 1006-1016. https://doi.org/10.3324/haematol.2016.153577
- Scharf, R. E. (2012). Drugs that affect platelet function. *Semin Thromb Hemost*, 38(8), 865-883. https://doi.org/10.1055/s-0032-1328881
- Scharf, R. E. (2018a). Platelet Signaling in Primary Haemostasis and Arterial Thrombus Formation: Part 1. *Hamostaseologie*, 38(4), 203-210. https://doi.org/10.1055/s-0038-1675144
- Scharf, R. E. (2018b). Platelet Signaling in Primary Haemostasis and Arterial Thrombus Formation: Part 2. *Hamostaseologie*, 38(4), 211-222. https://doi.org/10.1055/s-0038-1675149
- Schlegelberger, B., & Heller, P. G. (2017). RUNX1 deficiency (familial platelet disorder with predisposition to myeloid leukemia, FPDMM). *Semin Hematol*, 54(2), 75-80. https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2017.04.006
- Singh, A., Uzun, G., & Bakchoul, T. (2021). Primary Immune Thrombocytopenia: Novel Insights into Pathophysiology and Disease Management. *J Clin Med*, 10(4). https://doi.org/10.3390/jcm10040789

- Songdej, N., & Rao, A. K. (2015). Hematopoietic transcription factor mutations and inherited platelet dysfunction. *F1000Prime Rep*, 7, 66. <https://doi.org/10.12703/p7-66>
- Stalker, T. J., Newman, D. K., Ma, P., Wannemacher, K. M., & Brass, L. F. (2012). Platelet signaling. *Handb Exp Pharmacol*(210), 59-85. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-29423-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-29423-5_3)
- Stegner, D., & Nieswandt, B. (2010). Platelet receptor signaling in thrombus formation. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 89, 109-121. <https://doi.org/10.1007/s00109-010-0691-5>
- Stojanovic, A., Marjanovic, J. A., Brovkovich, V. M., Peng, X., Hay, N., Skidgel, R. A., & Du, X. (2006). A Phosphoinositide 3-Kinase-AKT-Nitric Oxide-cGMP Signaling Pathway in Stimulating Platelet Secretion and Aggregation \*<sup><sup></sup></sup>. *Journal of Biological Chemistry*, 281(24), 16333-16339. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512378200>
- Thiele, T., Althaus, K., & Greinacher, A. (2010). Heparininduzierte Thrombozytopenie. *Der Internist*, 51(9), 1127-1135. <https://doi.org/10.1007/s00108-010-2594-5>
- Thomas, W., Downes, K., & Desborough, M. J. R. (2020). Bleeding of unknown cause and unclassified bleeding disorders; diagnosis, pathophysiology and management. *Haemophilia*, 26(6), 946-957. <https://doi.org/10.1111/hae.14174>
- Tomer, A. (1997). A sensitive and specific functional flow cytometric assay for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. *Br J Haematol*, 98(3), 648-656. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1997.2613077.x>
- Tran, P., Pietropaolo, M.-G., Valerio, L., Brengle, W., Wong, R., Kazui, T., Khalpey, Z., Redaelli, A., Sheriff, J., Bluestein, D., & Slepian, M. (2015). Hemolysate-mediated platelet aggregation: An additional risk mechanism contributing to thrombosis of continuous flow ventricular assist devices. *Perfusion*, 31. <https://doi.org/10.1177/0267659115615206>
- Uko, N. E., Guner, O. F., Matesic, D. F., & Bowen, J. P. (2020). Akt Pathway Inhibitors. *Curr Top Med Chem*, 20(10), 883-900. <https://doi.org/10.2174/1568026620666200224101808>
- van Asten, I., Schutgens, R. E. G., Baaij, M., Zandstra, J., Roest, M., Pasterkamp, G., Huisman, A., Korporaal, S. J. A., & Urbanus, R. T. (2018). Validation of flow cytometric analysis of platelet function in patients with a suspected platelet function defect. *J Thromb Haemost*, 16(4), 689-698. <https://doi.org/10.1111/jth.13952>
- van Geffen, J. P., Swieringa, F., & Heemskerck, J. W. M. (2016). Platelets and coagulation in thrombus formation: aberrations in the Scott syndrome. *Thrombosis Research*, 141, S12-S16. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(16\)30355-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0049-3848(16)30355-3)
- Vanhaesebroeck, B., Vogt, P. K., & Rommel, C. (2010). PI3K: from the bench to the clinic and back. *Curr Top Microbiol Immunol*, 347, 1-19. [https://doi.org/10.1007/82\\_2010\\_65](https://doi.org/10.1007/82_2010_65)
- Wagner, M., Uzun, G., Bakchoul, T., & Althaus, K. (2022). Diagnosis of Platelet Function Disorders: A Challenge for Laboratories. *Hamostaseologie*, 42(1), 36-45. <https://doi.org/10.1055/a-1700-7036>

- Warkentin, T. E. (2000). Laboratory testing for heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Thrombolysis*, 10 Suppl 1, 35-45. <https://doi.org/10.1023/a:1027381103184>
- Warkentin, T. E. (2011). How I diagnose and manage HIT. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2011, 143-149. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2011.1.143>
- Warkentin, T. E., Levine, M. N., Hirsh, J., Horsewood, P., Roberts, R. S., Gent, M., & Kelton, J. G. (1995). Heparin-Induced Thrombocytopenia in Patients Treated with Low-Molecular-Weight Heparin or Unfractionated Heparin. *New England Journal of Medicine*, 332(20), 1330-1336. <https://doi.org/10.1056/nejm199505183322003>
- Warkentin, T. E., & Sheppard, J. A. (2006). Testing for heparin-induced thrombocytopenia antibodies. *Transfus Med Rev*, 20(4), 259-272. <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2006.05.001>
- Warkentin, T. E., Sheppard, J. I., Moore, J. C., Sigouin, C. S., & Kelton, J. G. (2008). Quantitative interpretation of optical density measurements using PF4-dependent enzyme-immunoassays. *J Thromb Haemost*, 6(8), 1304-1312. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03025.x>
- Worthington, R. E., Carroll, R. C., & Boucheix, C. (1990). Platelet activation by CD9 monoclonal antibodies is mediated by the Fc gamma II receptor. *Br J Haematol*, 74(2), 216-222. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1990.tb02568.x>
- Woulfe, D., Jiang, H., Morgans, A., Monks, R., Birnbaum, M., & Brass, L. F. (2004). Defects in secretion, aggregation, and thrombus formation in platelets from mice lacking Akt2. *J Clin Invest*, 113(3), 441-450. <https://doi.org/10.1172/jci20267>
- Woulfe, D. S. (2010). Akt signaling in platelets and thrombosis. *Expert Rev Hematol*, 3(1), 81-91. <https://doi.org/10.1586/ehm.09.75>
- Xue, J. F., Shi, Z. M., Zou, J., & Li, X. L. (2017). Inhibition of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway promotes autophagy of articular chondrocytes and attenuates inflammatory response in rats with osteoarthritis. *Biomed Pharmacother*, 89, 1252-1261. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.130>
- Zeleznik, K., Rozman, P., Kocjan, E., & Malicev, E. (2021). Heparin-induced thrombocytopenia: ELISA optical density value and 4T score in correlation with panel donor platelets activation in functional flow cytometric assay. *Blood Transfus*, 19(1), 77-84. <https://doi.org/10.2450/2020.0120-20>
- Zou, J., Swieringa, F., de Laat, B., de Groot, P. G., Roest, M., & Heemskerk, J. W. M. (2022). Reversible Platelet Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  Activation and Thrombus Instability. *Int J Mol Sci*, 23(20). <https://doi.org/10.3390/ijms232012512>
- Zwicker, J. I., Uhl, L., Huang, W. Y., Shaz, B. H., & Bauer, K. A. (2004). Thrombosis and ELISA optical density values in hospitalized patients with heparin-induced thrombocytopenia. *J Thromb Haemost*, 2(12), 2133-2137. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2004.01039.x>

## **7 Erklärung zum Eigenanteil**

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin unter Betreuung von Prof. Dr. med. Tamam Bakchoul durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Tamam Bakchoul und PD Dr. med. Karina Althaus.

Die Entnahmen der Blutproben erfolgte durch die MitarbeiterInnen der Blutspendezentrale Tübingen.

Sämtliche Versuche und ihre Vorbereitungen wurden eigenständig von mir nach Einarbeitung durch Dr. rer. nat. Lisann Pelzl und Dr. rer. nat. Irene Marini, Frau Flavianna Rigoni und Herrn Jan Zlamal mit Unterstützung durch die MitarbeiterInnen des Forschungslabors sowie des HLA-Thrombozytenlabors durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte selbständig durch mich nach Anleitung durch PD Dr. med. Karina Althaus.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch PD Dr. med. Karina Althaus verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 20.12.2023

Miriam Wagner

## 8 Veröffentlichungen

### Paper:

Althaus K, **Wagner M**, Bakchoul T. Diagnose der Thrombozytenfunktionsstörungen – eine Herausforderung im Labor. Transfusionsmedizin. 2019. Doi: 10.1055/a-0626-6467

Althaus K, **Wagner M**, Marini I, Bakchoul T, Pelzl L. Flow Cytometric Assessment of AKT Signaling in Platelet Activation: An Alternative Diagnostic Tool for Small Volumes of Blood. Hamostaseologie. 2020 Nov;40(S 01):S21-S25. doi: 10.1055/a-1282-1989. Epub 2020 Nov 13. PMID: 33187007.

Hidiatov O, Gaupp A, Marini I, Pelzl L, **Wagner M**, Rigoni F, Witzemann A, Häberle H, Martus P, Ngamsri KC, Konrad FM, Rosenberger P, Straub A, Bakchoul T, Althaus K. Characterization of Shear Stress Mediated Platelet Dysfunction: Data from an Ex Vivo Model for Extracorporeal Circulation and a Prospective Clinical Study. Thromb Haemost. 2023 Jan 24. doi: 10.1055/a-1988-3174. Epub ahead of print. PMID: 36442804.

**Wagner M**, Uzun G, Bakchoul T, Althaus K. Diagnosis of Platelet Function Disorders: A Challenge for Laboratories. Hamostaseologie. 2022 Feb;42(1):36-45. doi: 10.1055/a-1700-7036. Epub 2022 Feb 23. PMID: 35196730.

### Poster:

**M.Wagner**, K. Althaus, L.Pelzl, I.Marini, F. Rigoni , and T. Bakchoul. “*Flow cytometric assessment of AKT signaling in platelet activation: an alternative diagnostic tool for small volumes of blood*”,

Posterpreis auf dem 50. Hamburger Hämophilie-Symposion, 08.-09. November 2019

**M. Wagner**, F. Rigoni, T. Bakchoul, K. Althaus. “*Flow cytometric assessment of AKT signaling in platelet activation – an alternative diagnostic tool for characterization of platelets in antibody mediated diseases like HIT and ITP*”,

Posterpräsentation auf der 64. Jahrestagung der GTH (Gesellschaft für Thrombose und Hämostaseforschung, 16.-18. Februar 2020 in Bremen

## **9 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen, die mich auf meinem Weg bis zum Abschluss der Dissertation begleitet haben, herzlich bedanken. Durch sie war es mir möglich, diesen großen Schritt zu gehen und mein Ziel der Promotion zu erreichen.

Zunächst möchte ich Prof. Dr. med. Bakchoul für die angenehme Betreuung, die Bereitstellung des Themas und das Ermöglichen von vielen verschiedenen Einblicken in die Transfusionsmedizin danken.

Mein besonderer Dank geht an PD Dr. med. Karina Althaus für die intensive, wertvolle Zusammenarbeit, die fortwährende Unterstützung, ihre Geduld und Motivation sowohl bei der Durchführung der Experimente als auch dem Schreiben dieser Arbeit.

Auch beim Forschungsteam möchte ich mich herzlich für die Hilfe, den offenen Empfang, die gute Einarbeitung und die harmonische Arbeitsatmosphäre bedanken. Ich habe es sehr genossen, Teil des Teams zu sein.

Ebenso gilt mein Dank dem Team des HLA-Thrombozytenlabor sowie der Blutspendezentrale für die tatkräftige Unterstützung und das Bereitstellen von Proben.

Danken möchte ich außerdem allen Spenderinnen und Spendern sowie Patientinnen und Patienten, die durch ihr Einverständnis die Durchführung dieser Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben.

Zum Schluss möchte ich mich herzlichst bei meinen Freunden, meinem Freund, meiner Familie und ganz besonders meinen Eltern für ihre Hilfe, die immense Unterstützung, den unglaublichen Rückhalt, beständigen Zuspruch und ihr Verständnis bedanken.