



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Quantifizierung der Expression klinisch relevanter
Thrombozytenrezeptoren TXA2R, P2Y12 und CLEC2 in der ex vivo
Megakaryopoese und in humanen Thrombozyten**

Autor: Catharina Ursula Gerhards
Institut / Klinik: Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie
Doktorvater: Prof. Dr. P. Bugert

Da einige Defekte der primären Hämostase, wie der Aspirin-like-Defekt (ALD), im täglichen Leben inapparent verlaufen können, ist eine Manifestation in Form von unerwarteten hämorrhagischen Komplikationen bei invasiven Eingriffen möglich. Der Thromboxan A2 Rezeptor (TXA2R) und der ADP Rezeptor (P2Y12) stellen pathogenetisch relevante Strukturen des ALD dar, deren diagnostische Charakterisierung abgesehen von der Erfassung des Aggregationspotenzials in Thrombozyten-funktionsuntersuchungen aktuell noch limitiert ist. Der Bedarf an weiteren Labormethoden, welche eine Prädiktion perioperativer Komplikationen vermögen, ist daher essenziell. Eine frühere Studie, die sich auf Genvarianten des Arachidonsäureweges konzentrierte, wies auf eine Assoziation zu quantitativen Defekten des TXA2R hin. Die Darstellung einer gestörten Thrombozytenaggregationsreaktion auf Arachidonsäure und ADP deutete auf einen additiven Einfluss des P2Y12 hin. Zielsetzung dieser Studie ist die Etablierung valider Labormethoden zur Erfassung quantitativer Veränderungen des TXA2R und P2Y12 beim ALD. Der C-Type Lectin-Like Rezeptor 2 (CLEC2) ist ein weiterer agonistischer Thrombozytenrezeptor, welcher beispielweise bei der Tumorprogression und Metastasierung eine Rolle spielen kann. Die Bestimmung des CLEC-2 Expressionsniveaus kann von klinischer Relevanz sein und wurde in diese Studie einbezogen.

Für die Expressionsanalyse von TXA2R, P2Y12 und CLEC2 wurde die *ex vivo* Megakaryopoese von humanen hämatopoietischen Stammzellen aus Nabelschnurblut etabliert. Nach Zugabe der Wachstumsfaktoren IL-3, SCF und TPO zum Zellkulturmedium erfolgten die verschiedenen Messungen an 6 Zeitpunkten (Checkpoints, CP): CP1, Tag 0; CP2, Tag 5-7; CP3, Tag 8-10; CP4, Tag 11-13, CP5: Tag 14-17; CP6, Tag 18-21. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Oberflächenexpression des Stammzellmarkers CD34, der Thrombozytenmarker CD41 und CD61, sowie der Zielrezeptoren TXA2R, P2Y12 und CLEC2 analysiert. Zusätzlich wurde die Genexpression von CD41, TXA2R, P2Y12 und CLEC2 auf mRNA-Ebene der mittels qPCR und auf Proteinebene in Western Blots untersucht. Die Oberflächenexpression von TXA2R, P2Y12 und CLEC-2 auf Thrombozyten wurde darüber hinaus bei 110 gesunden Probanden (Blutspender) mittels Durchflusszytometrie gemessen.

Die erfolgreiche Differenzierung von Stammzellen zu Megakaryozyten wurde durch eine signifikante Herunterregulierung von CD34 und Hochregulierung von CD41 und CD61 demonstriert. In der Durchflusszytometrie zeigte sich im Verlauf der Megakaryopoese ein Expressionsanstieg um das etwa 3-fache für TXA2R und das 10-fache für P2Y12. Die CLEC2 Expression erhöhte sich bereits zu einem frühen Zeitpunkt (CP2) auf das über 300-fache und steigerte sich bis CP4 auf das über 7.700-fache. Hingegen zeigten die Thrombozyten gesunder Probanden eine hohe TXA2R und P2Y12 und nur geringe CLEC2 Expression.

Die *ex-vivo*-Megakaryopoese, induziert in humanen Stammzellen, ist eine adäquate Methode für Expressionsuntersuchungen thrombozytärer Rezeptoren, allerdings präsentierte sich in diesem zeitlichen Rahmen der Zellkultur ein geringes Expressionsniveau von TXA2R und P2Y12 mit Anstiegstendenz an späteren Zeitpunkten. Einhergehend mit dem hohen Expressionsniveau in der gesunden Spenderpopulation führt dies zur Hypothese, dass diese Rezeptoren in der Megakaryopoese nur eine geringe Rolle spielen, jedoch für die hämostatische Funktion reifer Thrombozyten von großer Bedeutung sind. Der starke Expressionsanstieg von CLEC2 innerhalb weniger Tage der Zellkultur wird als Hinweis auf die funktionelle Bedeutung des Rezeptors in der Megakaryopoese gewertet. Darüber hinaus konnten wir durch die durchflusszytometrischen Messungen an gesunden Probanden Normbereiche für die Expression von TXA2R, P2Y12 und CLEC2 definieren, die zukünftig zur Beurteilung von Messergebnissen bei Patienten mit Verdacht auf ALD herangezogen werden können.