

Aus der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Durchflusszytometrische Untersuchungen zur primären Thrombozytenfunktion bei
Patienten mit Essentieller Thrombozythämie

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
vorgelegt von

Charlotte Anne Joséphine Hutchinson
aus Saarbrücken

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. U. Förstermann

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 08. Dezember 2020

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung der Arbeit	16
2	Literaturdiskussion	18
2.1	Essentielle Thrombozythämie	18
2.2	Mutationsprofile der ET	18
2.2.1	<i>JAK2</i> V617F Mutation.....	19
2.2.2	Mutation im <i>CALR</i> -Gen	20
2.2.3	Mutation im <i>MPL</i> -Gen.....	21
2.3	Symptome und Komplikationen der ET	21
2.3.1	Thrombosen	22
2.3.2	Mikrozirkulationsstörungen	22
2.3.3	Blutungsneigung.....	23
2.4	Aktuelle Therapiekonzepte der ET	23
2.4.1	Eingesetzte Substanzen zur Primär- und Sekundärprophylaxe	23
2.4.2	Thrombozyten-Aggregationshemmung.....	24
2.4.3	Zytoreduktive Therapie.....	24
2.5	Risikoadaptierte Therapiekonzepte der ET	28
2.6	Thrombozyten	30
2.7	Rolle der Thrombozyten in der primären Hämostase.....	32
2.7.1	Thrombozyten-Adhäsion	32
2.7.2	Autokrine und parakrine Thrombozyten-Aktivierung durch lösliche Agonisten.....	33
2.7.3	Thrombozyten-Aggregation	35
2.8	Bildung thrombozytärer Mikropartikel.....	35
2.9	COAT (“COllagen And Thrombin activated platelets”)-Thrombozyten	36
2.10	Rolle der Thrombozyten in der sekundären Hämostase.....	37
2.11	Die Rolle von extrazellulärer PDI für die Thrombozytenfunktion und für die Thrombin-induzierten Thrombingenerierung auf der Thrombozyten-Oberfläche....	38
2.12	Thrombozytäres mitochondriales Membranpotenzial.....	39
3	Materialien und Methoden	40
3.1	Geräte.....	40
3.2	Verbrauchsmaterialien.....	41
3.3	Reagenzien	42

3.4	Antikörper.....	43
3.5	Software	44
3.6	Studiendesign	44
3.7	Probanden und Patienteneinschluss.....	45
3.7.1	Fallzahl.....	45
3.7.2	Genehmigung.....	45
3.7.3	Patienten-/Probandenrekrutierung und Ein-/ Ausschlusskriterien.....	45
3.8	Datenschutz, Dokumentation und Datenspeicherung	46
3.9	Statistische Datenauswertung	47
3.10	Venöse Blutentnahme	47
3.11	Gewinnung von Plättchen-reichem Plasma (PRP)	48
3.12	Durchflusszytometrie	48
3.12.1	Allgemeines Versuchsprinzip	48
3.13	Versuchsvorbereitung.....	50
3.13.1	Thrombozytenfunktionstests.....	50
3.13.2	Durchflusszytometrische Analyse des mitochondrialen Membranpotentials.....	56
3.13.3	Durchflusszytometrische Analyse der Präsentation der PDI auf der Thrombozyten-Oberfläche	56
3.14	Messung und Analyse der Thrombozyten-Proben im Durchflusszytometer	57
3.14.1	Analyse des mitochondrialen Membranpotenzials anhand von JC1	58
3.14.2	Analyse der Protein Disulfid Isomerase auf der Thrombozytenoberfläche.....	58
4	Ergebnisse	60
4.1	Deskriptive Statistik.....	60
4.1.1	Patienten- und Probandencharakteristika	60
4.2	Explorative Datenanalyse.....	65
4.1.2	<i>Ex vivo</i> und Agonisten-induzierte Bindung des vWF an die Thrombozytenoberfläche.....	65
4.1.3	<i>Ex vivo</i> und Agonisten induzierte Aktivierung des GPIIb/IIIa Rezeptors	70
4.1.4	<i>Ex vivo</i> und Agonisten abhängige α -Granula Exozytose durch Betrachtung der Expression von CD62P auf der Thrombozytenoberfläche.....	81

4.1.5	<i>Ex vivo</i> und Agonisten abhängige δ -Granula – und Lysosomen Exozytose durch Betrachtung der Expression von CD63 auf der Thrombozytenoberfläche.....	89
4.1.6	<i>Ex vivo</i> und Agonisten induzierte Exozytose der thrombozytären δ -Granula (Mepacrine-Test).....	95
4.1.7	<i>Ex vivo</i> und Agonisten induzierte lysosomale Exozytose durch Betrachtung der LAMP-1 Expression auf der Thrombozytenoberfläche.....	100
4.1.8	Messung des mitochondrialen Membranpotenzials (MMP) der Thrombozyten bei ET Patienten anhand von JC1 <i>ex vivo</i>	105
4.1.9	PDI Oberflächenexpression <i>ex vivo</i> auf Thrombozyten von ET Patienten.....	108
5	Diskussion	111
5.1	<i>Ex vivo</i> Aktivierungstatus der Thrombozyten bei ET-Patienten.....	113
5.2	Aktivierungspotential der Thrombozyten von ET-Patienten <i>in vitro</i>	120
5.2.1	Verminderte vWF-Bindung an die Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten ohne HU-Therapie induziert durch Ristocetin bzw. Convulxin.....	120
5.2.2	Verminderte Aktivierung des GPIIb/IIIa bei ET-Patienten unabhängig von der Mutation/Therapie und vom Agonisten.....	121
5.2.3	δ -„storage pool“ Defekt bei Patienten mit ET	123
5.2.4	Generell verminderte GPVI-vermittelte Thrombozyten-Aktivierung bei ET-Patienten	124
5.2.5	Vergleichbare Thrombin-induzierte thrombozytäre α -Granula Exozytose von ET-Patienten mit Kontrollen unter ASS	126
5.2.6	Verminderte Thrombin-induzierte thrombozytäre Lysosomen Exozytose von ET-Patienten im Vergleich mit Kontrollen unter ASS.....	126
5.2.7	Convulxin plus Thrombin-induziertes Aktivierungspotential der Thrombozyten bei ET-Patienten	128
5.2.8	Tendenzielle Hyperpolarisation der thrombozytären inneren Mitochondrienmembran bei ET-Patienten.....	129
5.2.9	Erhöhte PDI-Präsentation auf der Thrombozytenoberfläche bei ET-Patienten <i>ex vivo</i>	131

6	Zusammenfassung	134
7	Literaturverzeichnis	136

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α alpha

a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13
ADAMTS13

AU arbitrary units

aVWD „acquired von Willebrand Disease“ = erworbenes von Willebrand
Syndrom

β beta

°C Grad Celsius

Abb. Abbildung

AK Antikörper

ASS Acetylsalicylsäure

aVWS acquired von Willebrand Syndrom (dt. erworbenes Von Willebrand
Syndrom)

bzw. beziehungsweise

ca. circa

CLL Chronisch lymphatische Leukämie

ET Essentielle Thrombozythämie

FITC Fluoresceinisothiocyanat

FSC Vorwärtsstreulicht („forward scatter channel“)

GP Glykoprotein

IgG Immunglobulin G

M Molar

mM Millimolar

MPN Myeloproliferative Neoplasien

nM Nanomolar

PAR Protease activated receptors

PBS Phosphatgepufferte Salzlösung („phosphate buffered solution“)

PE R-Phycoerythrin

PMF Primäre Myelofibrose

PRP „Platelet-rich plasma“ (dt. Plättchen-reiches Plasma)

PV Polycythaemia vera

rpm revolutions per minute

RT Raumtemperatur

TRAP	Thrombin receptor agonist peptide
ULVWF	Ultra large Von-Willebrand-Faktor
uvm.	Und vieles mehr
vWF	Von-Willebrand-Faktor
vWF:Ag	Von-Willebrand-Faktor-Antigen
vWF:Akt	Von-Willebrand-Faktor-Aktivität
vWS	Von-Willebrand-Syndrom
xg	g-Zentrifugalkraft
z.B.	Zum Beispiel
z.T.	Zum Teil
μ	Mikro-

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Assoziation der JAK2 Kinase mit Zytokinrezeptoren. (A) Inaktive JAK2 Kinase. (B) Aktivierte JAK2 Kinase durch Ligandenbindung des extrazellulären Rezeptors. (C) V617F Mutation mit fehlender Autoinhibition der JH1 durch JH2: Aktive JAK2 Kinase ohne Ligandenbindung. Abbildung modifiziert nach [17] und [18]	20
Abbildung 2: Exemplarischer Dot Plot einer Messung von Thrombozyten mit Mepacrine inkubiert und mit Convulxin 1,25 ng/ml aktiviert, Vorwärts- (FSC; X-Achse) gegen die Seitwärtsstreuung (SSC; Y-Achse) des Lichtes.	57
Abbildung 3: Korrelation zwischen der Thrombozytenkonzentration und des MPVs bei den untersuchten ET-Patienten nach Pearson. MPV= mean platelet volume = mittleres Thrombozytenvolumen.	61
Abbildung 4: Basalwerte der thrombozytären vWF-Bindung ohne zusätzliche Agonistengabe. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.	65
Abbildung 5: Thrombozytäre vWF Bindung ohne Aktivierung (A) und nach Aktivierung der Thrombozyten mit 1,0 mg/ml Ristocetin (B). Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.	66
Abbildung 6: Thrombozytäre vWF Bindung nach Aktivierung durch Thrombin mit 0,1 (A) bzw. 0,2 U/ml (B). Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.	68
Abbildung 7: Thrombozytäre vWF Bindung nach Aktivierung durch Convulxin 5 ng/ml (A) bzw. 20 ng/ml (B). Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.	69
Abbildung 8: Thrombozytäre vWF Bindung nach Aktivierung durch Convulxin 5 ng/ml + Thrombin mit 0 U/ml (A) bzw. 0,2 U/ml (B). Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.	70
Abbildung 9: Basalwerte der aktivierten GPIIb/IIIa-Expression ohne zusätzliche Agonistengabe, dargestellt durch die Bindungskapazität von Fibrinogen (A) und von PAC-1-Antikörper (B) auf der Thrombozytenoberfläche. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.	71
Abbildung 10: Korrelation zwischen der Thrombozytenkonzentration und der Fibrinogenbindung, induziert durch 20 ng/ml Convulxin nach Pearson	72
Abbildung 11: GPIIb/IIIa Rezeptoraktivierung nach Stimulation durch Convulxin mit 5 (A,C) bzw. 20 ng/ml (B,D), dargestellt durch die Bindungskapazität von Fibrinogen (A,B) und von PAC-1 Antikörper (C,D) auf der Thrombozytenoberfläche. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.	74
Abbildung 12: GPIIb/IIIa Rezeptoraktivierung nach Aktivierung durch Thrombin mit 0,1 (A,C) bzw. 0,2 (B,D) U/ml, dargestellt durch die Bindungskapazität von Fibrinogen (A,B) und die Expression von PAC-1 Antikörper (C,D) auf der Thrombozytenoberfläche. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.	77
Abbildung 13: GPIIb/IIIa Rezeptoraktivierung nach Aktivierung durch Convulxin 5 ng/ml + Thrombin mit 0 (A,C) bzw. 0,2 (B,D) U/ml, dargestellt durch die Bindungskapazität von Fibrinogen (A,B) und von PAC-1 Antikörper (C,D) auf der Thrombozytenoberfläche. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.	79
Abbildung 14: Thrombozytäre CD62P Oberflächen-Expression ohne zusätzliche Agonistengabe. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.	82

Abbildung 15: Korrelationsabbildung der Thrombozytenkonzentration und der basalen CD62P Expression nach Pearson	82
Abbildung 16: Thrombozytäre CD62P Oberflächen-Expression nach Aktivierung durch Convulxin mit 5 (A) bzw. 20 ng/ml (B). Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.	83
Abbildung 17: Thrombozytäre CD62P Oberflächen-Expression nach Aktivierung durch Convulxin 5 ng/ml (A) bzw. 20ng/ml (B) + 0,375 μ M ADP. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.....	85
Abbildung 18: Thrombozytäre Oberflächen-Expression von CD62P nach Aktivierung durch Thrombin 0,1 U/ml (A) 0,2 U/ml (B). Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.	86
Abbildung 19: Thrombozytäre Oberflächen-Expression von CD62P nach Aktivierung durch Thrombin mit 0 (A) bzw. 0,2 U/ml (B) + 0,375 μ M ADP. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.	87
Abbildung 20: Thrombozytäre Oberflächen-Expression von CD62P nach Aktivierung durch Convulxin 5 ng/ml + Thrombin mit 0 (A) bzw. 0,2 U/ml (B). Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.....	88
Abbildung 21: Thrombozytäre Oberflächen-Expression von CD62P nach Aktivierung durch Ca^{2+} Ionophore 20 μ M. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.....	89
<i>Abbildung 22: Thrombozytäre CD63 Oberflächen-Expression ohne zusätzliche Agonistengabe. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.</i>	<i>90</i>
Abbildung 23: Thrombozytäre CD63 Oberflächen-Expression nach Aktivierung durch Convulxin mit 5 (A) bzw. 20 (B) ng/ml. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.	91
Abbildung 24: Thrombozytäre CD63 Oberflächen-Expression nach Aktivierung durch Thrombin mit 0,1 (A) bzw. 0,2 (B) U/ml. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe	93
Abbildung 25: Thrombozytäre CD63 Oberflächen-Expression nach Aktivierung durch Convulxin 5 ng/ml + Thrombin mit 0 (A) bzw. 0,2 (B) U/ml. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.	94
Abbildung 26: Thrombozytäre CD63 Oberflächen-Expression nach Aktivierung durch Ca^{2+} Ionophore 20 μ M. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.....	95
Abbildung 27: Basale Mepacrine Aufnahme in den thrombozytären δ -Granula ohne zusätzliche Agonistengabe. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.....	96
Abbildung 28: Korrelation zwischen der Thrombozytenkonzentration und der Mepacrine Aufnahme nach Pearson	97
Abbildung 29: Mepacrine Freisetzung nach Aktivierung durch Convulxin 20 ng/ml. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.....	98
Abbildung 30: Mepacrine Freisetzung nach Aktivierung durch Thrombin mit 0,2 U/ml. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.....	99
Abbildung 31: Mepacrine Freisetzung nach Aktivierung durch Convulxin 5 ng/ml + Thrombin mit 0 (A) bzw. 0,2 (B) U/ml. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.	100
Abbildung 32: Basale LAMP-1-Expression ohne zusätzliche Agonistengabe. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.....	101

Abbildung 33: Thrombozytäre LAMP-1 Oberflächen-Expression nach Aktivierung durch Convulxin mit 5 (A) bzw. 20 (B) ng/ml. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.	102
Abbildung 34: Thrombozytäre LAMP-1 Oberflächen-Expression nach Aktivierung durch Thrombin mit 0,1 (A) bzw. 0,2 (B) U/ml. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.	103
Abbildung 35: Thrombozytäre LAMP-1 Oberflächen-Expression nach Aktivierung durch Convulxin 5 ng/ml + Thrombin mit 0 (A) bzw. 0,2 (B) U/ml. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.	104
Abbildung 36: Thrombozytäre LAMP-1 Oberflächen-Expression nach Aktivierung durch Ca ²⁺ Ionophore 20 µM. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.	105
Abbildung 37: Thrombozytäres mitochondriales Membranpotenzial ex vivo. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwerte der jeweiligen Gruppe.	106
Abbildung 38: Korrelation zwischen der Thrombozytenkonzentration und dem mitochondrialen Membranpotenzial der Thrombozyten nach Pearson	107
Abbildung 39: Korrelation zwischen dem MPVs und dem mitochondrialen Membranpotenzial der Thrombozyten nach Pearson.....	107
Abbildung 40: Vergleich der PDI Oberflächenexpression. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwerte der jeweiligen Gruppe.	109
Abbildung 41: Korrelation zwischen der Thrombozytenkonzentration und der PDI Expression auf der Oberfläche der Thrombozyten nach Pearson	109
Abbildung 42: Korrelation zwischen dem MPVs und der PDI Expression auf der Oberfläche der Thrombozyten nach Pearson	110

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: WHO Kriterien der ET 2016 Revision.....	18
Tabelle 2: Therapiealgorithmus nach Risikoeinteilung, vereinfacht nach Tefferi und Barbui 2017 [12].	28
Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Geräte und deren Hersteller.....	40
Tabelle 4: Die in dieser Arbeit verbrauchten Materialien	41
Tabelle 5: Die in dieser Arbeit eingesetzten Reagenzien und deren Bezugsquelle...	42
Tabelle 6: Die in dieser Arbeit eingesetzten Antikörper, deren Konjugation und Bezugsquelle.....	43
Tabelle 7: Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Software-Programme und deren Hersteller	44
Tabelle 8: Agonisten-induzierte Aktivierung des jeweiligen funktionellen Thrombozyten-Markers	52
Tabelle 9: Aufsteigende Endkonzentrationen an Thrombozyten-Agonisten.....	53
Tabelle 10: Klinische Angaben der Patienten mit ET nach Mutation und zytoreduktiver Therapie. Angabe als absolute bzw. relative Häufigkeit (n bzw. %). HU= Hydroxyurea; GIT= Gastrointestinaltrakt.....	61
Tabelle 11: Blutwerte der ET Patienten aufgeschlüsselt nach Mutationen und Therapie mit Hydroxyurea. Angegeben ist der Mittelwert mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.	63
Tabelle 12: Vergleichskollektiv mit gesunden Probanden nach 3 tägiger ASS Einnahme 100 mg einmal täglich und ohne ASS-Einnahme. Angegeben ist der Mittelwert mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.....	64
Tabelle 13: p-Werte der Fibrinogen-Bindung der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Convulxin 5 ng/ml. * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.	72
Tabelle 14: p-Werte der Fibrinogen-Bindung der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Convulxin 20 ng/ml im unpaired t-Test. * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.	72
Tabelle 15: p-Werte der PAC-1 Bindung der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Convulxin 5 ng/ml. * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.	73
Tabelle 16: p-Werte im unpaired t-Test der PAC-1 Bindung der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Convulxin 20 ng/ml (bei Normalverteilung der Werte nach dem Shapiro-Wilk Test). * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.	73
Tabelle 17: p-Werte im unpaired t-Test der Fibrinogenbindung der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Thrombin 0,1 U/ml (bei Normalverteilung der Werte nach dem Shapiro-Wilk Test). * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.	75
Tabelle 18: p-Werte im unpaired t-Test der Fibrinogenbindung der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Thrombin 0,2 U/ml (bei Normalverteilung der Werte nach dem Shapiro-Wilk Test). * statistisch auffälliger	

Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.	75
Tabelle 19: p-Werte im unpaired t-Test der PAC-1 Bindung der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Thrombin 0,1 U/ml (bei Normalverteilung der Werte nach dem Shapiro-Wilk Test). * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.	76
Tabelle 20: p-Werte im unpaired t-Test der PAC-1 Bindung der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Thrombin 0,2 U/ml (bei Normalverteilung der Werte nach dem Shapiro-Wilk Test). * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.	76
Tabelle 21: p-Werte der Fibrinogen Bindung der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Thrombin 0 U/ml + Convulxin 5 ng/ml. * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.	78
Tabelle 22: p-Werte der PAC-1 Bindung der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Thrombin 0 U/ml + Convulxin 5 ng/ml. * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.	78
Tabelle 23: p-Werte der PAC-1 Bindung der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Thrombin 0,2 U/ml + Convulxin 5 ng/ml. * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.	79
Tabelle 24: p-Werte im unpaired t-Test der Fibrinogenbindung der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Thrombin 0,1 U/ml (bei Normalverteilung der Werte nach dem Shapiro-Wilk Test). * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.	80
Tabelle 25: p-Werte im unpaired t-Test der PAC-1 Bindung der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Ca ²⁺ Ionophore 20 µM (bei Normalverteilung der Werte nach dem Shapiro-Wilk Test). * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.	80
Tabelle 26: p-Werte im unpaired t-Test der CD63 Expression der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Convulxin 5ng/ml (bei Normalverteilung der Werte nach dem Shapiro-Wilk Test). * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.	90
Tabelle 27: p-Werte im unpaired t-Test der CD63 Expression der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Convulxin 20 ng/ml (bei Normalverteilung der Werte nach dem Shapiro-Wilk Test). * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.	91
Tabelle 28: p-Werte im unpaired t-Test der CD63 Expression der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Thrombin 0,1 U/ml (bei Normalverteilung der Werte nach dem Shapiro-Wilk Test). * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.	92
Tabelle 29: p-Werte im unpaired t-Test der CD63 Expression der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Thrombin 0,2 U/ml (bei	

Normalverteilung der Werte nach dem Shapiro-Wilk Test). * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.	92
Tabelle 30: p-Werte der CD63 Expression der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Convulxin 5 ng/ml + Thrombin 0 U/ml. * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.	93
Tabelle 31: p-Werte im unpaired t-Test der CD63 Expression der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Thrombin 0,2 U/ml + Convulxin 5 ng/ml. * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.	94
Tabelle 32: p-Werte im unpaired t-Test der CD63 Expression der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Ca ²⁺ Ionophor. * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.	95
Tabelle 33: p-Werte der basalen Mepacrine Aufnahme der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen. * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.	96
Tabelle 34: p-Werte im unpaired t Test der PDI Expression der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen. * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.	108

1 Einleitung und Zielsetzung der Arbeit

Die essentielle Thrombozythämie (ET) gehört mit der Polycythaemia vera (PV) und der primären Myelofibrose (PMF) zur Gruppe der Philadelphia Chromosom-negativen chronischen myeloproliferativen Erkrankungen (MPN). Die ET ist definiert durch eine isolierte, chronische Erhöhung der reifen Thrombozyten im peripheren Blut [1]. Diese wird durch eine somatisch erworbene Mutation ausgelöst, die zur unkontrollierten Aktivierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen führt. Bis dato sind drei „driver-mutations“ der ET bekannt, die immer unabhängig voneinander auftreten [2,3]. Je nach ausschlaggebender Mutation lässt sich ein bestimmter Phänotyp erkennen. Gemeinsam ist allen drei Mutationen, dass sie zu aktivierenden Veränderungen im Zytokinrezeptor/Janus Kinase 2 (JAK2) Signalweg führen. Die Identifikation von „Driver“ Mutationen und die fortgeschrittene Entschlüsselung der Ätiologie der ET Subtypen hat zu merklichen Verbesserungen im Rahmen der Diagnostik von ET Patienten geführt[4]. Diese Fortschritte konnten aber bislang nicht in die Verbesserung der Behandlungsstrategie übertragen werden [4]. Auch die Thrombozytenkonzentration konnte nicht mit dem Thromboserisiko in ET oder PV korreliert werden [5–7]. Patienten mit moderater Thrombozytose können mit lebensbedrohlichen Thrombosen, wie Schlaganfälle vorstellig werden. Andere sind bei hochgradiger Thrombozytose asymptomatisch und wieder andere leiden mit einer erhöhten Thrombozytenkonzentration an ausgeprägten mukosalen Blutungen. Die Fülle an Ausprägungen lässt vermuten, dass eher Thrombozytendysfunktionen als die reine Erhöhung der Thrombozytenkonzentration hierfür ursächlich sind. Der Zusammenhang der Thrombozytenfunktionsstörungen mit den hämostaseologischen Komplikationen bei ET Patienten wird durch folgende Hypothesen beschrieben. Zum einen wird postuliert, dass die aus klonalen Megakaryozyten entstandenen Thrombozyten eine in vivo Hyperreaktivität aufweisen und sie leichter durch Scherstress aktiviert werden können, wie er in der Mikrozirkulation herrscht. Es entsteht das klinische Bild von Mikrozirkulationsstörungen und arteriellen Thrombosen mit typischen Aktivierungsveränderungen der Thrombozyten [6,8]. Zum anderen wird postuliert, dass sich der Organismus aufgrund der neoplastischen Veränderung einer Stammzelle in einem inflammatorischen Zustand befindet und prokoagulatorische Eigenschaften daraus resultieren. Auch ohne manifeste

Thrombosen besteht dann bei ET Patienten ein Zustand in dem es schneller zur Blutgerinnung kommen kann („Hypercoagulatory state“) [8].

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der primären Thrombozytenfunktion von ET Patienten mit Hilfe der Durchflusszytometrie *ex vivo* und nach *in vitro* Aktivierung durch verschiedene Agonisten im Vergleich zur zugrunde liegenden Mutation im *JAK2* oder *CALR* Gen und zur Therapie. Insbesondere vor dem Hintergrund des paradoxen Auftretens von Thrombosen und Blutungen bei ET Patienten und dem schwierigen Therapiemanagement dieser Patienten, wäre es in zukünftigen Follow-Up Untersuchungen interessant zu sehen, ob sich einer der Marker der veränderten Thrombozytenfunktion als prädiktiver Marker für thrombotische oder hämorrhagische Ereignisse bei ET Patienten abzeichnet.

2 Literaturdiskussion

2.1 Essentielle Thrombozythämie

Die Diagnose der essentielle Thrombozythämie (ET) wird anhand der Analyse von laborchemischen, zytologischen und genetischen Parametern gestellt. In den 2016 überarbeiteten WHO Kriterien sind die Kriterien zur Diagnostik der ET zusammengefasst [10] (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: WHO Kriterien der ET 2016 Revision

Hauptkriterien
1. Persistierende Thrombozytenkonzentration $> 450 \times 10^9/L$ im peripheren Blut
2. Knochenmarkhistologie: Proliferation hauptsächlich der Megakaryozytenlinie mit erhöhten Zahlen vergrößerter reifer hyperlobulierter Megakaryozyten. Keine signifikante Erhöhung oder Linksverschiebung der Granulopoese oder Erythropoese. Keine oder geringe Zunahme (Grad 0-1) der Retikulinfasern.
3. WHO Kriterien für eine BCR-ABL1 positive chronisch myeloische Leukämie, Polycythemia vera, primäre Myelofibrose oder andere myeloische Neoplasien sind nicht erfüllt
4. Nachweis einer <i>JAK2 V617F</i> -, <i>Calreticulin</i> - oder <i>MPL</i> -Mutation
Nebenkriterien
1. Vorkommen eines anderen klonalen Markers
2. Kein Hinweis auf reaktive Thrombozytose

Eine ET liegt vor, wenn alle vier Hauptkriterien oder die ersten drei Hauptkriterien und ein Nebenkriterium zutreffen.

2.2 Mutationsprofile der ET

Die ET ist eine Erkrankung mit eindeutiger klinischer Heterogenität, die sich auch durch die unterschiedlichen „driver-mutations“ erklären lässt. Seit der erstmaligen Identifikation der *JAK2 V617F* Mutation im Jahr 2005, wurden riesige Fortschritte im Verständnis der molekularen Pathogenese der Erkrankung gemacht [3]. Patienten,

bei denen in der Routineuntersuchung keine der „driver-mutations“ nachgewiesen werden kann, bezeichnet man als Tripel-negativ.

2.2.1 *JAK2* V617F Mutation

Die am häufigsten vertretene Mutation ist die Mutation im *JAK2* Gen, die bei ca. 55% der Patienten mit ET nachzuweisen ist [11,12]. Durch eine somatische Punktmutation mit Ersatz von Guanin durch Thymin am Nukleotid 1849 in Exon 14, wird im Codon 617 die Aminosäure Valin durch Phenylalanin ersetzt [1,3].

ET Patienten mit *JAK2* V617F Mutation bilden eine Gruppe mit charakteristischen Merkmalen. So sind ein späteres Erkrankungsalter mit nachfolgend älterem Patientenkollektiv (Median bei 65 Jahren[13]) und das häufiger betroffene weibliche Geschlecht zu beobachten [14]. *JAK2* V617F ist jedoch nicht spezifisch für die ET, sondern wird bei PV in 95% der Fälle nachgewiesen [1]. Die homodimerischen Rezeptoren Thrombopoetin- (TpoR), Erythropoetin- (EPOR) und G-CSF-Rezeptor (GCSFR) sind alle mit *JAK2* Kinasen assoziiert, sodass die *JAK2* V617F Mutation auch zu erhöhten Erythrozyten- und teilweise auch erhöhten Leukozyten-Werten führen kann, wie sie bei PV vorliegen [3,15].

Die JAKs sind zytoplasmatische Tyrosinkinasen, die aus sieben ‚JAK homology‘ (JH) Domänen bestehen[16]. Am C-Terminus befinden sich JH1 und JH2. JH1 ist die eigentliche Kinase und JH2 ist eine Pseudokinase, ohne katalytische Aktivität, die inhibitorisch auf JH1 wirkt [16] (siehe graphische Darstellung in Abbildung 1). Im Rahmen der V617F Mutation kommt es durch Konformationsänderungen in JH2 zur Reduktion der Autoinhibition und zur dauerhaften, zytokinunabhängigen Aktivierung des JAK/STAT Signalwegs [1,16].

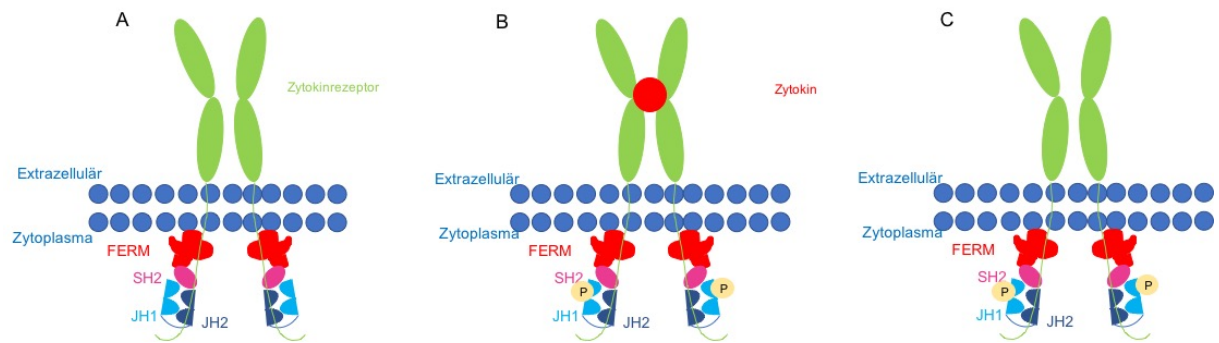


Abbildung 1: Assoziation der JAK2 Kinase mit Zytokinrezeptoren. (A) Inaktive JAK2 Kinase. (B) Aktivierte JAK2 Kinase durch Ligandenbindung des extrazellulären Rezeptors. (C) V617F Mutation mit fehlender Autoinhibition der JH1 durch JH2: Aktive JAK2 Kinase ohne Ligandenbindung. Abbildung modifiziert nach [17] und [18]

FERM,SH2= intrazelluläre, membranassoziierte Domänen von Signalproteinen, JH1= katalytische Domäne der JAK Kinase, JH2= Pseudokinase mit regulatorischer Funktion

2.2.2 Mutation im *CALR*-Gen

Die zweithäufigste Mutation, die zur ET führt, wurde erst im Jahre 2013 entdeckt und ist durch eine Mutation im Calreticulin (*CALR*) Gen bedingt [3]. Sie ist für ungefähr 25% der ET Patienten die ausschlaggebende Mutation [11]. Es handelt sich hierbei nicht um eine einzelne Mutation, sondern um eine Gruppe, mit bisher mehr als 50 Mutationen [3]. Es wird vermutet, dass nur die Mutationen, die zur Verschiebung des Leserasters um ein Basenpaar führen, pathogen sind [3]. Die beiden häufigsten Mutationen im *CALR*-Gen sind als Typ 1 und 2 definiert. Typ 1 beschreibt die Deletion von Basenpaar 52 auf Exon 9 und Typ 2 die Insertion von Basenpaar 5 auf Exon 9 [3]. Auch hier lässt sich wieder ein bestimmter Phänotyp feststellen. *CALR*-positive ET Patienten sind jünger (Median bei 51 Jahren [13]), häufiger Männer und weisen einen niedrigeren Hämoglobingehalt, Hämatokrit und niedrigere Granulozytenkonzentration im Blut auf [15]. Charakteristisch für die *CALR* Mutation ist aber die stark erhöhte Thrombozytenkonzentration im peripheren Blut $> 1000 \times 10^9/L$ [2,11]. Gleichzeitig geht diese hohe Thrombozytenkonzentration mit einem niedrigerem Thromboserisiko der Patienten einher als bei JAK2, auch unter Berücksichtigung des Alters der Patienten [2].

Das *CALR* Gen kodiert für das Calreticulin Protein, das physiologischerweise den zytosolischen Ca^{2+} -Ionen Haushalt über Interaktion mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) reguliert [3] und als Chaperon die Qualität und adäquate Faltung neu synthetisierter Glykoproteine überwacht [1]. Mutationen im *CALR* Gen führen zum

Verlust der Verankerung von Calreticulin im ER [19]. Die starke und spezifische Bindung von Calreticulin an N-glykosylierte Peptide, erklärt die Calreticulin Bindung an die stark N-glykosylierten extrazellulären Domäne des Thrombopoetin-Rezeptors (TpoR) [3]. Der daraus entstehenden positive C Terminus des Calreticulin Proteins führt zur Aktivierung des Rezeptors [3,20]. Die Aktivierung des TpoR, der physiologischerweise die Stimulierung der Megakaryopoese über die Aktivierung der JAK2 Kinase vermittelt [19,20], führt über die veränderte Regulation von Transkriptionsfaktoren im Nukleus zur vermehrten Proliferation und autonomen Wachstum einer Vorläuferzelle der Megakaryopoese [20].

2.2.3 Mutation im *MPL*-Gen

Die seltenste zu ET führende Mutation ist die *MPL* missense Mutation auf Exon 10 [3]. Sie ist bei ca. 5% der Patienten ursächlich. Das myeloproliferative leukemia virus (*MPL*) Gen kodiert für den schon zuvor beschriebenen TpoR, der über Thrombopoetin die Proliferation der Megakaryozyten vermittelt. Durch die Mutation im *MPL* Gen kommt es zur konstitutiven Aktivierung der JAK2 Kinase und des nachfolgenden Signalwegs, unabhängig von der Bindung eines Liganden [3]. *CALR*-positive und *MPL*-positive Patienten haben vorwiegend einen ähnlichen Phänotyp mit Vermehrung der Megakaryozyten [15]. Mutationen im *MPL* Gen konnten an verschiedenen Loci identifiziert werden. Die beiden häufigsten Punktmutationen sind W515K und W515L [3] und führen zur Veränderung der Aminosäure im Codon 515, im Übergangsbereich des transmembranösen zum zytosolischen Anteil des Rezeptors.

2.3 Symptome und Komplikationen der ET

Von allen Philadelphia-negativen MPNs ist die ET mit der besten Prognose assoziiert [8], da lebensverkürzende Langzeitkomplikationen, wie beispielsweise die Transformation in eine Myelofibrose oder eine akute Leukämie relativ selten vorkommen. Jedoch ist die Mortalität und Morbidität und nicht zuletzt die Lebensqualität stark von hämostaseologischen Komplikationen, wie Thrombosen und Blutungen abhängig [8].

Warum es zu diesen Komplikationen kommt, ist pathophysiologisch weitestgehend unverstanden, weshalb es bis dato nicht möglich ist, die möglichen Komplikationen zu prognostizieren. Dabei reicht das Spektrum der Ausprägung von symptomlos bis hin zu lebensbedrohlichen Thrombosen der Koronararterien über Blutungen. Auch sind besonders Symptome, die die Lebensqualität des Patienten beeinflussen von besonderer Bedeutung und müssen gerade in chronischen Erkrankungen wie der ET, aufgrund der Dauer der Krankheit mitberücksichtigt werden [21]. Aufgrund der großen Bandbreite an Symptomen und um mögliche Warnzeichen frühzeitig zu erkennen, ist es wichtig die Patienten ausführlich aufzuklären und sie bestmöglich in ihre Krankheit einzubinden.

2.3.1 Thrombosen

Die Inzidenz von Thrombosen bei ET Patienten weist mit einer Spannweite von 11-25% starke Abweichungen auf [8]. Durch retrospektive Designs der Studien, limitierten Stichprobenumfänge der Studien und variablen Definitionen eines „events“ kann dies erklärt werden [7].

Arterielle Thrombosen findet man besonders in der Zerebral- und Koronararterienstrombahn, wo sie zu ischämischen Schlaganfällen und Myokardinfarkten führen können [8]. Auch periphere arterielle Verschlüsse sind bekannt [8].

Als venöse Thrombosen beobachtet man tiefe Beinvenenthrombosen, Lungenembolien sowie portal - oder hepatische venöse Thrombosen, wobei letztere vorrangig bei einer unerkannte PV auftreten [9]. Auch Thrombosen in den zerebralen Sinus sind bekannt [8]. Bei Schwangeren sind venöse Thrombosen häufiger als bei anderen ET Erkrankten zu beobachten [22], besonders postpartal ist das Risiko erhöht [22].

2.3.2 Mikrozirkulationsstörungen

Typisch für die ET sind Mikrozirkulationsstörungen, die zu Erythromelalgie, TIAs, Kopfschmerzen, Sehstörungen und Durchblutungsstörungen/Parästhesien der Extremitäten führen [8,23].

Die Erythromelalgie ist eine uni-/bilaterale Durchblutungsstörung, oft der Extremitäten [24]. Es kommt zunächst zur lokalen, schmerzhaften Überwärmung und marmorierter Rötung der Haut, oft an Handflächen, Unterschenkel oder Fußsohlen [23]. Die Symptome werden durch Wärme verstärkt und durch Kälte gemindert. Bei länger anhaltender Minderperfusion kann es zur Ischämie und Gangrän kommen [24]. Die Erythromelalgie kann durch alle MPNs ausgelöst werden, ist aber besonders bei ET charakteristisch [23]. Man geht davon aus, dass es sich um thrombozytäre Thromben handelt, die das Kapillarbett okkludieren [23]. Es konnten histologisch thrombozytenreiche Mikrothromben nachgewiesen werden [25] und die Gabe von Acetylsalicylsäure (ASS) führt zu einer raschen Besserung der Symptome [24]. Dieses Phänomen ist so charakteristisch, dass es lange Zeit als diagnostisches Kriterium genutzt wurde [24].

2.3.3 Blutungsneigung

Das Risiko für schwerwiegende Blutungen, die in durch Finazzi et al. als „symptomatische Blutung in einem kritischen Organ oder offene Blutung mit Transfusionsbedarf oder Hb-Abfall um 2 g/dl ohne Transfusion“ definiert wurde [26], ist niedrig (< 1% Patientenjahre). Insbesondere ältere Patienten, Patienten mit schwerer Blutung in der Anamnese oder unter Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmung sind gefährdet [26]. Diese schwerwiegenden Blutungen sind vorrangig im Gastrointestinaltrakt lokalisiert [26].

2.4 Aktuelle Therapiekonzepte der ET

2.4.1 Eingesetzte Substanzen zur Primär- und Sekundärprophylaxe

Die Therapie der ET wird maßgeblich durch das Risiko für eine Thrombose oder Blutung bestimmt. Das Ziel der ET Therapie besteht in einer Vorbeugung thrombohämorrhagischen Komplikationen [4,27–29], Kontrolle von Symptomen, Therapie von Komplikationen und Minimierung des Risikos einer Progression zu einer akuten Leukämie oder Transformation zu einer post-ET Myelofibrose [4].

Es wird zwischen Primär- und Sekundärprophylaxe unterschieden. Die Primärprophylaxe bezeichnet die vorbeugende Therapie bei Patienten mit

Risikofaktoren für eine bestimmte Erkrankung oder ein Ereignis, die aber noch nicht aufgetreten sind. Bei den Patienten mit ET sollen Thrombosen und Blutungen vermieden werden.

Die Sekundärprophylaxe hingegen soll das erneute Auftreten eines bereits eingetroffenen Ereignisses verhindern. ET Patienten mit bereits stattgehabter Thrombose sollen vor einer erneuten Thrombose geschützt werden.

Zu diesem Zweck werden bei ET Patienten aktuell Medikamente zur Thrombozyten-Aggregationshemmung, Zytoreduktion und Hemmung der JAK Kinase eingesetzt.

2.4.2 Thrombozyten-Aggregationshemmung

Die Primärprophylaxe mit „low dose“ ASS (100 mg/Tag) bei ET Patienten wurde als wirksam befunden aufgrund der Extrapolation der Ergebnisse der ECLAP Studie bei Patienten mit PV [30]. Durch die verschiedenen Mutationen, die bei ET auslösend sein können und die sehr verschiedenen Phänotypen, die daraus resultieren, wird die unkritische Übernahme dieser Empfehlung bemängelt [30]. Zwei Studien konnten jedoch in bestimmten Risikokonstellationen einen Vorteil für eine antiaggregatorische Therapie mit ASS finden [31,32]. Vor allem bei mikrozirkulatorischen Beschwerden führt es zu einer Besserung und wird empfohlen. Üblich ist eine geringe Dosierung mit 100 mg einmal täglich, dennoch gibt es Studien, die empfehlen, die Dosis auf zwei Einnahme pro Tag zu verteilen um eine adäquate Wirksamkeit bei dem hohen Umsatz an Thrombozyten zu gewährleisten [33,34]. Bei Kontraindikation gegen ASS können alternative Thrombozytenaggregationshemmer, z.B. den ADP-Rezeptor-Antagonist Clopidogrel genutzt werden [35,36].

2.4.3 Zytoreduktive Therapie

Die Zytoreduktion als prophylaktische Maßnahme gegenüber Placebo zum Schutz vor Thrombosen und Blutungen wurde erstmals 1995 durch Cortelazzo et al. nachgewiesen [37]. Seitdem gilt Hydroxyurea (HU) als Erstlinienmedikament zur Senkung der Thrombozytenzahl. 2005 erfolgte die erste Studie zum Vergleich der zwei zytoreduktiven Substanzen HU und Anagrelid [38]. Es konnte kein Vorteil für Anagrelid gegenüber HU in der Primary Thrombocythemia Study (PT1) gefunden werden. Allerdings wurde die Non-inferiorität Anagrelids in der ANAHYDRET Studie

des Jahres 2013 dargestellt [39], sodass Anagrelid zu den eingesetzten zytoreduktiven Substanzen bei ET gehört.

2.4.3.1 Hydroxyurea (HU)

HU ist ein nicht alkylierender hydroxylierter Abkömmling von Urea (Harnstoff), das durch Hemmung der Ribonucleotid Reduktase die DNA-Biosynthese hemmt [40] und als „first line“ Medikament zur Zytoreduktion bei ET eingesetzt wird [28,38]. HU greift in der frühen Phase der Megakaryozyten Produktion ein und führt zur verminderten Proliferation von Megakaryozyten [29]. Die Vorteile von HU sind die praktische orale Aufnahme des Medikaments, die effektive Thrombozytenreduktion und die niedrige Toxizität [37]. Die effektive Reduktion der Thrombozytenkonzentration gelingt innerhalb eines Monats [41]. HU reduziert signifikant die Blutkonzentration der Thrombozyten und die Inzidenz von Thrombosen [37]. Durch die allgemeine Hemmung der Hämatopoese kommt es auch zur Reduktion von Leukozyten und Erythrozyten. Beschriebene Nebenwirkungen sind eine Makrozytose, Neutropenie mit erhöhte Infektionsneigung, Ulzera der Haut und Schleimhäute (Beine, Mundschleimhaut), Ekzeme, Nagelpigmentierung, Zystitis, Fieber und gastrointestinale Symptome [39,41,42]. Auch Anämien können vorkommen [41]. Die Therapie mit Hydroxyurea ist rein symptomatisch und beeinflusst nicht den kranken Klon [29]. Bei Intoleranzen oder Resistenz gegenüber der Erstlinientherapie mit HU sollten Alternativen wie Anagrelid oder Inteferon α berücksichtigt werden [4,37].

2.4.3.2 Anagrelid

Anagrelid ist eine Substanz die spezifisch die Thrombozytenkonzentration im Blut senkt und bei Thrombozytose, vor allem bei ET Anwendung findet [29]. Anagrelid ist ein Amidazoquinazolin und wurde ursprünglich als antikoagulatorische Substanz entwickelt [29]. Diese Wirkung macht sich aber erst bei hohen Dosierungen bemerkbar und besonders in Kombination mit ASS [29,43], sodass nur in dem Fall eine erhöhte Blutungsneigung erwartet wird [29]. In geringeren Dosierungen kommt es zur selektiven Hemmung der Differenzierung der Megakaryozyten und zur Linksverschiebung der Reifung mit kleineren und langsamer reifenden Megakaryozyten [29,43]. Da die Wirkung ausschließlich die thrombozytäre Reihe

betrifft, kommt es nicht zu Anämien oder Leukopenien, wie es bei HU der Fall sein kann [29]. Die genaue Zielstruktur und der Wirkmechanismus über den Anagrelid die Megakaryopoese beeinflusst ist bis dato nicht bekannt. Bekannt ist, dass Anagrelid einen hemmenden Effekt auf die Phosphodiesterase III (PDE III) hat [29]. Die Phosphodiesterase ist auch in Thrombozyten präsent und es wurde postuliert, dass über die Inhibition dieses Enzyms sich die Wirkung von Anagrelid entfaltet. Cacciola et al. [44] beschrieben eine Besserung von Erythromelalgie-Beschwerden und der Thrombozyten-Aktivierungsparameter nach Einstellung von ET Patienten mit Anagrelid. Eine Untersuchung zur biologischen Aktivität von Anagrelid durch Wang et al. [45] beschreibt aber, dass die Beeinflussung der Megakaryopoese durch Anagrelid zu einem viel früheren Zeitpunkt als die Hemmung der PDE III stattfindet. Auch konnte die Inhibition der Megakaryozytenproliferation nicht durch andere PDE III Hemmer reproduziert werden. Die Hemmung von PDE III und die Reduktion der Thrombozytenkonzentration werden als unabhängige Wirkungen von Anagrelid gesehen. Allerdings ist die PDE III in kardialen Myozyten zu finden. Durch verminderten Abbau des cAMPs kommt es zur positiven inotropen und chronotropen Wirkung am Herzen. Die ebenso hervorgerufene Vasodilatation erklärt die häufigen Nebenwirkungen wie Tachykardie, Kopfschmerzen und Schwindel oder auch Diarrhoe [43]. Diese Nebenwirkungen sistieren meist innerhalb der ersten Wochen der Einnahme [29]. Bei Patienten mit Herzinsuffizienz sollte Vorsicht geboten sein. Insbesondere Faktoren, die eine Tachykardie begünstigen, wie beispielsweise Koffein, sollten gemieden werden. Anagrelid ist u.a. in den USA und in Japan als Erstlinientherapie zugelassen [29]. In Europa ist die Substanz bei „high risk“ Patienten und bei Resistenz oder Intoleranz gegenüber Hydroxyurea zugelassen [28,29]. Anagrelid senkt die Thrombozytenkonzentration innerhalb einer Woche auf 50% des Ausgangswertes [43]. Die Substanz kann oral eingenommen werden und wird daher vom Großteil der Patienten gut toleriert [43]. Bedenken bezüglich eines leukomogenen Effekts, sowie der möglichen Begünstigung der Fibrosierung des Knochenmarks, gelten mittlerweile als unbegründet [29,35]. Nachdem die „Non-inferiorität“ der Substanz gegenüber HU in der ANAHYDRET Studie nachgewiesen wurde [39], bietet sie gerade für jüngere Patienten einen Vorteil, die bevorzugt mit Anagrelid therapiert werden [29].

2.4.3.3 Interferon α

Die Anwendung von Interferon α (IFN α) ist „off label“ und bei Versagen der anderen Therapien in Betracht zu ziehen. IFN α hemmt die Reifung der multipotenten hämatopoetischen Stammzellen, die bei ET pathologisch gesteigert ist [29] und scheint eine krankheitsmodifizierende Wirkung zu haben. Bei einigen *JAK2 V617F* mutierten ET Patienten konnte eine hämatologische und molekulare Remission erzielt werden [21,28]. Die Therapie mit IFN α gilt als sicher, ohne leukomogene oder teratogene Wirkung. Aber der Effekt tritt später ein als bei HU oder Anagrelid und die aufwendigere subkutan Applikation spricht gegen eine Therapie mit IFN α [43]. Es müssen zuvor Autoimmungeschehen ausgeschlossen werden [28] und zu beachtende und therapielimitierende Nebenwirkungen sind Fatigue, grippeähnliche Symptome und psychische Veränderungen bis hin zu Depressionen [28,29].

2.4.3.4 Hemmung der JAK-Kinase

Bei Patienten mit *JAK2 V617F* Mutation und dysregulierter JAK ist Ruxolitinib als oraler JAK1/JAK2 Inhibitor die erste zielgerichtete Therapie der ET [46]. Ruxolitinib ist bei PV, PMF und auch ET bei HU Resistenz oder Intoleranz zugelassen [47], bietet aber nach Untersuchungen in der MAJIC Studie keinen Vorteil gegenüber der bestmögliche Alternativtherapie mit Anagrelid oder IFN α [48]. Untersucht wurden als Endpunkte die Reduktion der Thrombozyten, Verhinderung einer Transformation zu AML und Senkung der Thrombose-/Blutungsrate. Die Nebenwirkungen der Ruxolitinib-Therapie sind Anämie, Leukopenie mit erhöhtem Infektionsrisiko, Gewichtszunahme, Husten, Diarrhoe und Fieber [46].

Bisher konnten einzelne hämatologische und molekulare Remissionen unter Interferon α und Ruxolitinib beobachtet werden. Das Risiko-Nutzen Verhältnis spricht aber nicht für den primären Einsatz dieser Substanzen, sodass die Therapie hauptsächlich aus Kombinationen von ASS, HU und bei gerechtfertigter Indikation Anagrelid besteht.

2.5 Risikoadaptierte Therapiekonzepte der ET

Die Fortschritte in der Entschlüsselung der molekularen Pathogenese, ermöglichten bereits ein besseres Verständnis der Erkrankung. Die Pathogenese der Thrombosen ist jedoch nicht aufgeklärt. Zur Einleitung einer Therapie zur Prophylaxe von Thrombosen stützt man sich daher auf bekannte Risikofaktoren und daraus abgeleiteten „scores“ (siehe Tabelle 2), mit dem Ziel ein positives Nutzen-Risiko-Verhältnis zu erzielen und die Lebensqualität der Patienten zu erhöhen [49].

Tabelle 2: Therapiealgorithmus nach Risikoeinteilung, vereinfacht nach Tefferi und Barbui 2017 [12].

CVRF = Kardiovaskuläre Risikofaktoren

Very low risk (keine Thrombose in der Anamnese, <60J, keine Mutation des JAK2 Gens)	ohne CVRF	Watch and wait
	mit CVRF	Thrombozytenaggregationshemmung
Low risk (keine Thrombose in der Anamnese, <60J, Mutation des JAK2 Gens)		Thrombozytenaggregationshemmung
Intermediate risk (keine Thrombose in der Anamnese, >60J, keine Mutation des JAK2 Gens)	ohne CVRF	Thrombozytenaggregationshemmung
	mit CVRF	Thrombozytenaggregationshemmung + Zytoreduktion
High risk (Thrombose in der Anamnese oder >60J + Mutation des JAK2 Gens)		Zytoreduktion

Der „International Prognostic Score for Essential Thrombocythemia“ (IPSET) teilte das Risiko eine Thrombose zu erleiden in „very low“, „low“, „intermediate“ oder „high risk“ ein [12]. Kardiovaskuläre Risikofaktoren (Diabetes, arterielle Hypertonie, Rauchen, Dyslipidämie) und das Vorliegen der *JAK2* V617F Mutation sind unabhängige Risikofaktoren [50] und werden neben einer zuvor stattgefundenen Thrombose und dem Alter des Patienten zur Risikostratifizierung hinzugezogen.

Der „low risk“ Gruppe, bei denen eine *JAK2* V617F Mutation vorliegt, wird eine Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS empfohlen [50]. Erst bei diesem zusätzlichen Risikofaktor bietet eine Thrombozytenaggregationshemmung einen präventiven Vorteil [51]. Auch kardiovaskuläre Risikofaktoren sind eine Indikation für Thrombozytenaggregationshemmung. Bei Patienten mit symptomatischer

Durchblutungsstörung besteht nach dem European Leukemia Net immer die Empfehlungen einer Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmung und diese als Sekundärprophylaxe weiterzuführen [28]. Patienten, die aufgrund ihres Alters der „high risk“ Gruppe eingeordnet wurden, aber sonst keine Risikofaktoren und keine Thrombose erlitten haben, könnten als intermediate risk eingestuft werden [50]. Die „high risk“ Gruppe schließt nur noch Patienten ein, die eine Thrombose in der Vergangenheit hatten oder >60 Jahre alt und *JAK2 V617F* positiv sind [50]. Eine zytoreduktive Therapie ist bei diesen Patienten indiziert. *CALR* mutierte Patienten hingegen haben im Vergleich zu *JAK2 V617F* ein niedrigeres thrombotisches Risiko [15,36] und das Thromboserisiko von *MPL* mutierten Patienten gleicht dem der Normalbevölkerung [15]. Das geringere Risiko vaskulärer Ereignisse bei *CALR* und *MPL* Mutation sollte in der Risikostratifizierung und im Therapiemanagement berücksichtigt werden [15].

Wichtig ist bei Patienten mit gestörter primärer Hämostase, wie sie bei extremer Thrombozytose entstehen kann, die Blutungsneigung nicht durch ASS zu potenzieren [52]. Die Therapie der Wahl in diesem Fall ist die Reduktion der Thrombozytenzahl, da es dadurch nachweislich zur Normalisierung des vWF und seiner Funktion kommt [52–54] und somit die Blutungsneigung kontrolliert werden kann.

Bei ET Patienten überwiegt das thrombotische Risiko dem der Blutung. Patienten, die blutungsgefährdet sind, aber auch vor einer Thrombose geschützt werden müssen, wird empfohlen, die antiaggregatorische Therapie erst nach Reduktion der Thrombozyten unter 1000/nl einzuleiten. Bei manifester Thrombose und nicht blutungsgefährdeten Patienten, werden die jeweilig zur Therapie benötigten Medikamente (antiaggregatorisch bei arteriellen Thrombosen / antikoagulatorisch bei venösen Thrombosen) gegeben [55].

Das Ansprechen der Therapie wird aktuell an der Normalisierung des Blutbildes und dem Rückgang von Symptomen festgemacht [4]. Die zuvor beschriebenen „scores“ bieten vor allem eine prognostische Einschätzung und Handlungsempfehlungen. Da sie aber meist retrospektiv ermittelt wurden und die ermittelten Thrombose- und Blutungsraten deutliche Schwankungen aufweisen, herrscht Unsicherheit über ihre

prognostische Bedeutung. Neue individuelle prognostische Parameter könnten für den optimale Zeitpunkt zur Therapieeinleitung genutzt werden [4].

2.6 Thrombozyten

Die Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt, spielen als Schaltzellen der Hämostase eine zentrale Rolle. Da bei der ET eine isolierte Erhöhung der Thrombozytenkonzentration im Blut charakteristisch ist und eine Reihe von hämostaseologischen Komplikationen auftreten, sind die Thrombozyten in den Fokus vieler Untersuchungen gerückt.

Die Thrombozyten sind zellkernlose Abschnürungen von Megakaryozyten im Knochenmark, die in einer Konzentration von $150-350 \times 10^9/L$ im Blutkreislauf zirkulieren und die Unversehrtheit des Gefäßsystems überwachen [56]. Inaktive Thrombozyten sind diskoid und zirkulieren inadhärent im Gefäßsystem zur Überprüfung der Integrität der Gefäßwände [57]. Die Thrombozyten haben eine Lebensdauer von 5-12 Tagen und werden in der Milz abgebaut. Sie sind die kleinsten zellulären Blutbestandteile und messen im Durchmesser von 1-3 μm .

Die Thrombozyten besitzen einmalige Organellen, die sie zu vielseitigen Akteuren der Hämostase machen: die Granula. Die drei Hauptgruppen der Granula, die nach Aktivierung zur autokrinen Verstärkung der Thrombozytenaktivierung bzw. zur Kommunikation mit anderen Blut- und vaskulären Zellen ausgeschüttet werden, sind die α -Granula, die dichten Granula und die Lysosomen.

Die α -Granula sind mit 15% des Zytoplasmavolumens die häufigsten (ca. 80 pro Thrombozyt) und größten (200-500 nm [58]) Granula. Sie enthalten eine Vielzahl an Proteinen zur Förderung und Regulierung der Gerinnungsantwort: Adhäsionsmoleküle, Proteine, die die Gefäßwand direkt beeinflussen, wie Entzündungsmodulatoren, Chemokine, pro- und antikoagulatorische Faktoren und eine Sammlung an antimikrobiellen Peptiden, Immunmodulatoren und sonstigen Proteinen, wovon Albumin der prominenteste Vertreter ist [58]. In der Membran der α -Granula sind außerdem Membranproteine, wie das Glykoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) oder das P-Selektin (CD62P) lokalisiert. Nach der Aktivierung kommt es zur

Exozytose der Granula und sie werden an die Oberfläche der Thrombozyten verlagert. Dort können die Membranproteine der Granula in der Thrombozytenmembran nachgewiesen werden. α -Granula dienen als Ruhespeicher für das GPIIb/IIIa. Im Anschluss an eine Aktivierung, wird die Bindungshäufigkeit von Fibrinogen durch vermehrte Expression des Integrins erhöht [59]. P-Selectin (CD62P) ist ausschließlich in der Membran der α -Granula lokalisiert [56,60] und fördert auf der Thrombozytenmembran den „Cross-talk“ der Thrombozyten mit den Leukozyten [59].

Die zweithäufigsten Granula sind die δ -Granula oder „dense bodies“, so genannt aufgrund ihres elektronendichten Erscheinens im Elektronenmikroskop [59]. Sie enthalten kleine Substanzen mit niedrigem Molekulargewicht [58], wie Ca^{2+} Ionen und anorganischem Phosphat, Serotonin, ADP und ATP [58,61,62]. 50% des ADPs in Thrombozyten ist in den dichten Granula gespeichert und wird als ADP Speicherpool bezeichnet [59]. Das restliche ADP wird im Zytosol aus anderen Adenin-Nukleotiden synthetisiert, kann aber nicht ausgeschüttet werden [63].

Hauptmembranglykoproteine der dichten Granula ist das Granulophysin (CD63) [59]. CD63 liegt mit dem GPIIb/IIIa als Komplex auf der Oberfläche der aktivierten Thrombozyten vor und wird als Integrin-Modulator diskutiert [64]. Durch die Mepacrine Aufnahme in die δ -Granula und die anschließende Sekretion kann auf den funktionellen ADP Speicher der Thrombozyten zurückgeschlossen werden. Mepacrine wurde ursprünglich als Anti-Malaria Medikament eingesetzt [65]. Die Substanz weist aber eine hohe Affinität für Adenin-Nukleotide auf und akkumuliert rasch und selektiv in den δ -Granula [66]. Als fluoreszierende Substanz kann sie gut durchflusszytometrisch nachgewiesen werden.

Vereinzelt finden sich Lysosomen in den Thrombozyten. Sie messen 175-250 nm und enthalten vor allem Proteasen wie saure Hydrolasen, Kathepsinen, Kollagenase [59] und Elastase. In Ihrer Membran befinden sich verschiedene „lysosome-associated membrane proteins“: LAMP-1, LAMP-2, LAMP-3 (=CD63) [59]. CD63 ist ein integrales Protein sowohl der dichten Granula als auch der Lysosomenmembran [67]. Bei Exozytose kommt es an die Oberfläche der Thrombozytenmembran und ist nur auf aktivierten Thrombozyten nachweisbar [68].

2.7 Rolle der Thrombozyten in der primären Hämostase

Kommt es zu einer Gefäßverletzung, wird die Schicht von Endothelzellen unterbrochen und subendotheliale Matrix wird zum Blutstrom präsentiert. Die Thrombozyten sind essentiell zur ersten Abdichtung des Defekts und weiterhin zur Steuerung und Begrenzung der sekundären Hämostase auf den Ort der Verletzung [56,69].

2.7.1 Thrombozyten-Adhäsion

Während des mehrstufigen Adhäsionsmechanismus [70] binden Thrombozyten über spezifische Rezeptoren an Adhäsionsproteine der subendothelialen Matrix, des Blutes und des Endothels.

Der genaue Mechanismus hängt vor der vorherrschenden Blutströmung an dem Ort der Verletzung ab.

Unter hohem Scherstress, wie in arteriellen Gefäßen, können Thrombozyten nicht direkt an freiliegendem Kollagen der subendothelialen Matrix binden. Sie müssen zunächst abgebremst werden und dies geschieht durch von Willebrand Faktor (vWF). Der vWF ist ein Plasmaprotein, das von Endothelzellen aus den Weibel-Palade-Körperchen und von Thrombozyten aus den α -Granula sezerniert wird. Im Rahmen eines Endotheldefekts wird der vWF aus dem Blut an das frei gewordenes Kollagen zusätzlich rekrutiert [59] und steigert die Bindungsstellen für Thrombozyten. Der vWF besteht aus größeren und kleineren Multimeren, die durch Disulfidbrücken verbunden sind [57]. Der vWF zirkuliert in einer globulären Struktur. An Kollagen gebundener vWF liegt bei hohen Scherkräften, wie sie im arteriellen Blutfluss herrschen, entwunden in einer langen Strangform vor [57,59]. Die daraus entstehende große Oberfläche führt zur erleichterten Bindung mit dem Glykoprotein (GP)Ib-V-IX auf der Oberfläche der Thrombozyten [57]. Ungefähr 25 000 Kopien dieses Komplexes finden sich auf der Oberfläche eines Thrombozyten [57]. Die GPIb α Untereinheit des GPIb-V-IX Komplexes bindet den verankerten vWF. Die Bindung der Thrombozyten an den vWF hat eine hohe Dissoziationsrate [71] und dient hauptsächlich dem Abbremsen der Thrombozyten in Gefäßen mit hohen Scherkräften am Ort der Endothelschädigung [72]. Durch die Bindung von vWF

Multimeren an den Thrombozyten kommt es zur Quervernetzung des GPIb. Im Anschluss ist die Bindung an andere Rezeptoren mit langsamerer Bindungsrate möglich [59]. Klassischerweise gelingt dies über den GPVI Rezeptor durch die Bindung an Kollagen [73–75]. Die nachfolgende, transiente Aktivierung des Thrombozyten führt zur Konformationsänderung des GPIIb/IIIa [69,75]. In der aktivierten Form kann dieses Glykoprotein vWF selbst binden [76] und ermöglicht eine vWF vermittelte Thrombozytenaggregation [75,77].

Die Adhäsion der Thrombozyten unter Bedingungen mit niedrigen Scherkräften verläuft hauptsächlich über die Bindung an Kollagen [75]. Im Gegensatz zum vWF ist die Bindung über Kollagen sehr stabil [75]. GPVI ist der führende Kollagenrezeptor auf Thrombozyten, gehört zur Immunoglobulin-Superfamilie und ist konstitutiv mit der γ -Kette des Fc Rezeptors assoziiert [69,78–82], jedoch besteht nur eine geringe Affinität von Kollagen zu GPVI [57]. Die Affinität wird erhöht wenn der Thrombozyt zuvor durch Bindung von vWF an GPIb abgebremst worden ist [56]. Kollagen besitzt multiple Bindungsstellen für den GPVI Rezeptor, wodurch es zum „clustern“ von GPVI/FcR γ kommt mit nachfolgender Phosphorylierung der „immuno tyrosine-based activation motifs“ (ITAMs), Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺ Spiegels [56,57,75] und Aktivierung der Integrine $\alpha_2\beta_1$ und $\alpha_{IIb}\beta_3$ [59]. Diese aktivierten Integrine interagieren mit vWF, Kollagen und anderen Bestandteilen der extrazellulären Matrix und führen zur irreversiblen Anheftung der Thrombozyten an der Gefäßwandläsion [59].

2.7.2 Autokrine und parakrine Thrombozyten-Aktivierung durch lösliche Agonisten

Die Aktivierung des Thrombozyten setzt parallelverlaufende Mechanismen in Gang. Ziele sind die Formumwandlung zur Bedeckung des Endotheldefekt, Rekrutierung weiterer Thrombozyten, Bildung eines Thrombus und Initiierung der Gerinnung, um eine dauerhafte Stabilisierung des Thrombus zu ermöglichen [59]. Die Exozytose der Thrombozytengranula ist ein wichtiger Verstärkungsmechanismus der initialen Thrombozytenreaktion und kennzeichnend für die Thrombozytenaktivierung [69]. Die meisten löslichen Agonisten interagieren lokal an dem Ort der Verletzung mit den Thrombozyten über G-Protein gekoppelte Rezeptoren [57,59] und werden schnell metabolisiert zur Beendigung der Wirkung [57,75].

2.7.2.1 ADP

Das autokrin oder durch benachbarte Thrombozyten sezernierte ADP wirkt über zwei Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₂. Die Wirkung über den ADP Thrombozytenrezeptor P2Y₁ löst die initiale, transiente Thrombozytenantwort aus [57,60,62]. Nachfolgend kommt es zur intrazellulären Ca²⁺ Erhöhung, Formumwandlung und reversible Thrombozytenaggregation [83]. Die autokrine Sekretion und Aktivierung des P2Y₁₂ ist ein wichtiger Faktor in der Thrombusformation [57]. Die Aktivierung von P2Y₁₂ führt zum Wegfall der Hemmung und irreversiblen Aggregation [62,69]. Die zentrale Rolle wird durch den Erfolg der Inhibition dieses Rezeptors durch zB. Clopidogrel, Prasugrel, Ticagrelor deutlich [57]. Der Abbau des ADPs erfolgt durch die Ectonukleosidase und gewährleistet eine zeitlich limitierte Wirkung [57].

2.7.2.2 Thromboxan A₂

In aktivierten Thrombozyten wird Arachidonsäure aus dem internen Membransystem freigesetzt und kann durch die thrombozyteneigene Cyclooxygenase im Zytosol zu Thromboxan A₂ verstoffwechselt werden [57,62,67]. Die Cyclooxygenase COX 1 und die Produktion von Thromboxan A₂ wird durch ASS irreversibel gehemmt und wirkt so als effektiver Hemmer der weiteren Thrombozytenaktivierung. Die Bindung erfolgt an dem TP Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche [67]. Die Verstärkung der Aktivierung der Thrombozyten wird aufgehoben [62]. Über die Rezeptoren TP und 5-HT_{2A} für Thromboxan A₂ und Serotonin respektive, können sie ein limitiertes Signal in den Thrombozyten auslösen [57]. Thromboxan A₂ ist ein instabiles Molekül mit raschem Zerfall [57].

2.7.2.3 Serotonin

Serotonin wird aus dem Blut über den Serotonin Transporter SERT in die Thrombozyten aufgenommen [57,67]. Es wirkt vasokonstriktorisch und über die Bindung an den 5HT_{2A}-Rezeptor kommt es mit ADP zur Verstärkung der Aktivierung [60]. Serotonin führt zur Freisetzung der α-Granula [84] und zur Stabilisierung der Bindung der freigesetzten Proteine über kovalente Serotonylierung [67].

2.7.3 Thrombozyten-Aggregation

Die Aggregation bezeichnet die Akkumulation von Thrombozyten untereinander zu einem Thrombus [60,62] und wird durch GPIIb/IIIa ermöglicht. GPIIb/IIIa ist das häufigste Glykoprotein der Thrombozytenoberfläche [57], bedeckt im nicht aktivierten Zustand 50% der Thrombozytenoberfläche und dessen Zahl kann durch Exozytose der α -Granula erhöht werden [60,69,85]. In der aktiven, offenen Konformation bindet GPIIb/IIIa lösliches Fibrinogen aus dem Plasma und führt zu Fibrinogenbrücken zwischen zwei Thrombozyten [56]. Dies ermöglicht die feste Bindung der Thrombozyten untereinander und macht GPIIb/IIIa zum wichtigsten adhäsiven Rezeptor für die Thrombozytenaggregation [56,57]. Die Aktivierung des Thrombozyten durch Bindung von Liganden, z. B. Fibrinogen, mit Konformationsänderung zu einem offenen GPIIb/IIIa, wird als „outside-in-signaling“ bezeichnet. Lösliche Agonisten wie z.B. ADP, Epinephrine, Thromboxan A_2 und Thrombin sowie Adhäsionproteine wie z.B. Kollagen und vWF induzieren rezeptorvermittelt Signaltransduktionswege, die via „inside-out-signaling“ zu einer Konformationsänderung und Aktivierung des GPIIb/IIIa führen. Die Aktivierung durch schwache Agonisten wie ADP führt nur zu einer geringen Aktivierung und vorübergehenden Öffnung des Rezeptors [67]. Es braucht daher eine kontinuierliche Aktivierung um den Rezeptor durch diese Agonisten im offenen Zustand zu halten [86].

Das „Clustern“ von aktivem GPIIb/IIIa löst eine „out-side-in Signaling“-Kaskade aus [57]. Diese Kaskade führt zur thrombozytenabhängigen Thrombusretraktion und Stabilisierung des selbigen [57].

2.8 Bildung thrombozytärer Mikropartikel

Stark aktivierte Thrombozyten schnüren kleine zytoplasmaartige Membranpartikel ab, die Mikropartikel (MP) [56]. Sie werden besonders unter hohem Scherstress gebildet und sind durch eine zusätzliche prokoagulatorische Oberfläche [62,69] auch gerinnungsaktiv [56]. MP können sich prinzipiell von fast allen Zellen und Blutzellen abschnüren als Reaktion auf zellulären Stress, zum Beispiel in der Apoptose [87]. Sie entstehen besonders häufig aus Thrombozyten [88], die durch starke Agonisten,

wie Kollagen und/oder Thrombin aktiviert werden [89]. Sie sind kein pathologisches Erscheinungsbild, sind aber bei Patienten mit hohem thrombotischem Risiko oder mehreren thrombotischen Ereignissen erhöht [89]. Sie messen 0,1-1µm, haben einen hohen Gehalt an negativ geladenen Phospholipiden, insbesondere Phosphatidylserin in ihrer Membran und exprimieren Tissue Factor (TF) (wichtiger Initiator der Blutgerinnung), was sie zu einer hochpotenten prokoagulatorischen Oberfläche macht [90]. Mit ihrer hohen Expression an negativen Phospholipiden bilden sie eine optimale Oberfläche für die Zusammensetzung des Tenase- und Prothrombinasekomplex und besitzen spezifische Rezeptoren für Faktor VII und Faktor V [89].

2.9 COAT (“COllagen And Thrombin activated platelets”)-Thrombozyten

Thrombozyten, die gleichzeitig mit Kollagen und Thrombin stimuliert werden, bilden zu einem bestimmten Prozentsatz (20-40%) sogenannte COAT Thrombozyten [91]. Diese exprimieren viele prokoagulatorische Proteine, wie Faktor V thrombozytären Ursprungs aus den α -Granula [92], aber auch weitere adhäsive Proteine. COAT Thrombozyten exprimieren eine deutlich höhere Konzentration an Phosphatidylserin, als Thrombozyten, die nur durch einen einzelnen Agonisten aktiviert werden [92]. Durch diese prokoagulatorische Eigenschaft (vermehrte Phosphatidylserin-Exposition), aber besonders durch die hohe Expression von FV (wird durch Thrombin zu FVa gespalten) der mit stärkster Affinität den FXa bindet [92], bieten die COAT Thrombozyten die besten Bedingungen für die Zusammensetzung des Prothrombinase Komplexes. Auch die Bindungsstärke von GPIIb/IIIa zu seinen Liganden scheint bei COAT Thrombozyten verstärkt zu sein [93]. Szasz und Dale fanden heraus, dass Oberflächenproteine von COAT Thrombozyten in höherem Maße durch Serotonin vermittelte Transglutaminase Reaktion auf den COAT Thrombozyten verankert sind [93]. Ein vorstellbares Modell der COAT Thrombozyten ist, dass adhäsive und prokoagulatorische Proteine aus den α -Granula nach Exozytose mit Serotonin konjugiert werden. Serotonin seinerseits bindet an einen noch unbekanntem Serotoninrezeptor der Thrombozytenmembran [93]. Dadurch ist die Bindung von Fibrinogen an den GPIIb/IIIa, und FV an Phosphatidylserin, wie beobachtet, verstärkt [93]. Dies resultiert in einer hohen Prothrombinase Aktivität und einer starken prokoagulatorischen Eigenschaft der COAT Thrombozyten. Die

doppelte Stimulation, die für diesen Zustand notwendig ist, ist für Extremsituation der Hämostase gedacht. Entsteht sie aber in inadäquaten Situationen, bildet sie ein thrombotisches Risiko [93].

2.10 Rolle der Thrombozyten in der sekundären Hämostase

Thrombozyten-Aggregate müssen zum erfolgreichen Wundverschluss stabilisiert werden [56]. Dazu nutzt der Körper das „klebrige“ Fibrin [56]. Fibrin liegt als inaktive Vorstufe, das sogenannte Fibrinogen, in hoher Menge im Blutplasma vor. Fibrinogen besteht aus drei Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken verbunden sind [94] und durch Thrombin in der Endstrecke der Gerinnungskaskade zu Fibrin gespalten werden [62]. Durchgesetzt hat sich das Modell der zellbasierten Koagulation, bei der die Thrombingenerierung auf der Oberfläche von Blut- und Endothelzellen lokalisiert ist [95]. Durch die räumliche Nähe können sich die Gerinnungsfaktoren gegenseitig aktivieren und begrenzen damit die Gerinnung auf den Ort des Traumas [96]. Die Thrombingenerierung erfolgt in drei Phasen: Initiierung, Priming & Propagation [95].

Am Ort einer Gefäßverletzung oder Entzündung, kommen TF-präsentierende Zellen, z.B. Fibroblasten, in Kontakt mit Blut [97]. Über mehrere Schritte kommt es durch Zusammenlagerung von Faktor Xa mit seinem Kofaktor FVa zum Entstehen des Prothrombinase Komplexes [57] mit einer initialen kleinen Menge an produziertem Thrombin [62,69]. Diese kleine Thrombinmenge reicht nicht zur Fibrinbildung und Stabilisierung des Thrombus aus, sondern hat eine regulatorische Rolle. Sie führt zur (weiteren) Aktivierung der Thrombozyten über die Thrombin spezifischen Rezeptoren: Protease-activated receptors (PAR) 1 und 4 (humane Thrombozyten), die sich auf der Thrombozytenoberfläche befinden [56,57]. Vor allem der PAR-1 ist der entscheidende Rezeptor in der Aktivierung der Thrombozyten. Seine Wirkung wird durch PAR-4 unterstützt [57]. Auch die Bindung von Thrombin über das Glykoprotein (GP) I α ist essentiell für die Expression prokoagulatorischer Merkmale und die nachfolgende exponentielle Thrombingenerierung [98]. Wie Kollagen führt Thrombin zur Translokation von negativ geladenen Phospholipiden der inneren Schicht der Plasmamembran auf die äußere Schicht der Plasmamembran („Flip-Flop“ Mechanismus). Der Anteil an Phosphatidylserin auf der Außenmembranseite steigt aber nur moderat von 2 auf ca. 12% [69], die dann als Bindungsstellen für

Gerinnungsproteine dienen [69]. Einerseits binden diese an die negativen Phospholipide über Ca^{2+} Ionen und andererseits über hochspezifische Rezeptoren für Gerinnungsfaktoren [69]. Im engen räumlichen Verhältnis und vor Inhibitoren geschützt [69], können sich der Tenase Komplex (FIXa, FVIIIa, FX, Ca^{2+} , Phospholipid) und der Prothrombinase Komplex (FXa, FVa, FII, Ca^{2+} , Phospholipid) optimal zusammensetzen. Die Spaltung von Prothrombin zu Thrombin wird in Gang gesetzt [99]. Es entsteht der, für die Propagationsphase typische „Thrombin induzierte Thrombinburst“ [56]. Diese großen Thrombinmengen sind nun in der Lage genügend Fibrinogen in Fibrin umzuwandeln, um ein stabiles Fibrinnetz zu bilden [69].

Die Regulationsmechanismen während der Propagationsphase sind nicht vollständig geklärt. Jedoch wird der Protein-Disulfid-Isomerase (PDI) als bedeutende Thiol-Isomerase eine regulatorische Rolle zugeschrieben [95].

2.11 Die Rolle von extrazellulärer PDI für die Thrombozytenfunktion und für die Thrombin-induzierten Thrombingenerierung auf der Thrombozyten-Oberfläche

Die PDI ist ein intrazelluläres Enzym des endoplasmatischen Retikulums (ER), das eine „Chaperone-Funktion“ innehat und die Faltung von Proteinen über Bildung und Zerstörung von Disulfidbrücken katalysiert [100]. PDI wurde nun auch auf der Oberfläche von Thrombozyten lokalisiert [101] und wird als bedeutendste der Thiol-Isomerasen angesehen [95]. Dort konnte dem Enzym die Beeinflussung der Adhäsion [102], der Integrinaktivierung [103], der Granulasekretion und der Aggregation [104] nachgewiesen werden. PDI verstärkt die Affinität von GPIIb/IIIa durch Disulfid abhängige Konformationsänderungen des Integrins und verhilft somit zu stabileren Fibrinogenbrücken zwischen den Thrombozyten [60,69,103]. PDI spielt auch eine wichtige Rolle als Modulator in der Propagationsphase der Thrombingenerierung [95]. Es reguliert die Bindung der Gerinnungsfaktoren an Thrombin-stimulierte Thrombozyten, die in Abwesenheit von PDI deutlich verringert ist [95]. Auch die Thrombingenerierung ist ohne PDI deutlich verringert [95]. Der extrazelluläre Austausch von Disulfidbrücken durch PDI ist maßgeblich an der Verstärkung der oberflächlichen Thrombingenerierung von *in vitro* stimulierten Thrombozyten beteiligt [95].

2.12 Thrombozytäres mitochondriales Membranpotenzial

Das mitochondriale Membranpotenzial (MMP) wird durch die Atmungskette zwischen der Innen- und Außenseite der inneren Membran der Mitochondrien aufgebaut. Mitochondrien stellen für die metabolisch sehr aktiven Thrombozyten wichtige Energie zur Verfügung [105]. Besonders bei der Thrombozyten-Aktivierung und der Exozytose der Granula ist der Energieverbrauch noch weiter erhöht [106]. Allerdings erfüllen die Mitochondrien der Thrombozyten noch eine regulatorische Rolle, in dem sie die Funktion der Thrombozyten beeinflusst [107]. Es ist schon länger bekannt, dass die Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran in zellkernhaltigen Zellen zur Apoptose führt [108]. Auch bei Thrombozyten, die keinen Zellkern besitzen, sind ähnliche Signalwege beobachtet worden, sodass auch bei Thrombozyten die Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran zum „Untergang“ des Thrombozyten führt [109]. Neuerdings wurde außerdem nachgewiesen, dass die Hyperpolarisation der inneren Mitochondrienmembran und dadurch die Erhöhung des mitochondrialen Membranpotenzials mit der Aktivierung von Thrombozyten assoziiert ist [107]. Es wird vermutet, dass dies über die Bildung von Sauerstoffradikalen vermittelt wird. Dieser Effekt konnte schon bei Diabetikern beobachtet werden, bei denen die Hyperglykämie-induzierter Hyperpolarisation mit erhöhter Thrombozytenaggregation in Verbindung gebracht wurde [110]. Die Veränderung des mitochondrialen Membranpotenzials ist ein wichtiger Marker des zellulären-Stress und der pro-thrombotischen Funktion der Thrombozyten. Bereits kleine Änderungen des Membranpotentials können anhand des JC-1 Farbstoffes gemessen werden [111] und machen ihn zu einem effektiven Marker zum Messen von zellulärem Stress. Das JC1 ist ein spezifisches carbocyanin Multimer, das 1937 durch den amerikanischen Forscher Edwin E. Jelley entdeckt wurde. Die Carbocyanine gehören zu den elektrochromen Farbstoffen, die sich zwischen zwei Kompartimenten je nach Membranpotential verteilen [111]. JC1 ist lipophil und kann dadurch gut Membranen passieren. Es ist außerdem positiv geladen und lagert sich an negativ geladene Strukturen, wie die innere Mitochondrienmembran an [112].

3 Materialien und Methoden

3.1 Geräte

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Geräte und deren Hersteller

Gerätebezeichnung	Typ	Hersteller
Automatisches Hämatologie-Analysegerät	Sysmex KX-21N	Sysmex Deutschland GmbH (Hamburg)
Durchflusszytometer	BS FACS Canto II	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Kolbenhub-Einkanalpipetten	Eppendorf Research Plus®, variabel 0,1-2,5 µl Research Plus®, variabel (Wesseling) 0,5-5 µl Research Plus®, variabel 2-20 µl Research Plus®, variabel 10-100 µl Research Plus®, variabel 20-200 µl Research Plus®, variabel 100-1000 µl	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH (Wesseling)
Magnetrührer	NeoMag D-6010	NeoLab® (Heidelberg)
Orbital Shaker	DOS-10L	NeoLab® (Heidelberg)
pH/ORP-Meter	HI 2211	Hanna Instruments GmbH (Kehl am Rhein)
Präzisionswaage	CPA 1003P	Sartorius AG (Göttingen)
Vortexer	Neo-Vortex D-6012	NeoLab® (Heidelberg)
Wasserbad (mit Einsätzen)	ED-AP (042) (5A max. 60°C)	Julabo GmbH (Seelbach)
Zentrifuge	Allegra X-30R (Rotoren: SX4400)	Beckmann Coulter GmbH (Krefeld)

3.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Die in dieser Arbeit verbrauchten Materialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
1,5 ml- Reaktionsgefäße	Safe Seal Gefäß (1,5 ml)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
50 ml Polypropylen-Röhrchen mit konischem Boden	Cellstar Tubes 50 ml, PS	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
5ml Reagenz-Röhrchen	Polystyrol	A.Hartenstein GmbH (Würzburg)
Blutentnahmeröhrchen	Monovette® (10 ml) mit Antikoagulans: 0,106 M Citrat	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Kanüle mit Schlauch zur Blutentnahme	Safety-Multifly®-Set 21G plus Adapter 0,8x19 mm	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Latexhandschuhe	Sempercare® Premium	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG (Neuwied)
Pipettenspitzen	TipOne 0,1-10 µl TipOne 1-200 µl TipOne 1000 µl	Star Lab GmbH (Hamburg)
Reaktionsgefäße	SafeSeal Gefäße (1,5 mL)	Sarstedt AG & Co., (Nümbrecht)
Transferpipetten	Einmal-Pasteurpipetten mit integriertem Saugball 3,5 ml	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)

3.3 Reagenzien

Tabelle 5: Die in dieser Arbeit eingesetzten Reagenzien und deren Bezugsquelle

Bezeichnung	(Stamm-) Lösung	Bezugsquelle
1% (v/v) Formaldehyd	37% (v/v) Formaldehyd verdünnt mit PBS, pH 7,4	Carl Roth GmbH + KO. KG (Karlsruhe)
Adenosin 5'-diphosphat-Natriumsalz (ADP)	5 mM ADP in 0,9 % (w/v) NaCl	Sigma-Aldrich GmbH (USA)
Ca ²⁺ Ionophore A23187	10 mM in DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich GmbH (USA)
Convulxin (Heterodimeric C-Type lectin)	100µg/ml gelöst in HBSS, pH 7,4	Enzo Life Sciences, Inc. (Lörrach)
DMSO (Dimethyl sulfoxide)		Merck KGaA (Darmstadt)
Fibrinogen Alexa 488	1 mg/ml in HBSS, pH 7,4	ThermoFischer Life Technologies GmbH (Ober-Olm)
GPRP (H-Gly-Pro-Arg-Pro-OH)	125 mM in 0,9% (w/v) NaCl	Bachem Distribution Services GmbH (Schweiz)
HBSS (Hank's balanced Salt Solution)		gibco® by life Technologies GmbH (Ober-Olm)
JC1 – Mitochondrial Membrane Potential Dye 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide	5 mM in DMSO	Thermo Fischer Scientific Inc. (USA)
Mepacrine (Quinacrine dihydrochloride)	100 mM in PBS pH 7,4	Sigma-Aldrich GmbH (USA)
Natriumhydroxid (NaOH)	2 mol/l	Merck Chemicals

		GmbH (Darmstadt)
PBS (phosphate buffered solution, phosphatgepufferte Salzlösung) KCl 2,7mM NaCl 140 mM Phosphat 10 mM	10x PBS-Fertigprodukt 1:10 in ddH ₂ O; pH 7,4	
PBS Puffer 10x	Pulver	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Ristocetin Sulfate	15 mg/ml in 0,9% NaCl	American biochemical & Pharmaceuticals Ltd. (USA)
Salzsäure (HCl)	2 mol/l	Carl Roth GmbH + KO. KG (Karlsruhe)
Thrombin (bovin)	100 U/ml in 0,9 % (w/v) NaCl	Sigma-Aldrich GmbH (USA)

3.4 Antikörper

Tabelle 6: Die in dieser Arbeit eingesetzten Antikörper, deren Konjugation und Bezugsquelle

Antikörper gegen	Klon	Isotyp	Konjugation	Bezugsquelle
human CD62P (P-Selektin)	AK-4	Maus, IgG1 κ	FITC	Becton Dickinson (USA)
human CD63	H5C6	Maus, IgG1 κ	FITC	Becton Dickinson (USA)
Human LAMP 1 (CD107a)	H4A3	Maus, IgG1 κ	FITC	Becton Dickinson (USA)
Maus-IgG	MOPC-21	Schaf IgG1, κ	FITC	Sigma-Aldrich

				(USA)
human aktiviertes GPIIb/IIIa (PAC 1)	SP2 / BALB/c	Maus, IgG1 κ	FITC	Becton Dickinson (USA)
Protein Disulfid Isomerase	JAD 1	Maus IgG2b		Dianova (Hamburg)
Von Willebrand Faktor	polyklonal	Schaf, IgG	FITC	Bio-Rad Laboratories, Inc. (USA)

3.5 Software

Tabelle 7: Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Software-Programme und deren Hersteller

Software	Hersteller
BD FACSDIVA Software © Becton, Version 6.1.3	BD Bioscience (USA)
GraphPad Prism, Version 8	GraphPad Software, Inc. (USA)
Mendeley – Reference Management Software	Mendeley Ltd.
Microsoft Office für iOS: Word, Excel	Microsoft Corporation (USA)
Sysmex-Software; Version 1KXNH 00- 10	Sysmex Europe (Hamburg)

3.6 Studiendesign

Die Datenerhebung in dieser Arbeit erfolgte im Rahmen der monozentrischen, vom BMBF geförderte grundlagenforschungsorientierte „proof-of-concept“ Studie zur „Untersuchung der Thrombozyten- und Leukozyten-Funktion bei Patienten mit Essentieller Thrombozythämie (ET)“. Die erhobenen Daten sollen helfen, bestimmte

Schlüsseleränderungen in der Aktivierung von Thrombozyten bei ET Patienten zu erkennen. Diese können dann im Rahmen einer prospektiven Studie mit größerem Probandenkollektiv auf ihre Validität getestet werden.

3.7 Probanden und Patienteneinschluss

3.7.1 Fallzahl

Das Ziel der Studie und dieser Arbeit ist die Generierung von Hypothesen über die individuellen Risikofaktoren und intravaskulären Pathomechanismen bei ET Patienten, die in weiteren prospektiven Studien überprüft werden können. Die durchgeführten Versuche sind vielfältig und untersuchen die vielen verschiedenen Aktivierungswege und -rezeptoren. Die Fallzahl der Studien ist mit 19 Neueinschlüssen gering, dafür konnte eine große Bandbreite an Untersuchungen durchgeführt werden.

3.7.2 Genehmigung

Die Rekrutierung der Patienten sowie die Labormessungen wurden im Rahmen der Studie „Untersuchung der Thrombozyten- und Leukozyten-Funktion bei Patienten mit Essentieller Thrombozythämie (ET)“ (Hauptprüfer: PD Dr. med. Thomas Kindler, III. Medizinische Klinik und Poliklinik, Universitätsmedizin Mainz) durchgeführt. Vor Studienbeginn und Einschluss der ersten Patienten wurde das Studienprotokoll dem Ethik-Komitee der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz vorgelegt und durch dieses genehmigt (837.262.16 (10581) 04.08.2016).

3.7.3 Patienten-/Probandenrekrutierung und Ein-/ Ausschlusskriterien

Die Rekrutierung der Patienten mit ET erfolgte in Kollaboration mit der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz im Rahmen der monozentrischen Studie innerhalb der Universitätsmedizin Mainz.

Es wurden 19 Patienten mit ET in die Studie aufgenommen mit folgenden Einschlusskriterien:

- Bestätigte Diagnose einer ET nach den WHO Kriterien
- Alter > 18 Jahre

- Bestätigte *JAK2 V617F* oder *CALR* Mutation
- Schriftliche Einwilligungserklärung

Ausschlusskriterien waren:

- Leukozytenzahl > 20.000/ μ l
- Patienten mit akutem/subakutem thromboembolischem Ereignis (innerhalb der sechs Wochen vor Einschluss in die Studie)
- Schwangerschaft
- ET Patienten mit *cMPL* Mutation
- ET Patienten unter Interferon-alpha Therapie
- Unfähigkeit oder Verweigerung die Einwilligungserklärung zu unterschreiben

Als Vergleichskollektiv wurde 10 gesunde Probanden sowohl ohne ASS Einnahme als auch nach 3 tägiger ASS 100 mg 1x täglich Einnahme untersucht. Das positive Ethikvotum für die Probandenstudie „Physiologie und Biochemie der Wechselwirkung zwischen human Zellen des vaskulären Kompartiments“ lautet 837.302.12(8403-F)/2018-13290_1-Klinische Forschung.

3.8 Datenschutz, Dokumentation und Datenspeicherung

Bei dieser Pilotstudie wurden im Rahmen der DSGVO der Datenschutz und die ärztliche Schweigepflicht eingehalten. Die Teilnahme der Patienten war freiwillig und die Zustimmung wurde nach Aufklärung durch Unterschrift der Einwilligungserklärung schriftlich festgehalten. Neben der Durchführung der Versuche im Labor wurden persönliche Daten über Alter, Geschlecht, aktueller Gesundheitsstatus inklusive Medikation, Krankheitsgeschichte (thromboembolische Ereignisse, Blutungen), pseudonymisiert und gespeichert. Die Pseudonymisierung erfolgte nach der der EU Datenschutzgrundverordnung so, dass personenbezogene Daten nicht einer spezifischen betroffenen Person zugeordnet werden können. Die Speicherung der Daten erfolgte auf einem speziellen Server mit Zugriffskontrolle. Die Auswertung erfolgte durch Studienbefugte unter Beachtung der in der DSGVO beschriebenen Sicherheit der Verarbeitung von Daten.

3.9 Statistische Datenauswertung

Die in der Studie erhobenen Daten wurden zunächst in Microsoft Excel-Tabellen dokumentiert. Die Analyse und Darstellung der Ergebnisse der Studie erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism Version 8. Patienten- und Probandencharakteristika (Mittelwert mit Minimal- und Maximalwert, ggf. prozentualer Anteil) wurden in Tabellen aufgelistet.

Zur Visualisierung der Messergebnisse wurden Box-plots erstellt, die den Median bei nicht-parametrischen Daten, Mittelwert bei parametrischen Daten, 25. und 75. Percentile und Fehlerbalken mit Minimal und Maximalwerten darstellen.

Die statistische Auswertung erfolgte deskriptiv ohne Angaben von statistischer Signifikanz. Eine entsprechende Fallzahl-Analyse mit einer Power von 0,8 und einem Signifikanzniveau α von 0,05, hat für einen signifikanten Unterschied der thrombozytären Mepacrine-Aufnahme (als Maß für einen δ -„storage pool“ Defekt) eine Fallzahl pro Patientengruppe von 14 Patienten ergeben, die nicht im Studienzeitraum erfüllt werden konnte, da die ET Erkrankung zu den seltenen Erkrankungen zählt. Statistische Auffälligkeiten wurden bei Normalverteilung und Vergleich zweier Gruppen anhand des t-Test (unverbunden) und bei nicht normalverteilten Werten durch den Mann-Whitney Test ermittelt. Die Normalverteilung wurde anhand des Shapiro-Wilk Test ermittelt. Das Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) Mainz stand uns bezüglich Darstellung und Formulierung der Ergebnisse beratend zur Seite.

3.10 Venöse Blutentnahme

Für die nachfolgenden Versuche wurde antikoaguliertes Citratblut eingesetzt, das Patienten im Rahmen von Routineuntersuchungen entnommen wurde. Die Blutentnahme erfolgte in der vom Patienten aufgesuchten Ambulanz der III. Medizinischen Klinik (Hämatologische Ambulanz oder Gerinnungsambulanz) und wurde vom dortigen Personal durchgeführt.

Die Blutentnahme der Kontrollen erfolgte direkt in unserem Labor. Es wurden Sarstedt Safety-Multifly-Kanülen eingesetzt und punktierten in der Regel die Ellenbeuge (V. mediana cubiti, V. basilica/ cephalica antebrachii) mit Entnahme des Blutes in 10ml Sarstedt-Citrat-Monovetten.

Nach erfolgter Blutentnahme wurde mithilfe des Sysmex ein kleines Blutbild erstellt.

Damit konnten die typischen Blutzellparameter bestimmt werden.

3.11 Gewinnung von Plättchen-reichem Plasma (PRP)

Nach der Durchführung des kleinen Blutbildes, konnte das Plättchen-reiche Plasma hergestellt werden, das für die Untersuchung der Thrombozytenaktivierung notwendig war. Hierfür wurde das Vollblut zunächst für 10 min mit 200 xg und niedriger Bremse bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert.

Im Anschluss an die Zentrifugation war die Blutprobe in drei Phasen aufgeteilt, mit dem PRP als oberste Phase. Dieses wurde mithilfe einer Polypropylen-Pasteurpipette entnommen, unter Beachtung den „Buffy Coat“ der Leukozyten zwischen Erythrozyten und Blutplasma im sedimentierten Zustand nicht zu entnehmen. Anschließend wurde erneut die Thrombozytenkonzentration im PRP im Sysmex gemessen.

3.12 Durchflusszytometrie

3.12.1 Allgemeines Versuchsprinzip

Die Durchflusszytometrie ist eine weit verbreitete Methode um Partikel eines heterogenen Gemischs zu analysieren, einer Gruppe zuzuordnen und spezielle Eigenschaften darzustellen [113]. Sie nutzt das Prinzip der Streuung von Licht, wenn ein Partikel die Lichtquelle passiert und das sich daraus ergebende spezifische Muster. In diesem Sinne kann die Vorwärts- und die Seitwärtsstreuung unterschieden werden, die in Zusammenschau für eine Zellgruppe einzigartig ist. In einem heterogenen Gemisch können Zellen mit gleichen Eigenschaften identifiziert und gruppiert werden.

Die Vorwärtsstreuung (FSC, „forward scatter channel“) gibt Aufschluss über die Größe der gemessenen Zelle und wird horizontal der Achse des Lichtstrahls gemessen. Größere Partikel streuen mehr Licht als kleine. Dies ermöglicht bereits eine Einordnung der Größe der Zellen.

Die zweite gemessene Streuung des Lichtes ist die Seitwärtsstreuung (SSC, „side scatter channel“). Dafür wird das Licht in einem Winkel von 90° der Achse der Lichtquelle gemessen. Dies gibt zusätzliche Informationen über die passierenden Zellen, zum Beispiel über die Granularität und die internen Strukturen der Partikel.

Beide Streuungsrichtungen werden jeweils für einzelne Partikel bestimmt. Um verlässliche Ergebnisse zu bekommen, ist es wichtig, dass auch nur einzelne Partikel vor der Lichtquelle erscheinen. Durch das Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung können die Partikel einer bestimmten Probe geordnet werden und erscheinen so nacheinander vor der Lichtquelle. Die Probenflüssigkeit ist von einer zweiten Flüssigkeit umgeben, die eine durch eine laminare Strömung und einen schnelleren Fluss die ungeordneten Partikel ordnet. Somit kommt es beim Einsaugen der Probenflüssigkeit nicht zum Verstopfen der Messkapillare. Die Flüssigkeit wird aufgesogen und passiert ein komplexes System an Lichtquellen, Verstärkern und Detektoren. Am häufigsten wird als Lichtquelle ein Laser mit einzelner Wellenlänge genutzt. Jede verursachte Lichtstreuung wird über Detektoren aufgenommen. Ein Strom wird erzeugt, der durch Photomultiplier potenziert und messbar gemacht wird. Die Intensität des erzeugten Signals wird gemessen und graphisch aufgetragen.

Um Zellen anhand bestimmter Merkmale zu differenzieren oder zum Nachweis von bestimmten Epitopen auf den untersuchten Zellen, kann man Fluorochrom-markierte Antikörper nutzen. Diese Antikörper binden spezielle Strukturen, gegen die sie gerichtet sind und können anhand der Fluoreszenz, die sie ausstrahlen, gemessen und quantifiziert werden.

Fluorophore sind an Makromoleküle gekoppelte Fluorochrome und helfen als fluoreszierende Marker die Expression von Proteinen oder Nukleinsäuren sichtbar zu machen.

Das Prinzip der Fluoreszenz beschreibt, dass die Fluorochrome durch Licht in einer bestimmten Wellenlänge angestrahlt werden und auf ein höheres Energieniveau gebracht werden (Exzitation). Dieser instabile Zustand dauert jedoch nicht an und es kommt innerhalb von Nanosekunden zur Rückkehr in einen stabileren Zustand unter Emission von Licht, jedoch mit größerer Wellenlänge (Emission).

In den folgenden Versuchen wurde hauptsächlich das Fluorochrom FITC = Fluorescein isothiocyanate eingesetzt. Es absorbiert Licht bei 400-530 nm (Peak 490nm (Blau)) und es kommt zur Emission von grünem Licht bei 475-650nm (Peak 525nm). Der Anti-LAMP1-Antikörper ist mit Phycoerythrin (PE) gekoppelt. Dieses Fluorochrom absorbiert Licht bei einem Maximum von 496nm und emittiert Licht bei einer Wellenlänge von 578nm, was in den gelben Spektralfarbenbereich fällt.

Die Durchflusszytometrie erlaubt detaillierte Analysen des Phänotyps, des Aktivierungsmechanismus und der Signalisierung einzelner Thrombozyten. Auch eine Aussage über einen Thrombozyten δ -„storage pool“ Defekt (SPD) oder die Quantifizierung von spezifischen Faktoren, die von den Granula sezerniert werden, kann getroffen werden [67].

3.13 Versuchsvorbereitung

3.13.1 Thrombozytenfunktionstests

Das durch Zentrifugation aus Vollblut gewonnene PRP wurde für alle weiteren Schritte um einen Faktor 1:7 mit PBS, pH 7,4 verdünnt. Durch die Verdünnung konnte gewährleistet werden, dass die Thrombozytenkonzentration niedrig genug war, um eine adäquate Messung im Durchflusszytometer zu ermöglichen. In jeder Verdünnungsreihe gab es einen Leerwert, der die *ex vivo*/ basale Aktivierung der Thrombozyten widerspiegelte. In den restlichen Proben der Verdünnungsreihe wurden die Thrombozyten mit verschiedenen Agonisten in ansteigender Konzentrationen aktiviert. Die, die mit Thrombin aktiviert werden sollten, wurden zuvor mit dem Peptid GPRP (Glycin – Prolin – Arginin – Prolin) inkubiert, in einer Konzentration von 1,25 mM. Diese Aminosäuresequenz hemmt die Fibrin Polymerisierung und damit die Thrombusbildung. Bei der Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin durch Thrombin werden bestimmte Domänen freigelegt, über die sich die Fibrinmonomere dann spontan vernetzen. GPRP bindet diese Stellen und verhindert somit kompetitiv die Vernetzung der Fibrinmonomere [114].

3.13.1.1 *Thrombozyten-Agonisten:*

Die Agonisten wurde, mit Ausnahme der Leerwertprobe, in die Reagenz-Röhrchen in aufsteigender Konzentration vorgelegt. Auf diese Weise entsteht eine Reihe, in der Thrombozyten durch ansteigende Konzentrationen an Agonisten aktiviert werden (siehe Tabelle 8).

- Convulxin ist ein selektiver Agonist des Kollagen Rezeptors GPVI, isoliert aus dem Schlangengift der Südamerikanischen Klapperschlange (*Crotalus durissus terrificus*) [115].

- Thrombin aktiviert humane Thrombozyten über die Rezeptoren PAR-1, PAR-4 und den Korezeptor GPIIb/IIIa, spaltet Fibrinogen zu Fibrin und aktiviert Faktor XIII zu Faktor XIIIa zur Quervernetzung von Fibrin.
- Ristocetin ist ein Antibiotikum, das die elektrostatische Abstoßung zwischen vWF und GPIIb/IIIa reduziert und die Adhäsion der Thrombozyten an vWF ohne Scherkräfteinfluss ermöglicht [59,116].
- Ca²⁺ Ionophor A23187 ist eine Substanz, die selektiv divalente Kationen bindet, durch Membranen von intakten Zellen transportiert und dort wieder freilässt [117,118]. Bei niedrigen extrazellulären Konzentrationen an Kationen, kann Ca²⁺ Ionophor auch Kationen, in unserem Fall Ca²⁺ Ionen, aus intrazellulären Speicher binden und freisetzen [117,118]. Es werden dementsprechend umfassenden Thrombozyten-Aktivierungsprozesse, inklusive Granulasekretion und Aggregation ohne Rezeptor-vermittelte intrazelluläre Ca²⁺-Ausschüttung ausgelöst [118].

Tabelle 8: Agonisten-induzierte Aktivierung des jeweiligen funktionellen Thrombozyten-Markers

Marker Agonist	Fibrinog en	PAC-1	Mepacrine	CD62P	CD63	LAMP-1	vWF
Convulxin [ng/ml]	x	x	x	x	x	x	x
Thrombin [U/ml]	x	x	x	x	x	x	x
Thrombin [U/ml] + Convulxin [ng/ml]	x	x	x	x	x	x	x
Ca²⁺Ionoph or [μM]	x	x		x	x	x	
Thrombin [U/ml] + ADP [mM]				x			
Convulxin [ng/ml] + ADP [mM]				x			
Ristocetin [mg/ml]							x

In Tabelle 9 sind die Konzentrationen und Kombinationen der Agonisten dargestellt, die im Rahmen dieser Studie angewendet wurden:

Tabelle 9: Aufsteigende Endkonzentrationen an Thrombozyten-Agonisten

Tubes Agonist	I	II	III	IV	V
Ristocetin [mg/ml]	0	0,4	0,6	0,8	1
Convulxin [ng/ml]	0	1,25	2,5	5	20
Thrombin [U/ml]	0	0,025	0,05	0,1	0,2
Thrombin [U/ml] + Convulxin	0	0,025	0,05	0,1	0,2
	5 ng/ml				
Thrombin [U/ml] + ADP [mM]	0	0,025	0,05	0,1	0,2
	0,375 µM				
Convulxin [ng/ml] + ADP [mM]	0	1,25	2,5	5	20
	0,375 µM				
Ca²⁺Ionophor [µM]	20 µM	X	X	X	X

Zu den vorgelegten Agonisten wurde anschließend das 1:7 verdünnte PRP schwungvoll hinzugefügt, was die Reaktion und Aktivierung der Thrombozyten erlaubte, ohne dass man die Agonisten zusätzlich mit der Thrombozytensuspension durch Schwenken vermischen musste. Dies ist wichtig, da sonst der Kontakt zwischen den Thrombozyten provoziert wird und damit eine Thrombozytenaggregation ausgelöst wird, die eine Einzelanalyse im Durchflusszytometer unmöglich macht. Nach einer einheitlichen Reaktionszeit von 6 Minuten bei RT wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 100 µl von 1% Formaldehyd pro 100 µl Thrombozytensuspension (Endkonzentration: 0,5% Formaldehyd) und nachfolgender 30 Minuten Inkubation bei RT beendet.

Die Proben, die direkt im Anschluss mit dem PAC-1 Antikörper 15 Minuten bei RT inkubiert wurden, wurden noch nicht mit Formaldehyd fixiert. Erst nach der 15-minütigen Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 100 µl 1% Formaldehyd pro Röhrchen beendet.

Um die Thrombozyten ausreichend zu fixieren, wurde das überschüssige Formaldehyd erst nach einer Inkubation von 30 Minuten bei RT ausgewaschen. Dazu wurde dem Thrombozyten-Agonisten-Formaldehyd-Gemisch 1ml PBS hinzugefügt. Es folgte die Zentrifugation bei 800 xg, Acceleration maximal, Deceleration maximal für 10 Minuten bei RT. Die Thrombozyten sedimentierten am Boden des Röhrchens und der Formaldehydüberstand konnte durch Absaugen entfernt werden.

3.13.1.2 Thrombozytenaktivierungsmarker für die durchflusszytometrische Analyse:

Durch Fluorochrom-markierte Substanzen oder Antikörper konnten bestimmte Strukturen aktivierter Thrombozyten gebunden und nach standardisierten Methoden im Durchflusszytometer detektiert und quantifiziert werden .

- Bindung von vWF an die Thrombozytenoberfläche

Zum Nachweis der thrombozytären vWF Bindung über GPIIb/IIIa wurde der FITC-gekoppelte vWF Antikörper mit der Probe der unstimulierten und mit den bereits aktivierten und anschließend fixierten Thrombozyten 45 Minuten lang bei RT auf dem Schüttler bei 120 rpm inkubiert. Der anti-vWF AK wurde zuvor 1:100 mit PBS verdünnt und es wurde 5 µl pro 100 µl Thrombozytensuspension eingesetzt.

- Bindung von Fibrinogen-AI488 an die Thrombozytenoberfläche

Benutzt wurde humanes Fibrinogen konjugiert mit dem Fluorochrom Alexa Fluor 488. Das Fibrinogen bindet an das aktivierte GPIIb/IIIa und durch die durchflusszytometrische Messung der emittierten Fluoreszenz kann eine quantitative (und qualitative) Beurteilung zum Aktivierungszustand dieses Glykoproteins erfolgen. Das Fibrinogen-AI488 wurde mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml unmittelbar vor Aktivierung der Thrombozyten in das 1:7 verdünnte PRP beigemischt. Außerdem

wurde Fibrinogen-AI488 auch zu einer unstimulierten Kontrollen von Thrombozyten hinzugefügt.

- Bindung von PAC-1 an die Thrombozytenoberfläche

Zum Nachweis des aktivierten GPIIb/IIIa wurde 5 µl des PAC-1 Antikörper pro 100 µl Thrombozytensuspension in die unstimulierte Probe und nach der Aktivierung der Thrombozyten durch die Agonisten hinzugefügt. Anders als bei den anderen Antikörpern wurden die Thrombozyten erst nach der Inkubation mit dem PAC-1 Antikörper fixiert, da dieser die Fibrinogen-Bindungsdomäne des GPIIb/IIIa Rezeptor nur im unfixierten Zustand bindet.

- Thrombozytäre Mepacrine- Aufnahme *ex vivo* und –Freisetzung *in vitro*

Das Mepacrine wurde vor der Aktivierung der Thrombozyten in einer Endkonzentration von 5 µM in das PRP beigemischt und 10 Minuten lang bei RT inkubiert. Das Mepacrine wird in die δ-Granula aufgenommen und anschließend auf Agonistenreiz wieder ausgeschüttet [67]. Anhand beider Parameter kann die Funktion der δ-Granula beurteilt werden.

- Präsentation von CD62P, CD63 und LAMP-1 auf der Oberfläche von Thrombozyten

Die aktivierten Thrombozyten wurden mit einer Endkonzentration von 0,5% mit Formaldehyd fixiert. Zum Nachweis der Exozytose der α-Granula, der Exozytose der δ-Granula und Lysosomen und der Exozytose der Lysosomen wurden respektive die Antikörper CD62P, CD63, LAMP-1, in einer Endkonzentration von 1:20 zu den fixierten Thrombozyten hinzugefügt.

Nach Zugabe der Antikörper wurde die Thrombozyten durch kurzes Vortexen resuspendiert und mit den Antikörpern 45 Minuten bei RT auf dem Schüttler bei 120 rpm inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Thrombozyten-Antikörper-Gemisch mit 500µl PBS verdünnt. Auch die Fibrinogen- und Mepacrine-markierten Proben wurden nochmal mit 500µl PBS verdünnt und alle Proben konnten anschließend am Durchflusszytometer analysiert werden.

3.13.2 Durchflusszytometrische Analyse des mitochondrialen Membranpotentials

Für den Versuch bezüglich der Aufnahme des JC-1 Farbstoffes das mitochondriale Membranpotenzial der Thrombozyten *ex vivo* zu beurteilen, wurde auch PRP in 1:7 Verdünnung mit PBS benutzt, allerdings erfolgte keine Fixierung mit Formaldehyd.

100 µl wurden 30 Minuten mit 0,2 µl JC1 (Endkonzentration: 1 µM) im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 500 µL PBS, pH 7,4 wurde diese Probe am Durchflusszytometer gemessen.

Die ursprünglich geplante 1:10 Verdünnung des JC-1 in DMSO, von 5 mM zu 500 µM wurde fehlerhafter Weise nicht berücksichtigt. Nur bei dem Patienten ET 022 wurde die „stock solution“ vor der Inkubation mit dem PRP verdünnt. Da aber das Verhältnis von PE- zu FITC Fluoreszenz betrachtet wird und dieses von der Verdünnung unabhängig ist, wurde dieser Patient in die Datenanalyse miteinbezogen.

3.13.3 Durchflusszytometrische Analyse der Präsentation der PDI auf der Thrombozyten-Oberfläche

Der Nachweis von extrazellulärer PDI auf der Oberfläche der Thrombozyten von ET Patienten erfolgte an fixierten Thrombozyten. 500 µl des 1:7 verdünntem PRP wurden mit 500 µl 1% Formaldehyd (Endkonzentration: 0,5% Formaldehyd) 30 Minuten bei RT fixiert. Die Probe wurde anschließend mit 2 ml PBS gewaschen und bei 800 xg für 10 Minuten zentrifugiert. In zwei Reagenz-Röhrchen wurden jeweils 100 µl der fixierten Thrombozyten vorgelegt.

Eine fixierte Thrombozyten-Probe mit 100 µl wurde mit 1 µl anti-PDI Antikörper für 45 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubiert.

Die Markierungsreaktion wurde gestoppt durch Zugabe von PBS, pH 7,4 und es erfolgte die Zentrifugation bei 800 xg für 10 Minuten. Der Überstand wurde abgenommen und die Thrombozyten mit einem anti-Maus-IgG-FITC für weitere 30 Minuten bei RT inkubiert. Als Negativ-Kontrolle für die sekundäre Antikörpermarkierung wurde eine weitere fixierte Thrombozyten-Probe nur mit anti-Maus-IgG-FITC (Endkonzentration 1:150) ebenfalls für 30 Minuten bei RT inkubiert. Es erfolgte erneut das Waschen, die Zentrifugation und die Abnahme des Überstandes. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte anschließend am Durchflusszytometer.

3.14 Messung und Analyse der Thrombozyten-Proben im Durchflusszytometer

Die einzelnen Proben wurden anschließend am Durchflusszytometer gemessen. Die Proben wurden bei mittlerer Geschwindigkeit aufgesaugt und es wurden pro Probe 10.000 Events/Thrombozyten gespeichert. Die Detektorspannungen für die einzelnen Fluoreszenz-Filter zur Detektion des FITC und PE Fluorochroms waren konstant und standardisiert eingestellt worden.

Die Proben wurden einzeln gemessen, nachdem die Thrombozyten durch Vortexen in Suspension gebracht wurden. Ein Event wird als das Signal definiert, das ein Thrombozyt bei passieren des Lichtstrahls generiert. Unter Betrachtung der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung, oder der Vorwärtsstreuung und der Fluoreszenz konnten diese 10.000 Events graphisch dargestellt und wurden in einem „Dot Plot“ abgebildet. Es wurde ein P1 Areal abgegrenzt („gate“ rote markierte Zellen), in dem sich möglichst viele Thrombozyten als Einzelzellen, nicht als Zellaggregate befinden sollen. Dadurch wird die Analyse eines homogenen Zell-Pools gewährleistet, die Ausreißer nicht mitbeurteilt.

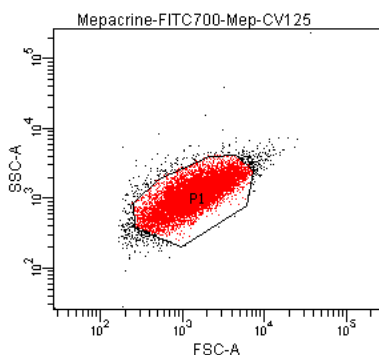


Abbildung 2: Exemplarischer Dot Plot einer Messung von Thrombozyten mit Mepacrine inkubiert und mit Convulxin 1,25 ng/ml aktiviert, Vorwärts- (FSC; X-Achse) gegen die Seitwärtsstreuung (SSC; Y-Achse) des Lichtes.

Die Mittelwert und der Median der gemessenen linearisierten Fluoreszenzwerte wurden tabellarisch aufgeführt. Diese Werte wurden in eine Excel Tabelle eingetragen und graphisch dargestellt, um die Veränderungen der Fluoreszenz der gemessenen Thrombozyten in Abhängigkeit der Konzentration der verschiedenen Agonisten zu beurteilen.

3.14.1 Analyse des mitochondrialen Membranpotenzials anhand von JC1

Im monomeren Zustand kommt es zu einer Emission von grünem Licht bei einer Wellenlänge von 527 nm [111]. Das JC1 kann sich auch zu Aggregaten zusammensetzen. Die Aggregate kommen in gesunden Zellen zustande, in dem sich die positiv geladenen JC1 Moleküle an der negativ geladenen inneren Mitochondrienmembran aneinander lagern [111]. In dem Fall beobachtet man eine Veränderung des emittierten Lichts, von grün zu rötlich-orange mit einer Wellenlänge von 590 nm [111]. Je negativer das Membranpotenzial der inneren Mitochondrienmembran ist, desto mehr akkumulieren die JC1 Monomere und desto stärker ist die rötlich-orangene Fluoreszenz [111]. Intakte Zellen weisen aggregiertes JC1 an der inneren Mitochondrienmembran, aber auch monomeres JC1 auf. Dementsprechend kann grüne und rote Fluoreszenz gemessen werden [111]. Bei Entkoppelung der Atmungskette, wie es in apoptotischen Zellen der Fall ist, kommt es zur Verschiebung des Verhältnisses zugunsten der Monomere [111]. Der Vorteil von JC1 als „dual-emission“ Indikator ist, dass man die aggregierte und monomere Form gleichzeitig messen kann. Da sie verschiedene Fluoreszenz-Emissionen aufweisen, kann man sie auch weiterhin differenzieren. Die Detektion von Veränderungen des Membranpotenzials beruht auf das Verhältnis der Fluoreszenz-Emissionen gemessen bei 590 nm und 520 nm und nicht auf die absolute Zu- oder Abnahme der Fluoreszenz [119]. In Anlehnung an den beschriebenen Quotienten von roter zu grüner Fluoreszenz wurde der Quotient der Fluoreszenzwerte für PE/FITC als Indikator für das mitochondriale Membranpotential in den Thrombozyten betrachtet [111].

3.14.2 Analyse der Protein Disulfid Isomerase auf der Thrombozytenoberfläche

Bei der Untersuchung der Protein Disulfid Isomerase wurde die Expression des Enzyms auf der Oberfläche der Thrombozyten betrachtet. Dazu wurde eine Probe mit anti-PDI AK aus der Maus inkubiert und im nachfolgenden Schritt mit einem FITC gekoppelten Schaf AK gegen Maus IgG-Proteine messbar gemacht. Die gemessene Fluoreszenz ist also proportional zur Menge an nachgewiesenem PDI auf der Oberfläche der untersuchten Thrombozyten. Um die unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers herauszurechnen, wurde eine Negativkontrolle angefertigt, die nur den Sekundärantikörper anti-Maus IgG-FITC beinhaltet. Die „Mean

fluorescence intensity“ errechnet sich durch die Subtraktion der unspezifischen Fluoreszenz der Negativkontrolle von der spezifischen Fluoreszenz der Probe mit anti-PDI AK.

4 Ergebnisse

4.1 Deskriptive Statistik

4.1.1 Patienten- und Probandencharakteristika

Insgesamt wurden Blutproben von 19 ET-Patienten, neu rekrutiert in einem Zeitraum von 09/2016-03/2019, und von je 10 Kontrollen mit und ohne ASS analysiert. Bei 14 ET-Patienten war die *JAK2* V617F Mutation präsent, fünf Patienten hatten eine *CALR* Mutation (vier *CALR* Typ 1, einer *CALR* Typ 2). Das mittlere Alter zum Einschluss und Untersuchungszeitpunkt betrug 67 Jahre mit Minimum/Maximum von 51-87 Jahren für *JAK2* V617F⁺ Patienten mit HU, 52 Jahre mit Minimum/Maximum von 31-73 Jahren für *JAK2* V617F⁺ Patienten ohne HU, 55,5 Jahre mit Minimum/Maximum von 42-72 Jahren für *CALR*⁺ Patienten mit HU und der *CALR*⁺ Patient ohne HU war zum Einschluss und Untersuchungszeitpunkt 28 Jahre alt (siehe Tabelle 10).

In der Kontrollgruppe mit ASS wurde ein mittleres Alter von 38,4 Jahren mit Minimum/Maximum von 23-68 Jahren ermittelt. In der Kontrollgruppe ohne ASS wurde zum Untersuchungszeitpunkt ein mittleres Alter von 39,5 Jahren mit Minimum/Maximum von 24-69 Jahren ermittelt (siehe Tabelle 12).

Weitere Charakteristika der Patienten und die wichtigsten kardiovaskulären Risikofaktoren lassen sich der Tabelle 10 entnehmen. Gezeigt werden zudem die hämostaseologischen Ereignisse, die bei den Patienten retrospektiv vorkamen. Mikrovaskuläre Symptome, Thrombosen und Blutungen waren in der Gruppe der ET Patienten mit *JAK2* V617F Mutation tendenziell häufiger als in der Gruppe der ET Patienten mit *CALR* Mutation. Auch hatten alle Patienten mit HU Therapie kardiovaskuläre Risikofaktoren, wobei nur etwas über die Hälfte der Patienten ohne HU kardiovaskuläre Risikofaktoren aufwiesen. Weiterhin sind in Tabelle 11 die Thrombozyten-, Leukozyten-, Erythrozytenkonzentration, der Hämoglobinwert und der Hämatokrit der Patienten aufgeführt. Bei den Patientengruppen unter HU Therapie ist die Thrombozytenkonzentration im Vergleich zur respektiven Gruppe ohne HU Therapie wie erwartet niedriger (siehe Tabelle 12).

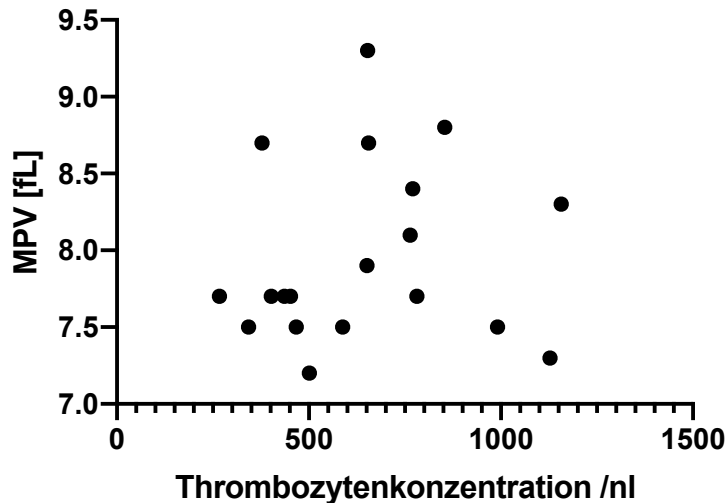


Abbildung 3: Korrelation zwischen der Thrombozytenkonzentration und des MPVs bei den untersuchten ET-Patienten nach Pearson. MPV= mean platelet volume = mittleres Thrombozytenvolumen.

In der Abbildung 3 wurde die Stärke des Zusammenhangs der Thrombozytenkonzentration mit dem mittleren Thrombozytenvolumen (= mean platelet volume = MPV) dargestellt. Graphisch und anhand des Korrelationskoeffizient $r = 0,1289$ konnte keine starke positive Korrelation beobachtet werden (p -Wert = $0,5991$, nicht statistisch auffällig), sodass man sagen kann, dass kein relevanter Zusammenhang zwischen dem mittleren Thrombozytenvolumen und der Thrombozytenkonzentration bei den hier untersuchten Patienten mit ET herrscht.

Tabelle 10: Klinische Angaben der Patienten mit ET nach Mutation und zytoreduktiver Therapie. Angabe als absolute bzw. relative Häufigkeit (n bzw. %). HU= Hydroxyurea; GIT= Gastrointestinaltrakt

	JAK2 V617F⁺ + HU n=6	JAK2 V617F⁺ - HU n=8	CALR⁺ + HU n=4	CALR⁺ - HU n=1
Alter zum Untersuchungszeitpunkt	67 (51-87)	52 (31-73)	55,5 (42-72)	28
Geschlecht				
männlich	3 (50 %)	0 (0 %)	2 (50 %)	0 (0%)
Weiblich	3 (50 %)	8 (100 %)	2 (50 %)	1 (100 %)

ASS Einnahme				
Ja	4 (67 %)	4 (50 %)	3 (75 %)	1 (100 %)
Nein	2 (33 %)	4 (50 %)	1(25 %)	
Dauer HU Einnahme vor der Untersuchung (Min – Max)	3 Jahre und 7 Monate (2 Monate – 11 Jahre und 9 Monate)		8 Jahre und 1 Monat (4 Jahre und 4 Monate – 10 Jahre und 2 Monate)	
Prävalenz eines „acquired von Willebrand Disease“	3/6 (50%)	6/8 (75%)	2/4 (50%)	0/1 (0%)
Kardiovaskuläre				
Risikofaktoren (ein oder mehrere zutreffend)	6 (100 %)	5 (62,5 %)	4 (100 %)	0
Arterielle Hypertonie	5 (83%)	4 (66,7%)	1 (25%)	0
Ehemaliger Nikotinabusus	0 (0%)	3 (37,5%)	1 (25%)	0
Aktueller Nikotinabusus	1 (14,3%)	0 (0%)	2 (50%)	0
Diabetes mellitus	1 (14,3%)	1 (14,3%)	0 (0%)	0
Dyslipidämie	2 (33,3%)	2 (25%)	1 (25%)	0
positive Familienanamnese	0 (0%)	1 (14,3%)	0	0
Mikrovaskuläre				
Symptome, n (%) (eines oder mehrere zutreffend)	3 (50%)	4 (50%)	1 (25%)	0
Parästhesien	1 (16,6%)	1 (12,5%)	0	
Kopfschmerzen	1 (16,6%)	3 (37,5%)	1 (25%)	
Visusstörungen	2 (33,3%)	2 (25%)	0	
Schwindel	2 (33,3%)	1 (12,5%)	1 (25%)	

Tinnitus/Hörschwäche	0	1 (12,5%)	0	
Thrombose, n (%) (eine oder mehrere zutreffend)	2 (33,3%)	3 (37,5%)	0	0
arteriell	2 (33,3%)	3 (37,5%)	0	
venös	2 (33,3%)	1 (12,5%)	0	
Blutung, n (%) (eine oder mehrere zutreffend)	5 (83,3%)	7 (87,5%)	1 (25%)	0
Hämatomneigung	4 (66,7%)	6 (75%)	2 (50 %)	
GIT/gynäkologische Blutung	1 (12,5%)	2 (25%)	0	
Muskeleinblutung	0	0	1 (25 %)	

Tabelle 11: Blutwerte der ET Patienten aufgeschlüsselt nach Mutationen und Therapie mit Hydroxyurea. Angegeben ist der Mittelwert mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

HU= Hydroxyurea.

*Werte nicht für alle Patienten verfügbar. Werte folgender Patienten wurden miteinbezogen: ET-001, ET-002, ET-003, ET-005, ET-006, ET-007, ET-010, ET-011, ET-012, ET-013, ET-015, ET-017, ET-021

	JAK2 V617F⁺ + HU	JAK2 V617F⁺ - HU	CALR⁺ + HU	CALR⁺ - HU
	n=6	n=8	n=4	n=1
Thrombozyten (x 10⁹/L)	550,17 (267-991)	656 (378-1157)	708,75 (436-1128)	854
davon >1000 x 10 ⁹ /L , n (%)	0	1 (14%)	1 (25%)	0
MPV	7,60 (7,5-7,7)	8,275 (7,5-9,3)	7,65 (7,2-8,4)	8,8
Leukozyten (x 10⁹/L)	8,58 (5-12,1)	7,6 (4,9-10,5)	5,45 (4,6-6)	5,7
Erythrozyten (x10⁶/µl)	4,08 (3,19-4,77)	4,66 (3,75-5,1)	3,03 (2,73-3,4)	3,88
Hämoglobin, g/dL	13,17 (10,6-	12,78 (10,9-	10,93 (9,7-	10,30

	14,9)	14,4)	12,3)	
Hämatokrit (%)	39,22 (34,8-44,2)	38,71 (33,4-42,2)	31,18 (27,7-34,5)	30,9
Fibrinogen (mg/dl) *	368 (301-468)	252,67 (197-291)	251,33 (184-291)	
vWF:Ag (%) *	126,67 (71-155)	84,8 (59-123)	120 (93-163)	
vWF:Akt (%) *	115,33 (54-146)	61,6 (43-82)	87,33 (72-115)	
vWF:Akt/vWF:Ag*	0,88 (0,76-0,95)	0,73 (0,67-0,83)	0,73 (0,70-0,77)	

Tabelle 12: Vergleichskollektiv mit gesunden Probanden nach 3 tägiger ASS Einnahme 100 mg einmal täglich und ohne ASS-Einnahme. Angegeben ist der Mittelwert mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

	Kontrollen mit ASS n= 10	Kontrollen ohne ASS n= 10
Alter zum Untersuchungszeitpunkt (Jahre)	38,4 (23-68)	39,5 (24-69)
Geschlecht (M/F)	5 (50%) / 5 (50%)	5 (50%) / 5 (50%)
Thrombozyten (x 10⁹/L)	236,10 (174-300)	227,6 (147-291)
Leukozyten (x 10⁹/L)	5,19 (4-6,5)	4,55 (2,9-5,7)
Erythrozyten (x 10⁶/µl)	4,35 (3,64-4,65)	4,32 (3,87-4,88)
Hämoglobin (g/dL)	12,92 (9,3-14,2)	12,81 (10,8-14,7)
Hämatokrit (%)	37,81 (29,3-40,8)	37,63 (32,3-43,1)

4.2 Explorative Datenanalyse

4.1.2 *Ex vivo* und Agonisten-induzierte Bindung des vWF an die Thrombozytenoberfläche

4.1.2.1 Basale Bindung von vWF an die Thrombozytenoberfläche

Die basale Bindung von vWF an der Thrombozytenoberfläche *ex vivo* war bei den Kontrollen ohne ASS wie zu erwarten niedrig. In diesem Zustand waren die Thrombozyten in Ruhe. Die Kontrollen mit ASS banden im Ruhezustand vermehrt vWF, was sich als statistisch auffällig zeigte ($p=0,0017$ im Mann-Whitney Test).

Die Thrombozyten der ET Patienten banden vermehrt vWF im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS. Statistisch auffällig erhöht zeigten sich die Basalwerte der Gruppen *JAK2 V617F* positiv mit ($p=0,0270$ im Mann-Whitney Test) und ohne ($p=0,0145$ im Mann-Whitney Test) HU gegenüber der Kontrollgruppe ohne ASS. Zudem war der Basalwert der *CALR* positiven Gruppe im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS statistisch auffällig erhöht ($p=0,0476$ im Mann-Whitney Test).

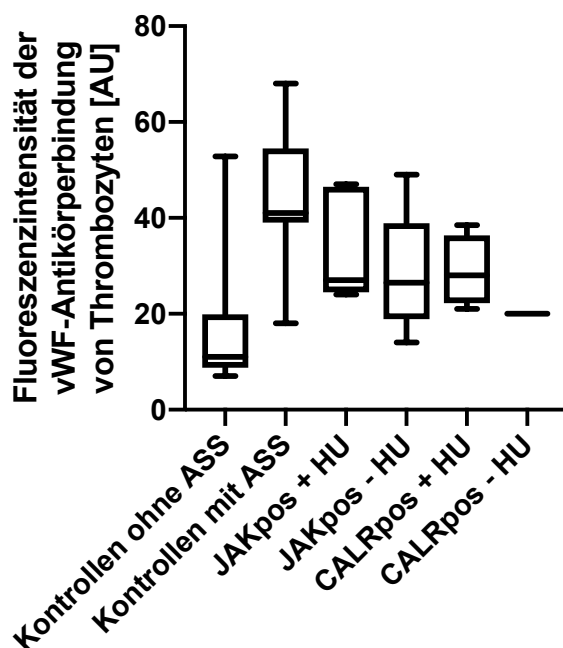


Abbildung 4: Basalwerte der thrombozytären vWF-Bindung ohne zusätzliche Agonistengabe. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

4.1.2.2 Thrombozytäre vWF Bindung nach Aktivierung mit Ristocetin

Unter dem Aktivierungsreiz von Ristocetin 1,0 mg/ml war eine deutliche Zunahme der Bindung von vWF in allen untersuchten Gruppen zu beobachten im Vergleich zum basalen *ex vivo* Wert.

Die vWF Bindung der Kontrollen mit und ohne ASS war nach der Aktivierung mit Ristocetin 1,0 mg/ml vergleichbar. Es zeigte sich auch in der statistischen Untersuchung keine Auffälligkeit.

Die ET Patienten wiesen eine tendenziell verminderte vWF Bindung gegenüber beiden Kontrollgruppen vor. Besonders die zwei ET Gruppen ohne HU banden auch nach Aktivierung durch Ristocetin 1,0 mg/ml deutlich weniger vWF auf der Thrombozytenoberfläche im Vergleich zu den respektiven Gruppen mit HU Therapie und beiden Kontrollgruppen. Die verminderte Bindung von vWF zwischen den ET Patienten mit *JAK2* V617F Mutation ohne HU Therapie und den Kontrollen mit (Mann-Whitney Test, $p = 0,0079$) und ohne (Mann-Whitney Test, $p = 0,0031$) ASS war statistisch auffällig. Da die Gruppe der *CALR* Patienten ohne HU nur einen Patienten enthielt, konnte kein statistischer Unterschied errechnet werden. Es zeigte sich außerdem die verminderte vWF-Bindung bei den Patienten mit *JAK2* V617F Mutation mit HU Therapie im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS statistisch auffällig (unpaired t-Test, $p = 0,0338$).

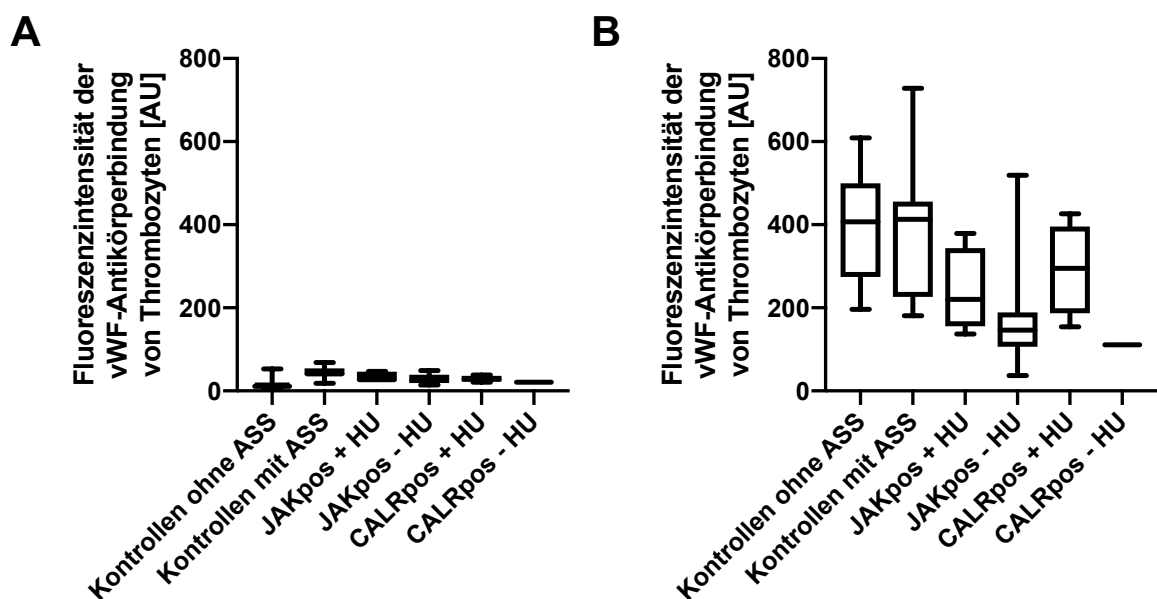


Abbildung 5: Thrombozytäre vWF Bindung ohne Aktivierung (A) und nach Aktivierung der Thrombozyten mit 1,0 mg/ml Ristocetin (B). Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

4.1.2.3 Thrombozytäre vWF Bindung nach Aktivierung mit Thrombin

Die vWF Bindung durch Aktivierung mit Thrombin als starker Agonist stieg in allen Gruppen deutlich an. Bei einer Thrombin Konzentration von 0,1 U/ml war die vWF Bindung der Kontrollgruppe mit ASS im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne ASS statistisch auffällig erhöht (Mann-Whithney Test, $p = 0,244$). Die ET Gruppen ohne HU Therapie deuteten aber eine verminderte vWF Bindung an. Dieser Unterschied war zwischen den Kontrollen mit ASS-Therapie und den Patienten mit *JAK2 V617F* Mutation ohne HU Therapie bei Aktivierung mit Thrombin 0,1 U/ml (unpaired t-Test, $p = 0,0008$) statistisch auffällig. Auch der Unterschied zwischen den Kontrollen mit ASS-Therapie und den Patienten mit *JAK2 V617F* Mutation mit HU Therapie bei Aktivierung mit Thrombin 0,1 U/ml (unpaired t-Test, $p = 0,0206$) zeigte sich statistisch auffällig.

Nach Aktivierung mit Thrombin 0,2 U/ml war keine nennenswerte Zunahme der vWF Bindung in allen Gruppen zu beobachten im Vergleich zur Aktivierung mit Thrombin 0,1 U/ml. Die vWF Bindung der Thrombozyten der beiden ET Gruppen ohne HU Therapie war im Vergleich zur respektiven ET Gruppe und zu den Kontrollgruppen wieder tendenziell vermindert. Statistisch auffällig war der Unterschied zwischen den Kontrollen mit ASS-Therapie und den Patienten mit *JAK2 V617F* Mutation ohne HU Therapie (Mann-Whithney Test, $p = 0,0009$). Auch der Unterschied zwischen den Kontrollen mit ASS-Therapie und den Patienten mit *CALR* Mutation mit HU Therapie (Mann-Whithney Test, $p = 0,0025$) zeigte sich statistisch auffällig.

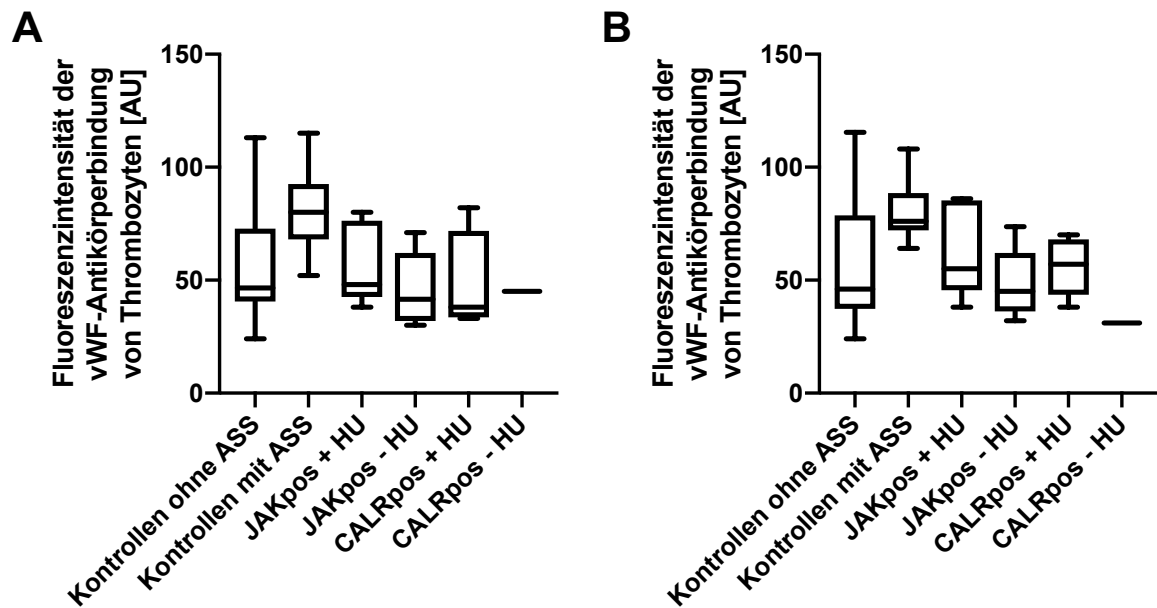


Abbildung 6: Thrombozytäre vWF Bindung nach Aktivierung durch Thrombin mit 0,1 (A) bzw. 0,2 U/ml (B). Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

4.1.2.4 Thrombozytäre vWF Bindung nach Aktivierung mit Convulxin

Die Bindung von vWF durch die Aktivierung über den Kollagenrezeptor GP VI, induziert durch Convulxin, stieg im Vergleich zum Basalwert in allen Gruppen an, je höher die hinzugegebene Convulxin Konzentration war. Bei der Aktivierung mit Convulxin 5 ng/ml waren die Mittelwerte der Kontrollgruppe mit ASS tendenziell erhöht gegenüber der Kontrollgruppe ohne ASS. Die ET Gruppen mit HU Therapie zeigten eine vergleichbare vWF Bindung wie die Kontrollen ohne ASS und eine tendenziell verminderte vWF Bindung als die der Kontrollen mit ASS. Bei den ET Gruppen ohne HU Therapie war die Bindungskapazität im Vergleich zu den respektiven Gruppen mit HU und zu beiden Kontrollgruppen verringert. Statistisch auffällig war die verminderte Bindung der Patienten mit *JAK2* V617F Mutation ohne HU Therapie zu beiden Kontrollgruppen (ohne ASS: Mann-Whitney Test, $p = 0,0003$, mit ASS: unpaired t-Test, $p = 0,0065$).

Bei der stärkeren Aktivierung bei 20 ng/ml Convulxin zeigten die Kontrollen mit ASS eine stärkere vWF Bindung als die Kontrollen ohne ASS (statistisch auffällig, unpaired t-test $p = 0,0028$). Die ET Patienten mit HU Therapie waren vergleichbar mit den Kontrollen ohne ASS, aber tendenziell vermindert im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS. Die Patienten mit *JAK2* V617F Mutation mit HU Therapie (unpaired t-Test, $p = 0,0144$) und die Patienten mit *CALR* Mutation mit HU Therapie (unpaired t-Test,

p = 0,0117) waren im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS-Therapie statistisch auffällig. Deutlicher wurde auch die stark verminderte vWF Bindung der ET Gruppen ohne HU Therapie. Die *JAK2 V617F* Patienten ohne HU Therapie waren im unpaired t-Test mit einem p-Wert von p < 0,0001 im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS statistisch auffällig vermindert.

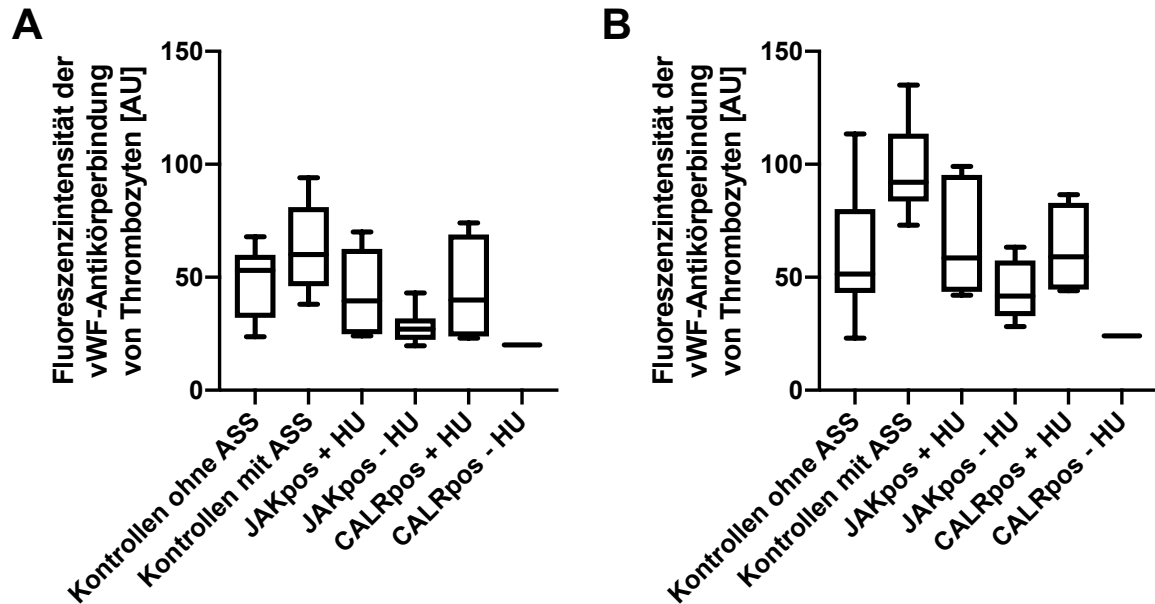


Abbildung 7: Thrombozytäre vWF Bindung nach Aktivierung durch Convulxin 5 ng/ml (A) bzw. 20 ng/ml (B). Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

4.1.2.5 Thrombozytäre vWF Bindung nach Aktivierung mit Thrombin und Convulxin

Bei Thrombin 0 U/ml + Convulxin 5 ng/ml waren beide Kontrollgruppen vergleichbar und die vWF Bindung der ET Gruppen im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen vermindert. Statistisch nennenswert war die verminderte vWF Bindung der Gruppe der ET Patienten mit *JAK2 V617F* Mutation ohne HU Therapie im Vergleich zu den Kontrollprobanden mit (unpaired t-Test, p = 0,0338) und ohne (unpaired t-Test, p = 0,0392) ASS. Auch die verminderte vWF Bindung der Gruppe der ET Patienten mit *JAK2 V617F* Mutation mit HU Therapie im Vergleich zu den Kontrollprobanden mit ASS (Mann-Whitney Test, p = 0,0440) war statistisch auffällig.

Die Kombination der beiden starken Agonisten Thrombin und Convulxin führte zu einer verstärkten Bindung von vWF in der Kontrollgruppe mit ASS, wobei die Kontrollgruppe ohne ASS niedriger blieb. Dies zeigte sich statistisch auffällig im unpaired t-Test (p = 0,0169). Auch die ET Patienten mit *JAK2 V617F* Mutation mit (unpaired t-Test, p = 0,0338) und ohne (unpaired t-Test, p = 0,0027) HU Therapie

und die ET Patienten mit *CALR* Mutation mit HU (unpaired t-Test, $p = 0,0027$) zeigten im Vergleich zu den Kontrollprobanden mit ASS eine statistische Auffälligkeit.

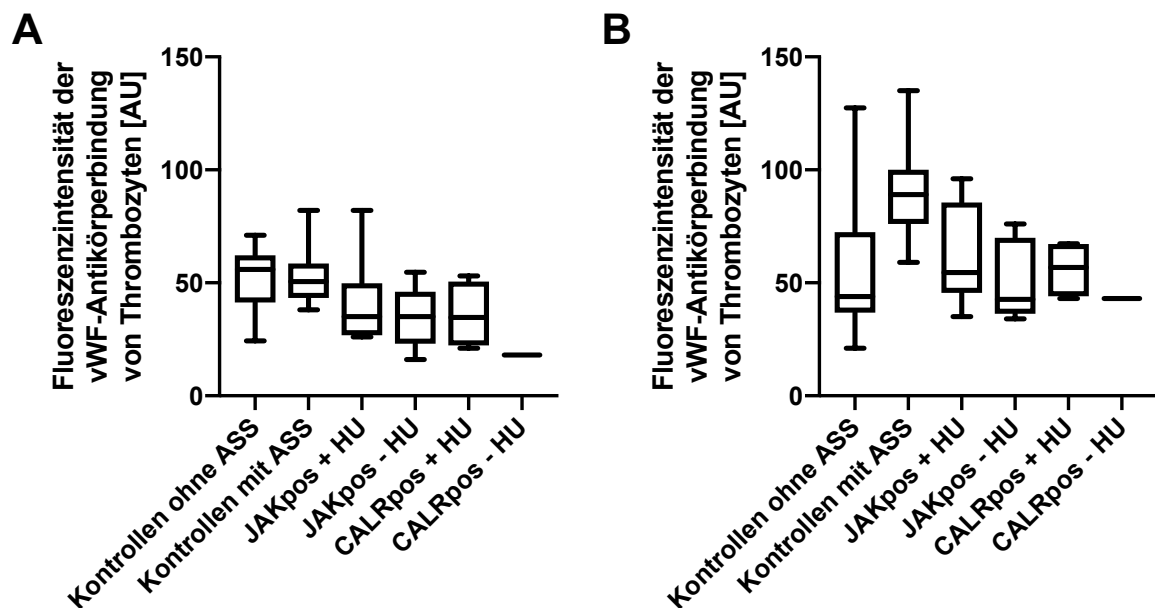


Abbildung 8: Thrombozytäre vWF Bindung nach Aktivierung durch Convulxin 5 ng/ml + Thrombin mit 0 U/ml (A) bzw. 0,2 U/ml (B). Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

4.1.3 *Ex vivo* und Agonisten induzierte Aktivierung des GPIIb/IIIa Rezeptors

In dieser Studie wurde der aktivierte GPIIb/IIIa Rezeptors anhand der Fibrinogen-Bindung und der PAC-1 Expression auf der Thrombozytenoberfläche untersucht.

4.1.3.1 Basale Aktivierung des GPIIb/IIIa Rezeptors

Im basalen Zustand war die Bindungskapazität von Fibrinogen auf der Oberfläche der Thrombozyten bei den Kontrollen ohne ASS tendenziell höher als bei den Kontrollen mit ASS allerdings nicht statistisch auffällig. Die Fibrinogenbindung der Thrombozyten der ET Gruppen war vergleichbar mit der, der Kontrollen mit ASS und tendenziell geringer als die, der Kontrollen ohne ASS. Die Ergebnisse zeigten eine statistisch auffällig verminderte Bindung von Fibrinogen der ET Patienten mit *JAK2* V617F Mutation mit HU Therapie (Mann Whitney Test, $p = 0,0067$), der ET Patienten mit *JAK2* V617F Mutation ohne HU Therapie (unpaired t Test, $p = 0,0086$) und der ET Patienten mit *CALR* Mutation mit HU Therapie (unpaired t Test, $p = 0,0084$) im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS.

Die basale Expression des aktivierten GPIIb/IIIa Rezeptors, beurteilt anhand der Bindung von PAC-1 zeigte zwei vergleichbare Kontrollgruppen. Die ET Patienten mit *JAK2* V617F Mutation waren vergleichbar mit den Kontrollen mit ASS. Die ET Patienten mit *CALR* Mutation wiesen tendenziell eine verringerte aktivierte GPIIb/IIIa Expression auf. Die Expression von PAC-1 zeigte aber keine statistischen Auffälligkeiten.

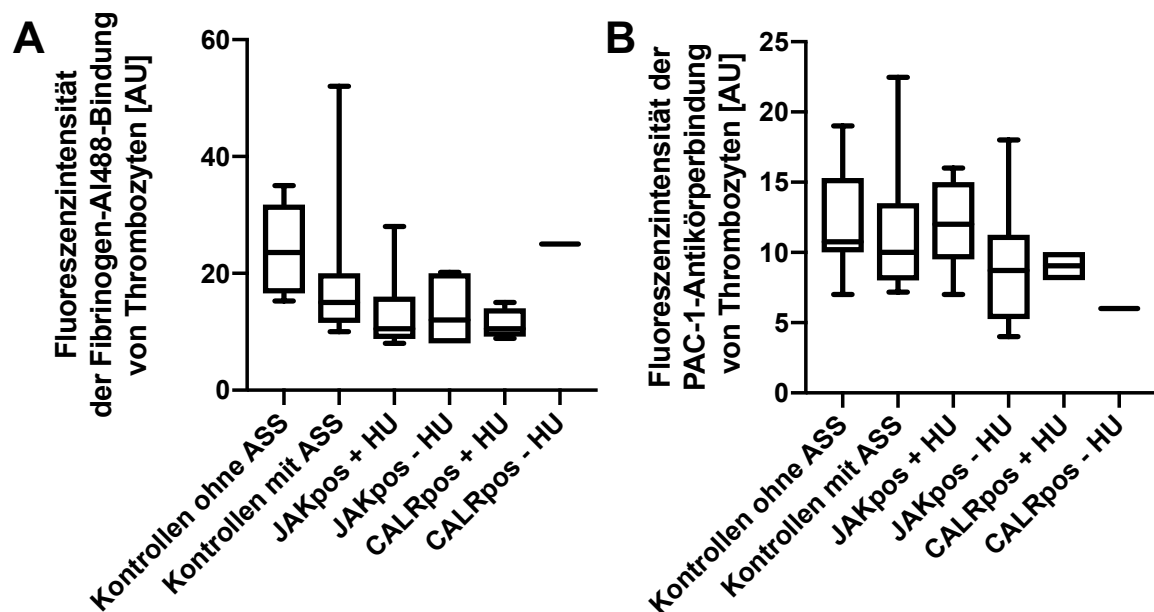


Abbildung 9: Basalwerte der aktivierten GPIIb/IIIa-Expression ohne zusätzliche Agonistengabe, dargestellt durch die Bindungskapazität von Fibrinogen (A) und von PAC-1-Antikörper (B) auf der Thrombozytenoberfläche. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

4.1.3.2 GPIIb/IIIa Rezeptor Aktivierung nach thrombozytärer Stimulation durch Convulxin

Nach Aktivierung durch Convulxin in niedrigerer und höherer Konzentration nahm die Fibrinogenbindung auf der Oberfläche der Thrombozyten bei beiden Konzentrationen und bei beiden Kontrollgruppen deutlich zu. Beide Kontrollgruppen waren jeweils vergleichbar. Alle ET Gruppen waren im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen deutlich vermindert. Wie in der Tabelle 13 dargestellt war dies für alle ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen statistisch auffällig, außer für die *JAK2* V617F positiven ET Patienten mit HU im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS.

Tabelle 13: p-Werte der Fibrinogen-Bindung der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Convulxin 5 ng/ml. * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.

	JAK +HU	JAK - HU	CALR +HU	CALR -HU
Kontrollen ohne ASS	0,0344*	0,0003*	0,0182*	nur ein Wert
Kontrollen mit ASS	0,0663 Mann-Whitney Test	<0,0001* unpaired -t Test	0,0112* Mann-Whitney Test	

Ebenso waren bei Aktivierung durch Convulxin 20 ng/ml die *JAK2* V617F positiven ET Patienten ohne HU und die *CALR* positiven ET Patienten mit HU im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen statistisch auffällig, wie in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: p-Werte der Fibrinogen-Bindung der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Convulxin 20 ng/ml im unpaired t-Test. * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.

	JAK +HU	JAK - HU	CALR +HU	CALR -HU
Kontrollen ohne ASS	0,1791	0,0004*	0,0490*	nur ein Wert
Kontrollen mit ASS	0,0837	<0,0001*	0,0182*	nur ein Wert

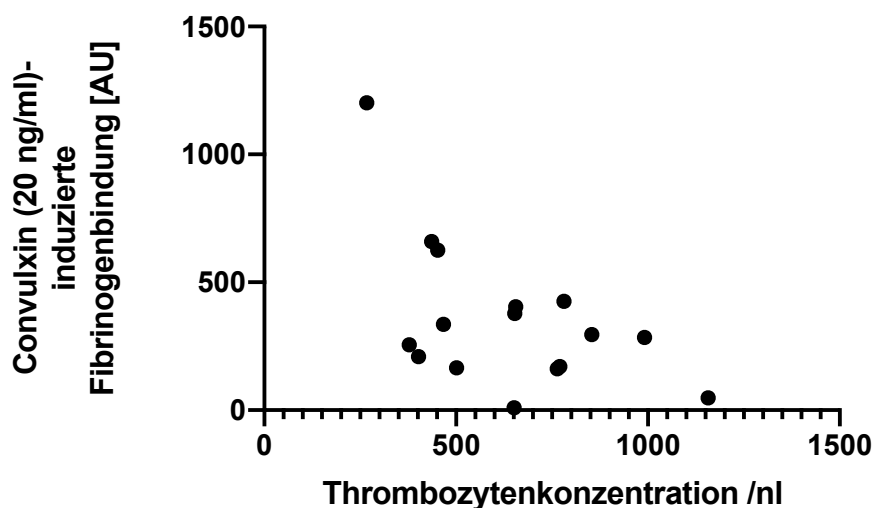


Abbildung 10: Korrelation zwischen der Thrombozytenkonzentration und der Fibrinogenbindung, induziert durch 20 ng/ml Convulxin nach Pearson

In der Abbildung 36 wurde eine negative Korrelation der Thrombozytenkonzentration mit der Fibrinogenbindung nach Stimulierung mit Convulxin 20 ng/ml dargestellt, mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = - 5485$. Tendenziell je höher die

Thrombozytenkonzentration, desto niedriger war die Fibrinogenbindung nach Aktivierung. Diese Korrelation zeigte sich statistisch auffällig (p-Wert = 0,0278*).

Die Expression von PAC-1 auf der Thrombozytenoberfläche war bei Convulxin 5 ng/ml für die Kontrollgruppe mit ASS im Vergleich zu der Kontrollgruppe ohne ASS deutlich vermindert (statistisch auffällig, unpaired t-test p = 0,0007). Alle ET Gruppen waren im Vergleich zur Kontrollgruppe mit ASS tendenziell vermindert, wobei dies nur für JAK2 V617F Mutation ohne HU Therapie statistisch auffällig war (unpaired t-Test, p = 0,0003), wie in Tabelle 15 dargestellt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne ASS waren alle ET Gruppen deutlich vermindert und waren, wie in Tabelle 15 dargestellt, alle statistisch nennenswert.

Tabelle 15: p-Werte der PAC-1 Bindung der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Convulxin 5 ng/ml. * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.

		JAK +HU	JAK - HU	CALR +HU
Kontrollen ASS	ohne	0,0017*	<0,0001*	0,0081*
Kontrollen ASS	mit	0,0774	0,0003*	0,0979
		Mann-Whitney Test	unpaired t-Test	Mann-Whitney Test

Bei Convulxin 20 ng/ml war die verminderte PAC-1 Expression der Kontrollen mit ASS gegenüber den Kontrollen ohne ASS statistisch auffällig (unpaired t-Test, p = 0,0036). Alle ET Gruppen exprimierten eine deutlich geringeren PAC-1 Bindung, als die Kontrollen mit und ohne ASS. In Tabelle 16 sind die p-Werte der statistisch auffälligen Gruppenvergleiche bei Convulxin 20 ng/ml dargestellt.

Tabelle 16: p-Werte im unpaired t-Test der PAC-1 Bindung der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Convulxin 20 ng/ml (bei Normalverteilung der Werte nach dem Shapiro-Wilk Test). * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.

		JAK +HU	JAK - HU	CALR +HU
Kontrollen ASS	ohne	0,0002*	<0,0001*	0,0015*
Kontrollen ASS	mit	0,0081*	0,0041*	0,0220*

Die Expression von aktiviertem GPIIb/IIIa in den Gruppen der ET Patienten ist im Vergleich zu den Kontrollen deutlich vermindert war. Zwischen den Gruppen mit und ohne HU Therapie war kein Unterschied festzustellen.

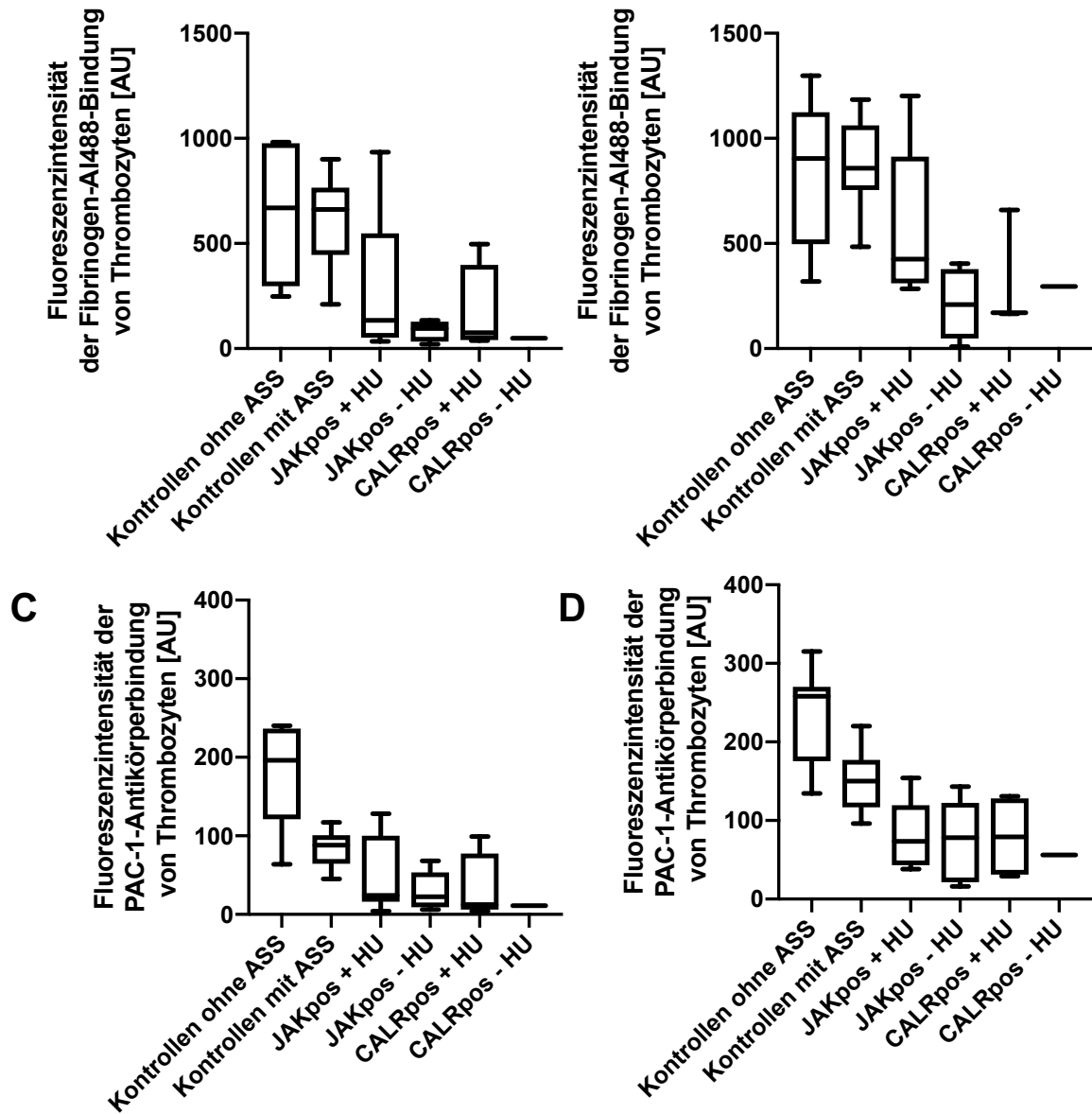


Abbildung 11: GPIIb/IIIa Rezeptoraktivierung nach Stimulation durch Convulxin mit 5 (A,C) bzw. 20 ng/ml (B,D), dargestellt durch die Bindungskapazität von Fibrinogen (A,B) und von PAC-1 Antikörper (C,D) auf der Thrombozytenoberfläche. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

4.1.3.3 GPIIb/IIIa Rezeptor Aktivierung nach thrombozytärer Stimulation durch Thrombin

Auch bei der Aktivierung durch Thrombin war die Expression von aktiviertem GPIIb/IIIa auf den Thrombozyten der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen vermindert.

Nach Stimulation mit Thrombin 0,1 U/ml war die Bindung von Fibrinogen der Kontrollgruppe mit ASS im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne ASS tendenziell erhöht, jedoch nicht statistisch auffällig. Alle ET Gruppen waren im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen statistisch auffällig vermindert außer die ET Patienten mit JAK2 V617F Mutation mit HU Therapie im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS, wie in Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: p-Werte im unpaired t-Test der Fibrinogenbindung der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Thrombin 0,1 U/ml (bei Normalverteilung der Werte nach dem Shapiro-Wilk Test). * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.

	JAK +HU	JAK - HU	CALR +HU	CALR -HU
Kontrollen ohne ASS	0,2442	0,0278*	0,0301*	
Kontrollen mit ASS	0,0115*	0,0002*	0,0003*	

Bei Aktivierung durch Thrombin 0,2 U/ml waren beide Kontrollgruppen vergleichbar und die ET Gruppen vermindert. Die statistischen Unterschiede sind in Tabelle 18 dargestellt.

Tabelle 18: p-Werte im unpaired t-Test der Fibrinogenbindung der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Thrombin 0,2 U/ml (bei Normalverteilung der Werte nach dem Shapiro-Wilk Test). * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.

	JAK +HU	JAK - HU	CALR +HU	CALR -HU
Kontrollen ohne ASS	0,229	0,0223*	0,0902	
Kontrollen mit ASS	0,0223*	0,0003*	0,0035*	

Die PAC-1 Bindung der Kontrollgruppe ohne ASS war höher als die der Kontrollgruppe mit ASS (statistisch auffällig, unpaired t-test $p = 0,0222$). Beide Kontrollgruppen banden deutlich mehr PAC-1-AK, als alle ET Gruppen.

Die p-Werte der Gruppenvergleiche, die bei Aktivierung durch Thrombin 0,1 alle statistisch auffällig waren, wurden in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: p-Werte im unpaired t-Test der PAC-1 Bindung der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Thrombin 0,1 U/ml (bei Normalverteilung der Werte nach dem Shapiro-Wilk Test). * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.

	JAK +HU	JAK - HU	CALR +HU
Kontrollen ohne ASS	0,0002*	<0,0001*	<0,0001*
Kontrollen mit ASS	0,0175*	0,0018*	0,0041*

Bei Aktivierung durch Thrombin 0,2 U/ml war die Expression von PAC-1 in allen ET Gruppen jeweils im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen statistisch auffällig und die p-Werte wurden in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: p-Werte im unpaired t-Test der PAC-1 Bindung der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Thrombin 0,2 U/ml (bei Normalverteilung der Werte nach dem Shapiro-Wilk Test). * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.

	JAK +HU	JAK - HU	CALR +HU
Kontrollen ohne ASS	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*
Kontrollen mit ASS	0,0016*	0,0014*	0,0009*

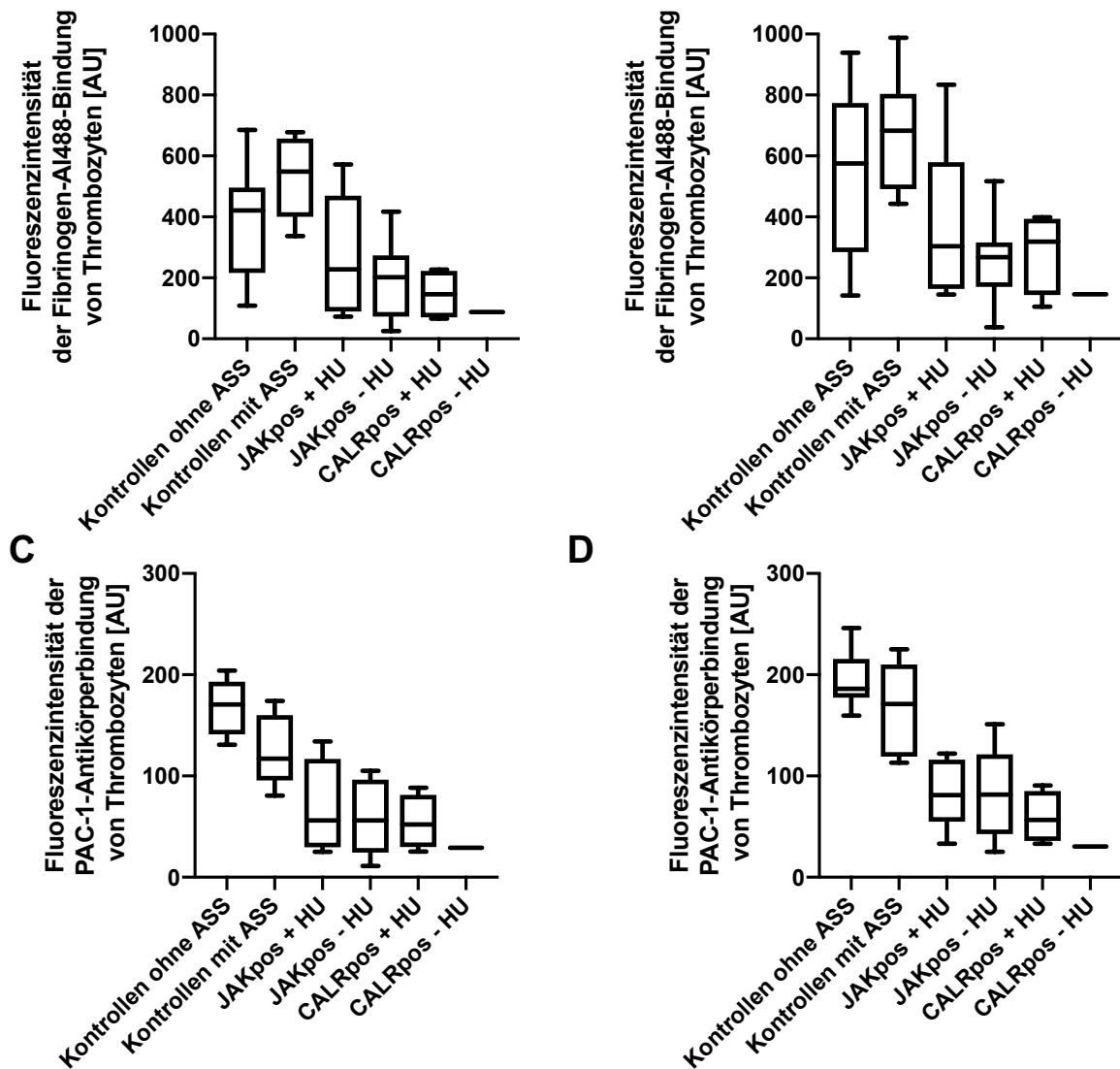


Abbildung 12: GPIIb/IIIa Rezeptoraktivierung nach Aktivierung durch Thrombin mit 0,1 (A,C) bzw. 0,2 (B,D) U/ml, dargestellt durch die Bindungskapazität von Fibrinogen (A,B) und die Expression von PAC-1 Antikörper (C,D) auf der Thrombozytenoberfläche. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

4.1.3.4 GPIIb/IIIa Rezeptoraktivierung nach thrombozytärer Stimulation durch Thrombin plus Convulxin

Auch bei der Aktivierung durch Thrombin + Convulxin war die Bindung von Fibrinogen auf den Thrombozyten der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen tendenziell vermindert.

Bei Aktivierung durch Thrombin 0 U/ml + Convulxin 5 ng/ml war die Fibrinogen-Bindung der aller ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen statistisch auffällig, wie in Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21: p-Werte der Fibrinogen Bindung der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Thrombin 0 U/ml + Convulxin 5 ng/ml. * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.

		JAK +HU	JAK - HU	CALR +HU
Kontrollen ASS	ohne	0,0420*	0,0004*	0,0202*
Kontrollen ASS	mit	0,0360*	0,0001*	0,0119*
		Mann-Whitney Test	unpaired t-Test	unpaired t-Test

Bei Aktivierung durch Thrombin 0,2 U/ml + Convulxin 5 ng/ml war der Unterschied zwischen den ET Patienten mit *JAK2* V617F Mutation mit HU Therapie (unpaired t-Test, $p = 0,0078$), ohne HU Therapie (unpaired t-Test, $p = 0,0007$) und der ET Patienten mit *CALR* Mutation mit HU Therapie (unpaired t-Test, $p = 0,0117$) im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS statistisch auffällig.

Die PAC-1 Bindung war bei den Kontrollen mit ASS deutlich geringer als bei den Kontrollen ohne ASS bei Stimulierung mit Thrombin 0 U/ml + Convulxin 5 ng/ml (statistisch auffällig, Mann-Whitney test $p = 0,0034$) und mit Thrombin 0,2 U/ml + Convulxin 5 ng/ml (statistisch auffällig, unpaired t-Test, $p = 0,0004$). Die PAC-1 Bindung aller ET Patienten war bei Stimulierung durch Convulxin alleine oder durch die Kombination von Thrombin und Convulxin tendenziell vermindert im Vergleich mit den Kontrollen mit ASS, und wie in den Tabellen 22 und 23 dargestellt, statistisch auffällig.

Tabelle 22: p-Werte der PAC-1 Bindung der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Thrombin 0 U/ml + Convulxin 5 ng/ml. * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.

		JAK +HU	JAK - HU	CALR +HU
Kontrollen ASS	ohne	<0,0001*	<0,0001*	0,0162*
Kontrollen ASS	mit	0,0326*	<0,0001*	0,1419
		unpaired t-Test	unpaired t-Test	Mann-Whitney Test

Tabelle 23: p-Werte der PAC-1 Bindung der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Thrombin 0,2 U/ml + Convulxin 5 ng/ml. * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.

		JAK +HU	JAK - HU	CALR +HU
Kontrollen	ohne	0,0047*	<0,0001*	0,0003*
ASS				
Kontrollen	mit	0,0456*	0,65	0,0227*
ASS				
		Mann-Whitney Test	unpaired t-Test	unpaired t-Test

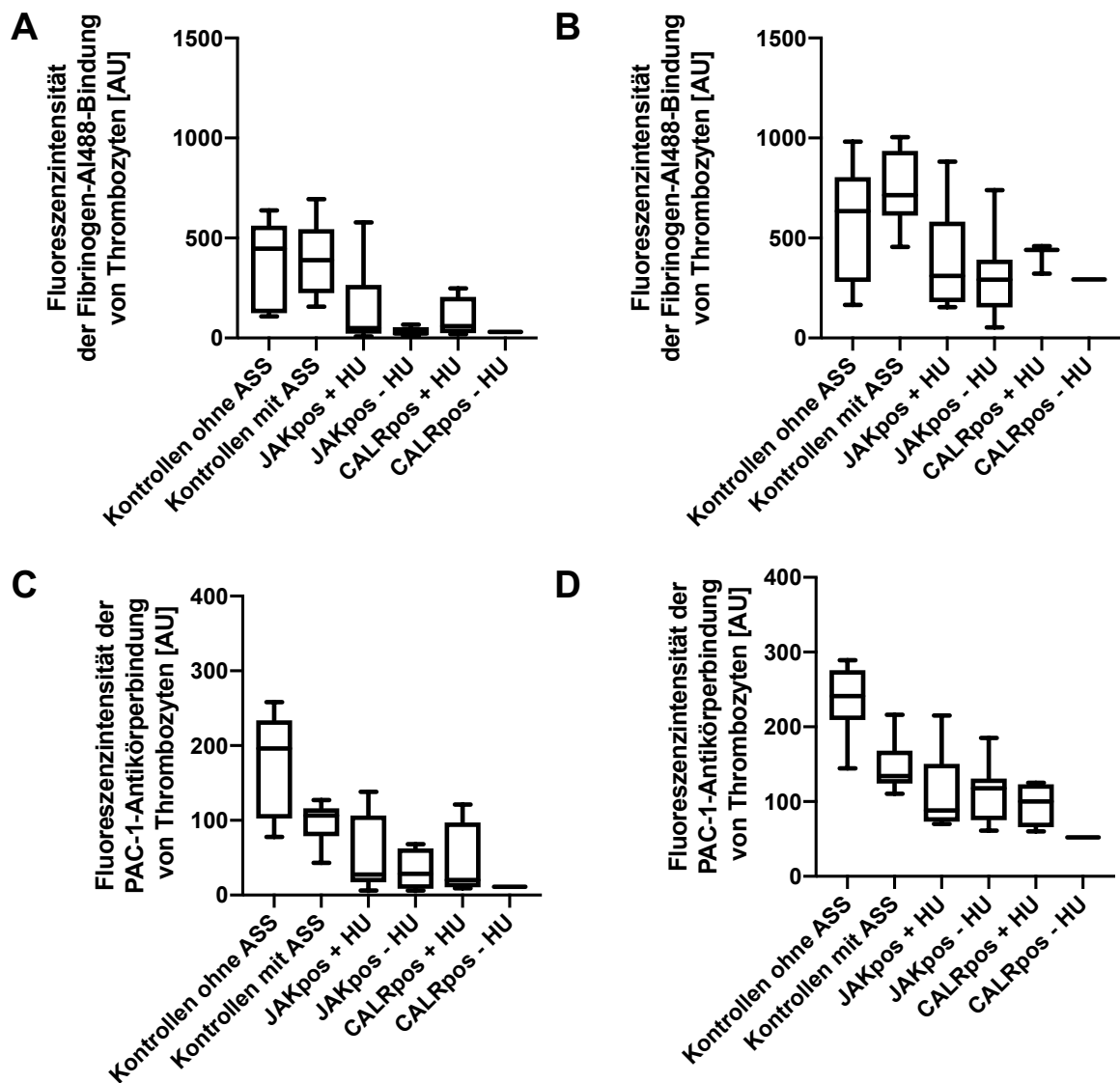


Abbildung 13: GPIIb/IIIa Rezeptoraktivierung nach Aktivierung durch Convulxin 5 ng/ml + Thrombin mit 0 (A,C) bzw. 0,2 (B,D) U/ml, dargestellt durch die Bindungskapazität von Fibrinogen (A,B) und von PAC-1 Antikörper (C,D) auf der Thrombozytenoberfläche. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

4.1.3.5 GPIIb/IIIa Rezeptoraktivierung nach Stimulation durch Ca²⁺ Ionophor

Bei Aktivierung durch Ca²⁺ Ionophore 20 µM war die Fibrinogen Bindung an den aktivierten GP IIb/IIIa Rezeptor vermindert und die PAC-1 Expression deutlich vermindert. Ein Unterschied zwischen den Mutations- und den Therapiegruppen war nicht zu beobachten.

Bei Aktivierung durch Ca²⁺ Ionophor 20 µM waren beide Kontrollgruppen vergleichbar und die Bindung von Fibrinogen aller ET Gruppen tendenziell vermindert. Statistisch auffällig war es in allen ET Gruppen jeweils im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen, wie in Tabelle 24 dargestellt wurde.

Tabelle 24: p-Werte im unpaired t-Test der Fibrinogenbindung der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Thrombin 0,1 U/ml (bei Normalverteilung der Werte nach dem Shapiro-Wilk Test). * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.

	JAK +HU	JAK - HU	CALR +HU	
Kontrollen ohne ASS	0,0208*	0,0437*	0,0257*	Unpaired t-Test
Kontrollen mit ASS	0,0120*	0,0418*	0,0336*	Mann-Whitney Test

Bei Aktivierung durch Ca²⁺ Ionophore 20 µM war die Expression von PAC-1 in beiden Kontrollgruppen vergleichbar und dazu in allen ET Gruppen außer bei den *JAK2* V617F Patienten ohne HU Therapie und bei den *CALR* Patienten mit HU Therapie im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS statistisch auffällig vermindert. Die p-Werte sind in Tabelle 25 dargestellt.

Tabelle 25: p-Werte im unpaired t-Test der PAC-1 Bindung der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Ca²⁺ Ionophore 20 µM (bei Normalverteilung der Werte nach dem Shapiro-Wilk Test). * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.

	JAK +HU	JAK - HU	CALR +HU
Kontrollen ohne ASS	0,269*	0,0733	0,0732
Kontrollen mit ASS	0,0021*	0,0220*	0,0110*

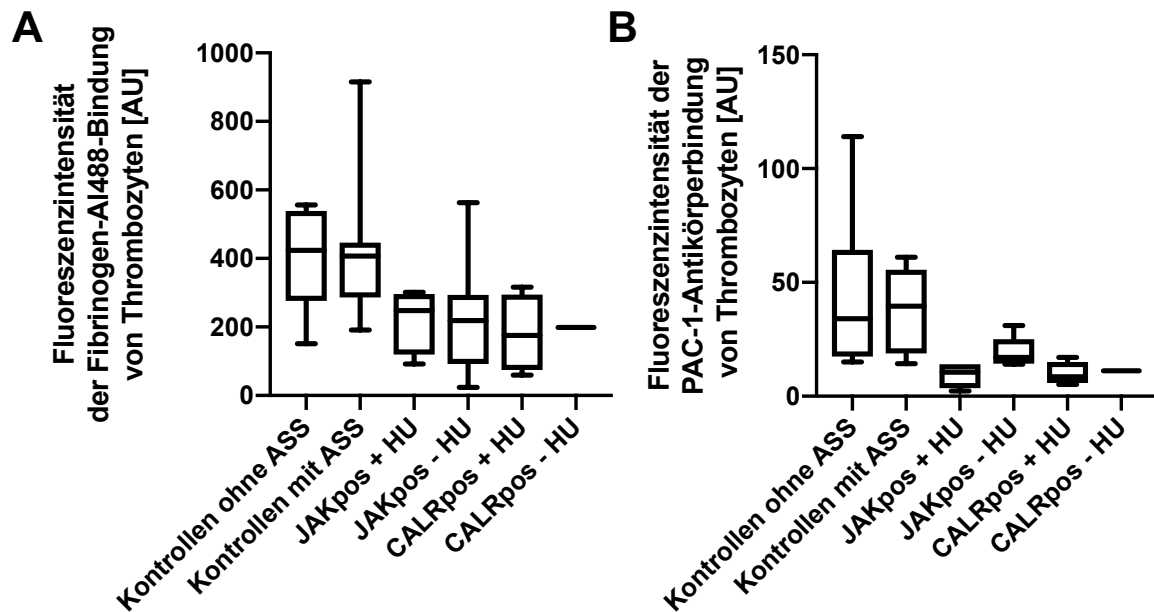


Abbildung 16/17: GPIIb/IIIa Rezeptoraktivierung nach Aktivierung durch Ca^{2+} Ionophore 20 μM , dargestellt durch die Bindungskapazität von Fibrinogen (A) und PAC-1 Antikörper (B). Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

4.1.4 *Ex vivo* und Agonisten abhängige α -Granula Exozytose durch Betrachtung der Expression von CD62P auf der Thrombozytenoberfläche

4.1.4.1 Basale Expression von CD62P auf der Thrombozytenoberfläche

Die basale Expression von CD62P auf der Thrombozytenoberfläche war in der Kontrollgruppe ohne ASS tendenziell leicht erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe mit ASS. Der Unterschied zeigte sich aber nicht statistisch auffällig. Alle ET Gruppen exprimierten im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS tendenziell mehr CD62P. Im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS war die CD62P Expression im Mittelwert vergleichbar mit einer Tendenz zur erhöhten CD62P Expression. Die Expression von CD62P der ET Patienten mit *JAK2* V617F Mutation ohne HU Therapie (unpaired t-Test, $p = 0,0026$) war im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS statistisch auffällig. Auch die statistisch nicht auswertbare CALR positive Gruppe ohne HU zeigt eine tendenzielle Erhöhung der CD62P Expression im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS.

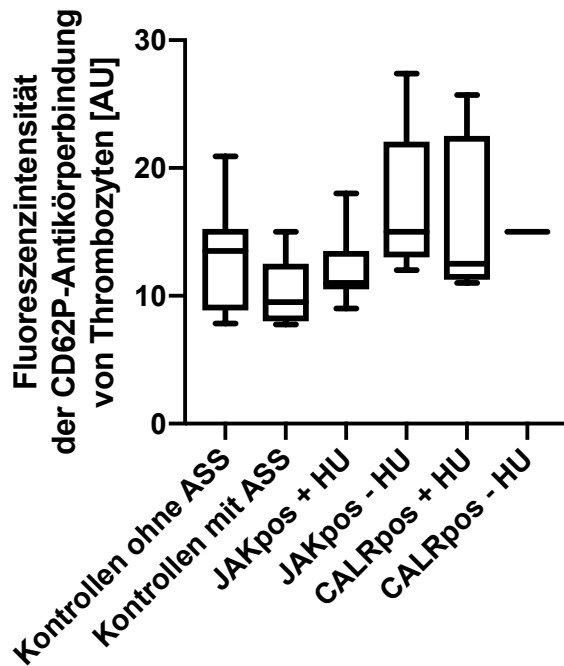


Abbildung 14: Thrombozytäre CD62P Oberflächen-Expression ohne zusätzliche Agonistengabe. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

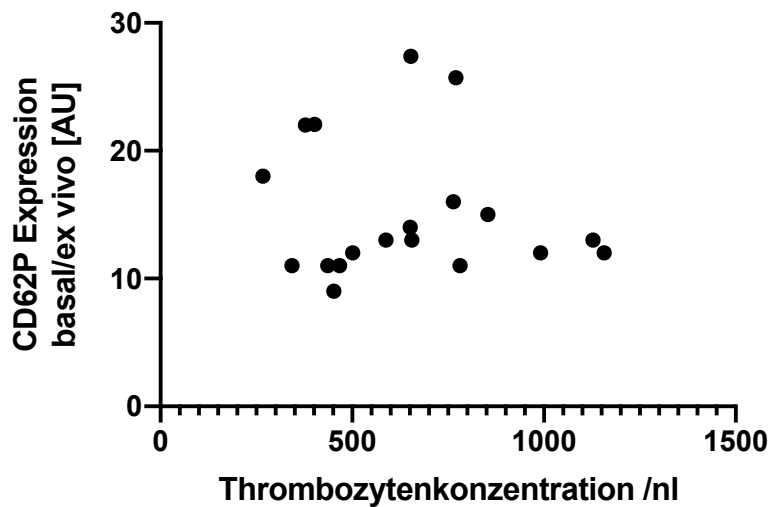


Abbildung 15: Korrelationsabbildung der Thrombozytenkonzentration und der basalen CD62P Expression nach Pearson

Die Abbildung 37 zeigt eine äußerst schwache negative Korrelation der Thrombozytenkonzentration und der basalen CD62P Expression, die nicht signifikant unterschiedlich ist ($r = -0,1126$, p -Wert = $0,6463$).

4.1.4.2 Thrombozytäre Oberflächen-Expression von CD62P nach Aktivierung mit Convulxin

Nach Aktivierung mit Convulxin 5 ng/ml kam es zur deutlichen Zunahme der CD62P Expression der Kontrollen ohne ASS. Die Kontrollen mit ASS exprimierten tendenziell weniger CD62P als die Kontrollen ohne ASS, es zeigte sich allerdings kein statistisch auffälliger Unterschied. Die CD62P Expression auf den Thrombozyten der ET Patienten war tendenziell vermindert, insbesondere im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS. Statistisch auffällig war bei Convulxin 5 ng/ml der Unterschied der ET Patienten mit *JAK2* V617F Mutation mit HU Therapie (unpaired t-Test, $p = 0,0379$) und der ET Patienten mit *JAK2* V617F Mutation ohne HU Therapie (Mann-Whitney Test, $p = 0,0125$) zu den Kontrollen ohne ASS.

Bei stärkerer Stimulierung der Thrombozyten durch Convulxin 20 ng/ml war die CD62P Expression beider Kontrollgruppen vergleichbar. Alle ET Gruppen zeigten sich tendenziell vermindert, wobei sich bei stärkerer Aktivierung eine größere Streuung der Werte aufzeigte. Statistisch auffällig war bei Convulxin 20 ng/ml der Unterschied zwischen ET Patienten mit *JAK2* V617F Mutation ohne HU Therapie zu den Kontrollen mit (unpaired t-Test, $p = 0,0306$) und ohne (Mann-Whitney Test, $p = 0,0155$) ASS.

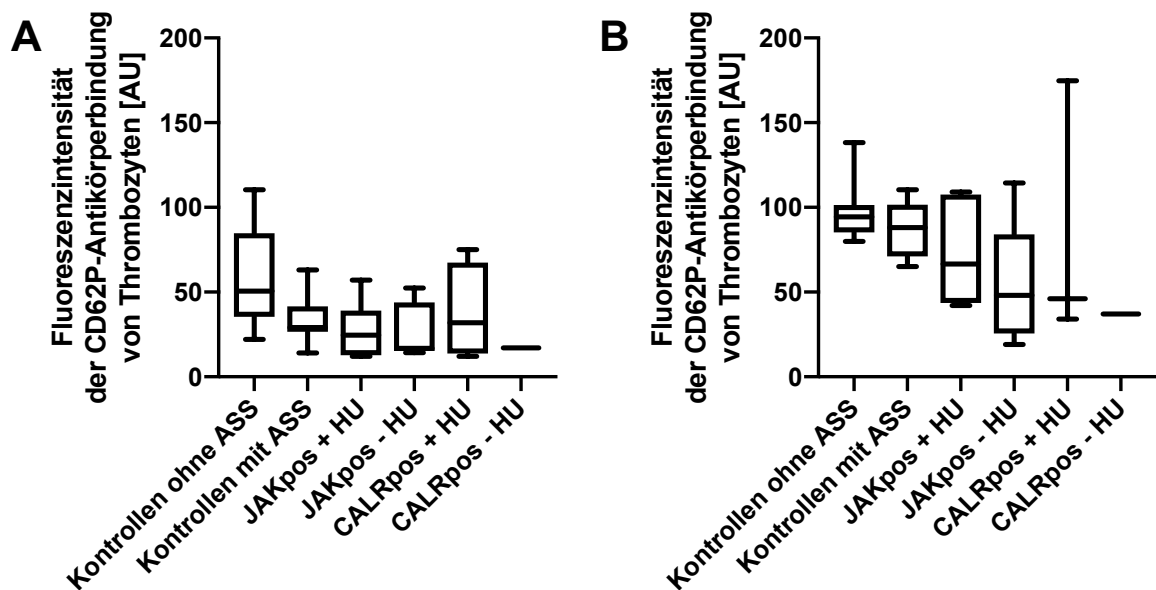


Abbildung 16: Thrombozytäre CD62P Oberflächen-Expression nach Aktivierung durch Convulxin mit 5 (A) bzw. 20 ng/ml (B). Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

4.1.4.3 Thrombozytäre Expression von CD62P nach Aktivierung mit Convulxin und ADP

Durch die gemeinsame Aktivierung durch Convulxin und ADP wurden der GP VI Rezeptor und die P₂Y Rezeptoren auf den Thrombozyten stimuliert. Bei niedriger Convulxin Konzentration mit ADP kam es bei den Kontrollen ohne ASS zu einer erhöhten Aktivierung als bei den Kontrollen mit ASS (statistisch auffällig, unpaired t-test $p = 0,0411$). Die Gruppe der *JAK2 V617F* positiven ET Patienten mit HU Therapie war vergleichbar mit den Kontrollen mit ASS und vermindert im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS. Die übrigen ET Gruppen wiesen eine tendenziell niedrigere CD62P Expression auf als die Kontrollen mit ASS und deutlich niedrigere Mittelwerte als Kontrollen ohne ASS. Auffällig war aber eine große Streuung der Werte. Statistisch auffällig war die verminderte CD62P Expression der ET Patienten mit *JAK2 V617F* Mutation ohne HU Therapie (Mann-Whitney Test, $p = 0,0147$) im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS.

Bei der stärkeren Agonisierung durch eine höhere Convulxin Konzentration war die α -Granula Sekretion und CD62P Expression bei den Kontrollen ohne ASS immer noch größer als bei den Kontrollen mit ASS (statistisch auffällig, unpaired t-test $p = 0,0276$). Die CD62P Expression der ET Gruppen stieg aber deutlich an. Besonders die beiden ET Gruppen mit HU Therapie schienen tendenziell vergleichbar mit den Kontrollen ohne ASS und größer als die respektiven Gruppen ohne HU Therapie und die Kontrollen mit ASS. Statistisch auffällig war die verminderte CD62P Expression der ET Patienten mit *JAK2 V617F* Mutation ohne HU Therapie (unpaired t-Test, $p = 0,0063$) im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS.

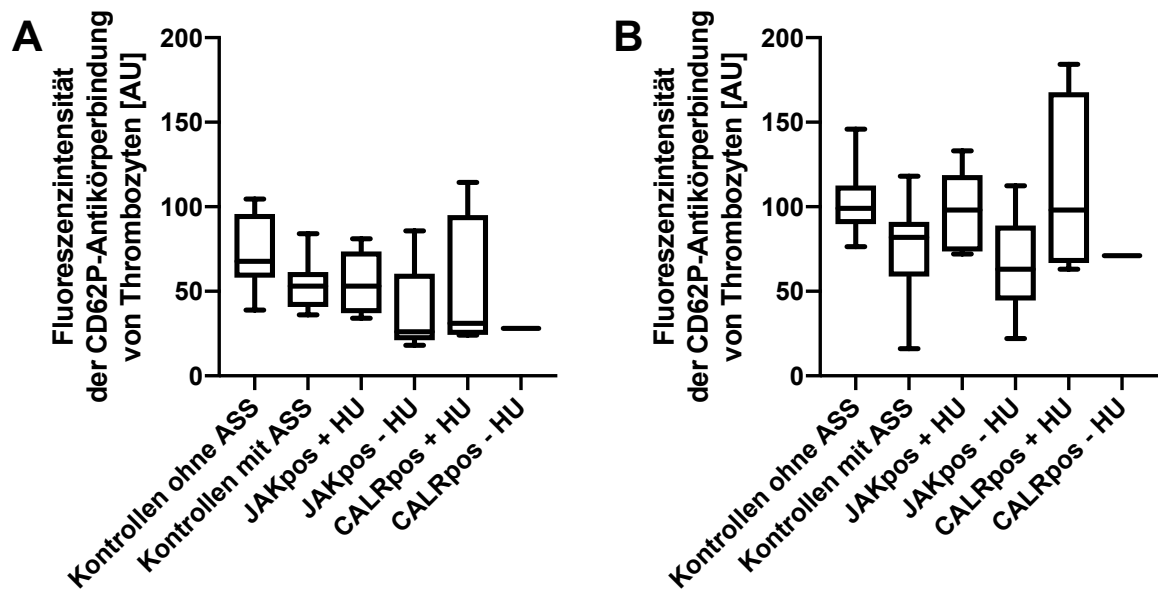


Abbildung 17: Thrombozytäre CD62P Oberflächen-Expression nach Aktivierung durch Convulxin 5 ng/ml (A) bzw. 20ng/ml (B) + 0,375 μ M ADP. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

4.1.4.4 Thrombozytäre Oberflächen-Expression von CD62P nach Aktivierung mit Thrombin

Die Aktivierung durch Thrombin führte in den Kontrollen und in den ET Gruppen zu einer vergleichbaren α -Granula Sekretion und CD62P Expression. Eine steigenden Thrombin Konzentration zeigte gleiche Ergebnisse.

Bei Stimulierung durch Thrombin 0,2 U/ml glichen sich alle ET Gruppen an. Unterschiede zwischen den verschiedenen Mutationen oder Therapieregimen waren in höherer Konzentration nicht zu beobachten. Die Vergleiche zwischen ET Patienten und den jeweiligen Kontrollgruppen zeigten keinen statistisch auffälligen Unterschied, weder bei Stimulierung durch Thrombin 0,1 U/ml noch durch Thrombin 0,2 U/ml.

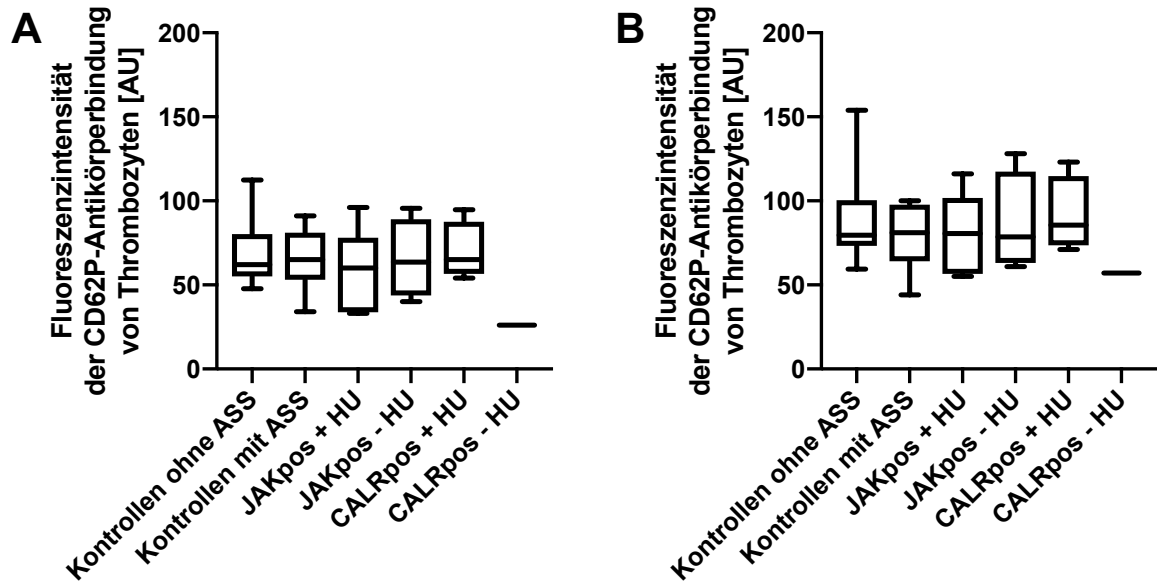


Abbildung 18: Thrombozytäre Oberflächen-Expression von CD62P nach Aktivierung durch Thrombin 0,1 U/ml (A) 0,2 U/ml (B). Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

4.1.4.5 Thrombozytäre Oberflächen-Expression von CD62P nach Aktivierung mit Thrombin und ADP

Die CD62P Expression nach Aktivierung mit Thrombin und ADP in niedriger Konzentration war in beiden Kontrollgruppen vergleichbar. Nur die *CALR* Gruppe mit HU zeigte eine diskrete tendenziell vermehrte CD62P Expression. Es bestanden aber keine statistischen Auffälligkeiten. Bei Stimulierung durch eine höhere Thrombinkonzentration mit ADP war die CD62P Expression der Kontrollgruppe mit ASS dezent erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne ASS. Auch die *CALR* Gruppe mit HU war dezent erhöht und vergleichbar mit den Kontrollen mit ASS. Die anderen ET Gruppen waren vergleichbar mit den Kontrollen ohne ASS. Auch hier bestanden keine statistischen Auffälligkeiten.

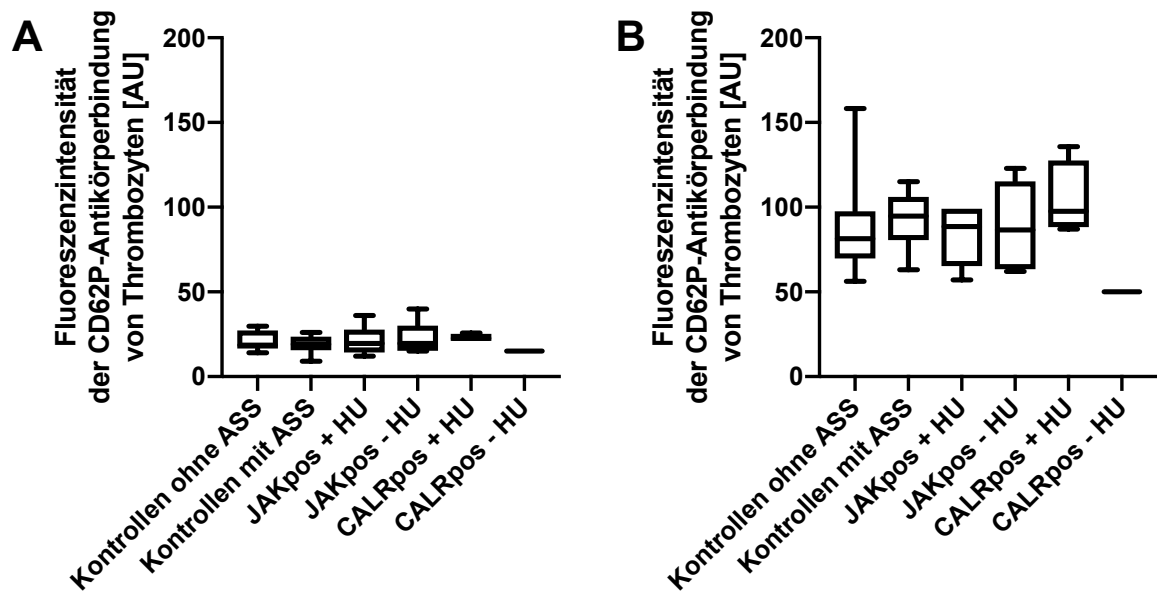


Abbildung 19: Thrombozytäre Oberflächen-Expression von CD62P nach Aktivierung durch Thrombin mit 0 (A) bzw. 0,2 U/ml (B) + 0,375 µM ADP. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

4.1.4.6 Thrombozytäre Oberflächen-Expression von CD62P nach Aktivierung mit Thrombin und Convulxin

Die α -Granula Sekretion bei erneuter Convulxin 5 ng/ml (+Thrombin 0 U/ml) Gabe war bei den Kontrollen ohne ASS erhöht im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS (statistisch auffällig, unpaired t-Test, $p = 0,0204$). Im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS waren die CD62P Werte der ET Gruppen tendenziell vermindert. Statistisch auffällig war die verminderte Expression von CD62P in der Gruppe ET Patienten mit *JAK2* V617F Mutation mit HU Therapie (Mann-Whitney Test, $p = 0,016$) und der ET Patienten mit *JAK2* V617F Mutation ohne HU Therapie (Mann-Whitney Test, $p = 0,0082$) im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS.

Bei Aktivierung durch Thrombin 0,2 mg/ml + Convulxin 5 ng/ml waren beide Kontrollgruppen vergleichbar. Die *CALR* Gruppe mit HU zeigte sich vergleichbar mit den Kontrollgruppen. Die Gruppe der *JAK2* V617F positiven ET Patienten zeigte eine diskret verminderte CD62P Expression. Es bestanden aber keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den ET Patienten und den beiden Kontrollgruppen. Die *CALR* Gruppe ohne HU exprimierte deutlich weniger CD62P bei einer Aktivierung durch Thrombin 0,2 U/ml + Convulxin 5 ng/ml. Dies konnte aufgrund des einzelnen Wertes nicht statistisch ausgewertet werden.

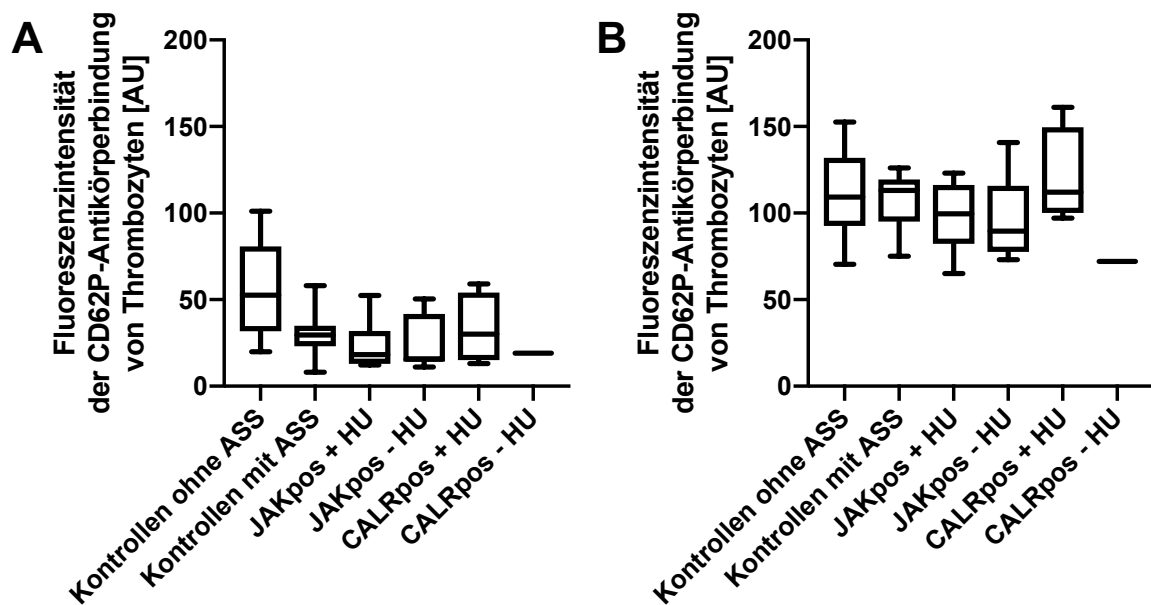


Abbildung 20: Thrombozytäre Oberflächen-Expression von CD62P nach Aktivierung durch Convulxin 5 ng/ml + Thrombin mit 0 (A) bzw. 0,2 U/ml (B). Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

4.1.4.7 Thrombozytäre Oberflächen-Expression von CD62P nach Aktivierung mit Ca^{2+} Ionophor

Die CD62P Expression war in der Kontrollgruppe ohne ASS erhöht im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS (statistisch auffällig, unpaired t-Test, $p = 0,0034$). Die ET Gruppen waren vergleichbar mit beiden Kontrollgruppen, unabhängig der Mutationsgruppe oder der erhaltenen Therapie. Die Messung der CD62P Expression mit Ca^{2+} Ionophore $20\mu M$ als Triggersubstanz zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den ET Patienten und den beiden Kontrollgruppen.

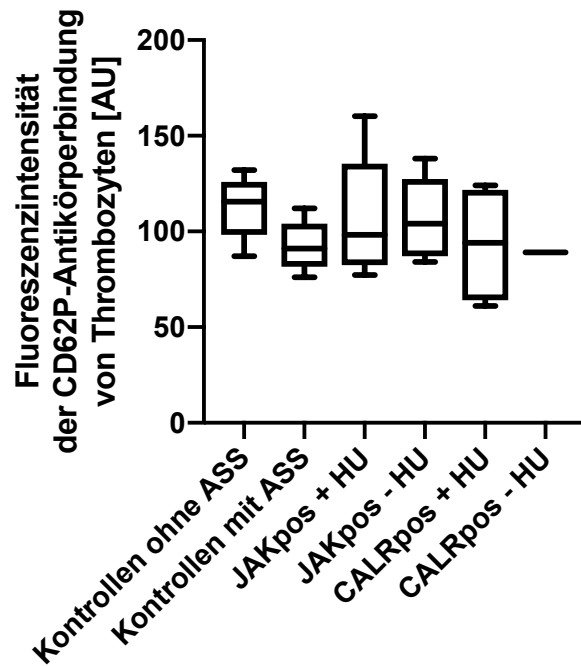


Abbildung 21: Thrombozytäre Oberflächen-Expression von CD62P nach Aktivierung durch Ca^{2+} Ionophore 20 μM . Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

4.1.5 *Ex vivo* und Agonisten abhängige δ -Granula – und Lysosomen Exozytose durch Betrachtung der Expression von CD63 auf der Thrombozytenoberfläche

4.1.5.1 Basale Expression von CD63 auf der Thrombozytenoberfläche

Der Basalwert der Expression von CD63 war in allen Gruppen gering. Im Vergleich zur Expression von CD62P war die absolute Fluoreszenzintensität niedriger, da der Anteil an δ -Granula und Lysosomen geringer ist als der der α -Granula. Die Messung der basalen CD63 Expression zeigte keine statistisch auffälligen Unterschiede zwischen den ET Patienten und den beiden Kontrollgruppen.

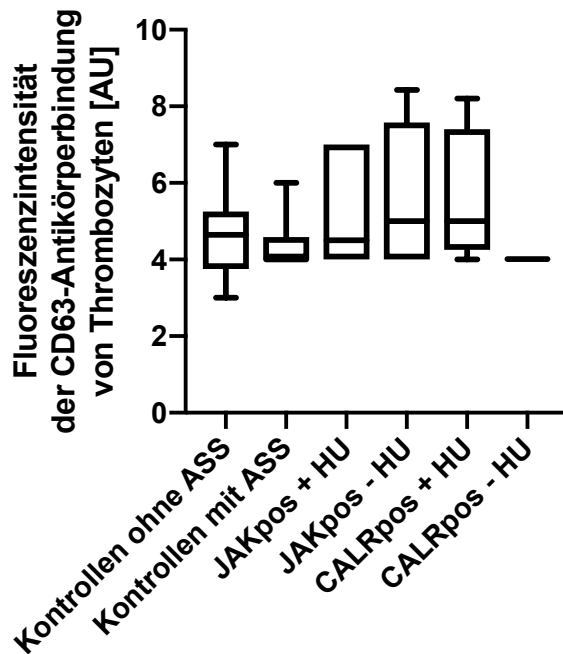


Abbildung 22: Thrombozytäre CD63 Oberflächen-Expression ohne zusätzliche Agonistengabe. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

4.1.5.2 Thrombozytäre CD63 Oberflächen-Expression nach Aktivierung mit Convulxin

Der Aktivierungsreiz mit Convulxin führte in den Kontrollgruppen zu einer deutlichen Zunahme der Expression von CD63. Bereits nach Stimulierung mit 5ng/ml Convulxin konnte bei einzelnen Kontrollen ohne ASS eine hohe CD63 Expression beobachtet werden mit einer großen Streuung innerhalb der Gruppe. Im Vergleich dazu war die CD63 Expression der Kontrollgruppe mit ASS vermindert (statistisch auffällig, unpaired t-Test, $p = 0,017$). Die ET Gruppen exprimierten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen vermindert CD63 auf der Thrombozytenoberfläche. Die statistisch auffälligen Ergebnisse sind in der Tabelle 26 aufgeführt.

Tabelle 26: p-Werte im unpaired t-Test der CD63 Expression der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Convulxin 5ng/ml (bei Normalverteilung der Werte nach dem Shapiro-Wilk Test). * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.

	JAK pos + HU	JAK pos - HU	CALR pos +HU
Kontrollen ohne ASS	0,0068*	0,0029*	0,0197*
Kontrollen mit ASS	0,0345*	0,043*	0,0523

Bei Stimulierung durch Convulxin 20 ng/ml waren die CD63 Expression der beiden Kontrollengruppen vergleichbar. Im Vergleich dazu war die CD 63 Expression der ET Gruppen deutlich vermindert. Nennenswerte statistische Unterschiede werden in der Tabelle 27 dargestellt.

Tabelle 27: p-Werte im unpaired t-Test der CD63 Expression der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Convulxin 20 ng/ml (bei Normalverteilung der Werte nach dem Shapiro-Wilk Test). * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.

	JAKpos HU	+ JAKpos HU	- CALRpos +HU
Kontrollen ohne ASS	0,0001*	0,0002*	0,0169*
Kontrollen mit ASS	<0,0001*	0,0004*	0,0516

Diese Ergebnisse ließen auf eine gestörte Exozytose von δ -Granula und Lysosomen nach Aktivierung über den GP VI Rezeptor rückschließen. Einen Unterschied bezüglich der Mutationsgruppe oder der angewandten Therapie war nicht ersichtlich.

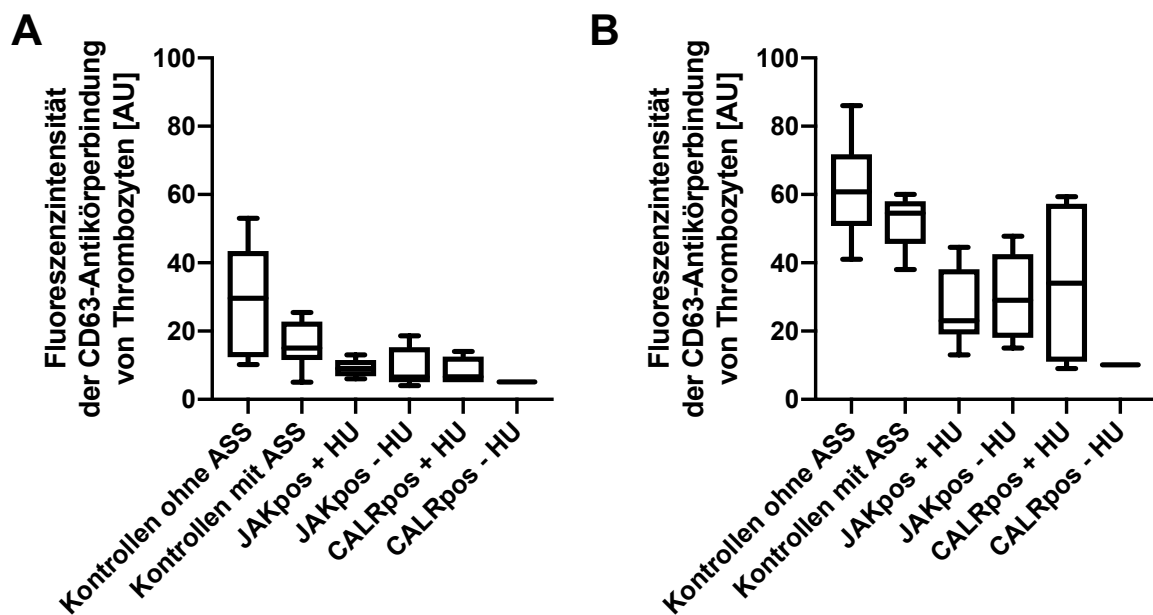


Abbildung 23: Thrombozytäre CD63 Oberflächen-Expression nach Aktivierung durch Convulxin mit 5 (A) bzw. 20 (B) ng/ml. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

4.1.5.3 Thrombozytäre CD63 Oberflächen-Expression nach Aktivierung mit Thrombin

Nach der Aktivierung mit Thrombin 0,1 und 0,2 U/ml war die CD 63 Expression auf der Thrombozytenoberfläche zwischen beiden Kontrollgruppen vergleichbar. Die CD63 Expression der ET Gruppen im Vergleich zu jeweils beiden Kontrollgruppen war tendenziell vermindert. Besonders der ET Patient mit *CALR* Mutation ohne HU Therapie wies eine sehr niedrige Expression an CD 63 auf. Die statistischen Auffälligkeiten werden in Tabelle 28 bei Stimulierung mit Thrombin 0,1 U/ml und in Tabelle 29 bei Stimulierung mit Thrombin 0,2 U/ml aufgeführt.

Tabelle 28: p-Werte im unpaired t-Test der CD63 Expression der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Thrombin 0,1 U/ml (bei Normalverteilung der Werte nach dem Shapiro-Wilk Test). * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.

	JAKpos HU	+ JAKpos HU	- CALRpos +HU
Kontrollen ohne ASS	0,0761	0,0431*	0,0818
Kontrollen mit ASS	0,0161*	0,0067*	0,0247*

Tabelle 29: p-Werte im unpaired t-Test der CD63 Expression der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Thrombin 0,2 U/ml (bei Normalverteilung der Werte nach dem Shapiro-Wilk Test). * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.

	JAKpos HU	+ JAKpos HU	- CALRpos +HU
Kontrollen ohne ASS	0,0064*	0,0101*	0,1463
Kontrollen mit ASS	0,0233*	0,0257*	0,2129

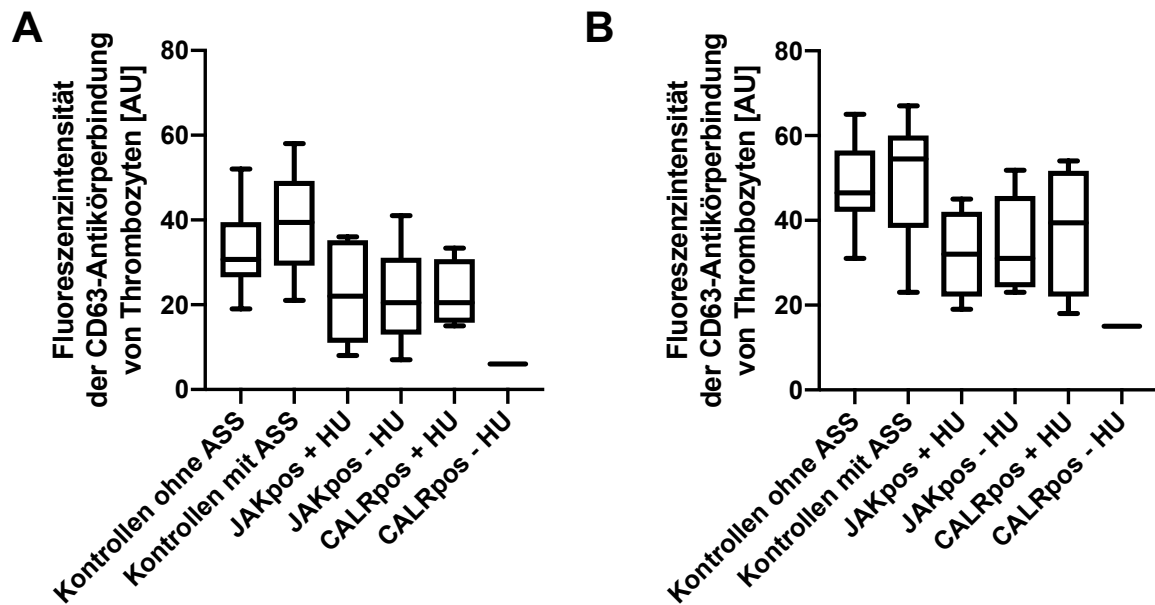


Abbildung 24: Thrombozytäre CD63 Oberflächen-Expression nach Aktivierung durch Thrombin mit 0,1 (A) bzw. 0,2 (B) U/ml. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe

4.1.5.4 Thrombozytäre CD63 Oberflächen-Expression nach Aktivierung mit Thrombin und Convulxin

Bei der erneuten Aktivierung mit Convulxin 5 ng/ml (+Thrombin 0 U/ml) wurde wie in der vorherigen Untersuchung beobachtet, dass die Kontrollgruppe ohne ASS mehr CD63 exprimiert, als die Kontrollen mit ASS. Die Gruppen der ET Patienten waren im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen vermindert. Die statistischen Auffälligkeiten der verminderten CD 63 Expression der ET Gruppen im Vergleich zu den Kontrollen decken sich mit denen der vorherigen Untersuchung und sind in Tabelle 30 dargestellt.

Tabelle 30: p-Werte der CD63 Expression der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Convulxin 5 ng/ml + Thrombin 0 U/ml. * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.

	JAKpos + HU	JAKpos - HU	CALRpos +HU
Kontrollen ohne ASS	0,0094*	0,0013*	0,042*
Kontrollen mit ASS	0,00241*	0,0078*	0,1027
	unpaired t-Test	Mann-Whitney Test	unpaired t-Test

Auch die Kombination der starken Agonisten zeigte eine tendenziell verminderte Expression von CD 63 in allen ET Gruppen im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen.

Bei Aktivierung mit Thrombin 0,2 mg/ml + Convulxin 5 ng/ml war die verminderte CD63 Expression aller ET Gruppen im Vergleich zu jeweils beiden Kontrollgruppen statistisch auffällig.

Tabelle 31: p-Werte im unpaired t-Test der CD63 Expression der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Thrombin 0,2 U/ml + Convulxin 5 ng/ml. * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.

	JAKpos HU	+ JAKpos HU	- CALRpos +HU
Kontrollen ohne ASS	0,0007*	0,0025*	0,0049*
Kontrollen mit ASS	0,0029*	0,0095*	0,0138*

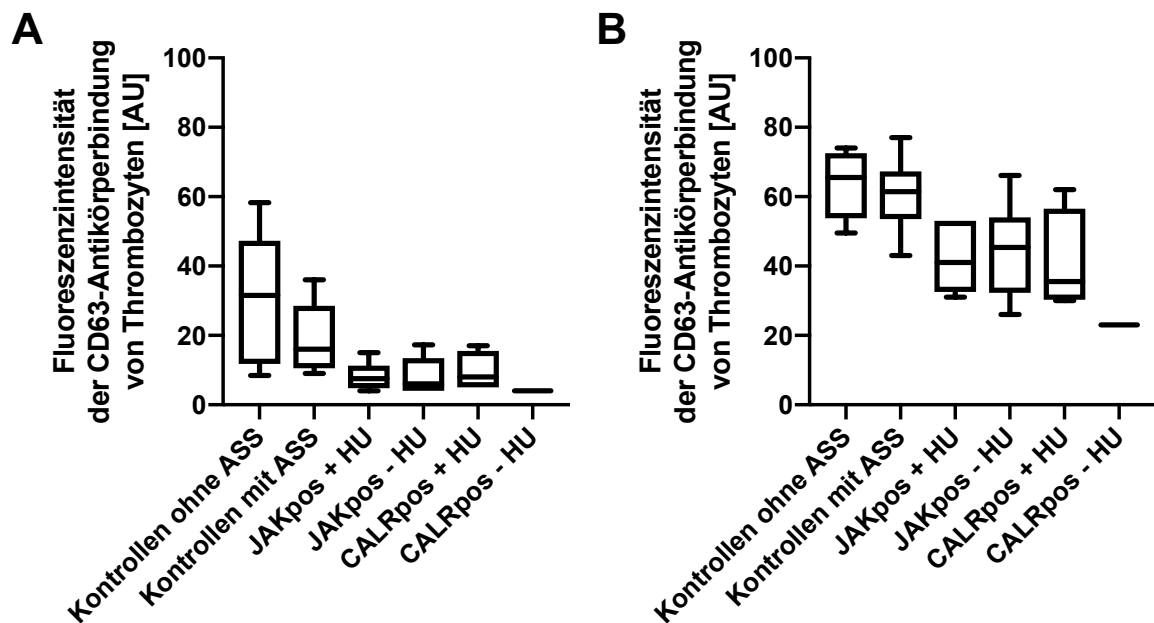


Abbildung 25: Thrombozytäre CD63 Oberflächen-Expression nach Aktivierung durch Convulxin 5 ng/ml + Thrombin mit 0 (A) bzw. 0,2 (B) U/ml. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

4.1.5.5 Thrombozytäre CD63 Oberflächen-Expression nach Aktivierung mit Ca^{2+}

Ionophor

Die Aktivierung der Thrombozyten durch Ca^{2+} Ionophor zeigte auch eine tendenziell verminderte Expression von CD 63 auf der Oberfläche der Thrombozyten der Kontrollen mit ASS im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS (statistisch auffällig, unpaired t-test $p = 0,0117$). Alle ET Patienten exprimierten im Vergleich zu beiden

Kontrollgruppen tendenziell weniger CD 63 auf der Thrombozytenoberfläche. Die statistischen Unterschiede wurden in der Tabelle 32 aufgeführt.

Tabelle 32: p-Werte im unpaired t-Test der CD63 Expression der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen bei Aktivierung durch Ca²⁺ Ionophor. * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.

	JAKpos HU	+ JAKpos HU	- CALRpos +HU
Kontrollen ohne ASS	0,0015*	0,0080*	0,003*
Kontrollen mit ASS	0,0098*	0,1852	0,0073*

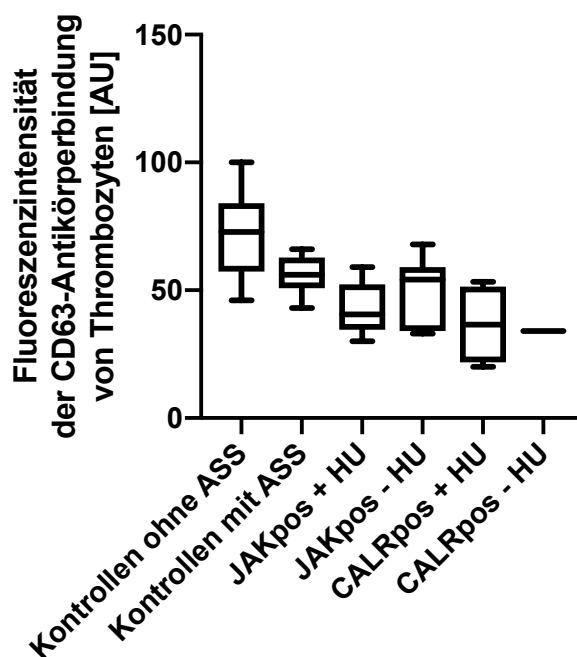


Abbildung 26: Thrombozytäre CD63 Oberflächen-Expression nach Aktivierung durch Ca²⁺ Ionophore 20µM. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

4.1.6 Ex vivo und Agonisten induzierte Exozytose der thrombozytären δ-Granula (Mepacrine-Test)

4.1.6.1 Basale Aufnahme von Mepacrine in den thrombozytären δ-Granula

Da Mepacrine spezifisch Adenin-Nukleotide bindet, konnte durch den Basalwert die Menge an ADP (und ATP) in den Thrombozyten beurteilt werden. Die höchste Aufnahme fand in den Thrombozyten der Kontrollen ohne ASS statt. Die Mepacrine

Aufnahme der Kontrollen mit ASS reicherte basal weniger Mepacrine an als die Kontrollen ohne ASS (statistisch auffällig, unpaired t-test $p = 0,0158$).

Die Mepacrine Aufnahme aller ET Gruppen waren im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS statistisch auffällig vermindert (siehe Tabelle 33). Die verminderte Mepacrine Aufnahme der ET Gruppen im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS war nicht statistisch auffällig.

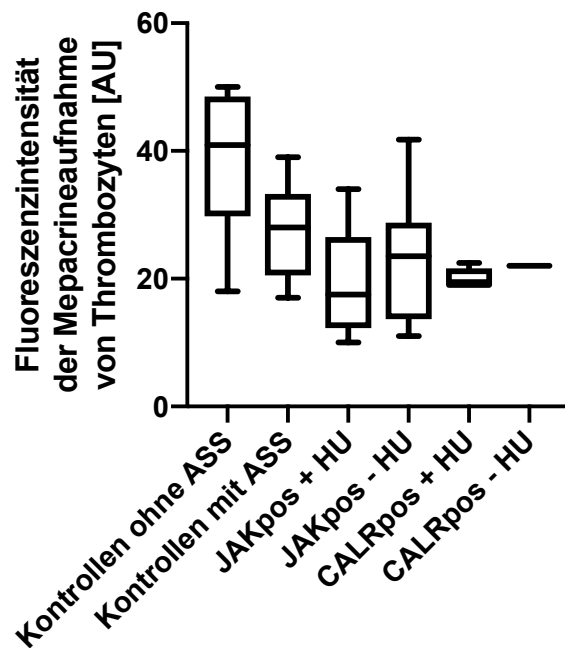


Abbildung 27: Basale Mepacrine Aufnahme in den thrombozytären δ -Granula ohne zusätzliche Agonistengabe. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

Tabelle 33: p-Werte der basalen Mepacrine Aufnahme der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen. * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der CALR-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.

		JAKpos HU	+ JAKpos - HU	CALRpos +HU
Kontrollen ASS	ohne	0,0028*	0,0072*	0,023*
Kontrollen ASS	mit	0,0694	0,23021	0,0799
		unpaired t-Test	unpaired t-Test	Mann- Whitney Test

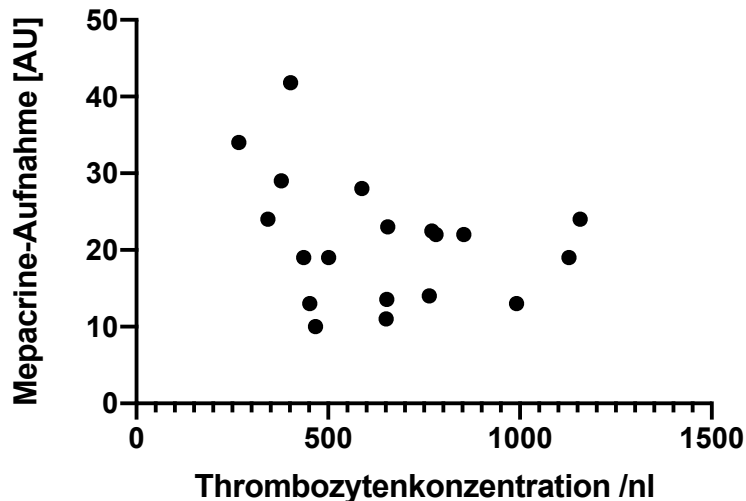


Abbildung 28: Korrelation zwischen der Thrombozytenkonzentration und der Mepacrine Aufnahme nach Pearson

Die tendenzielle negative Korrelation ($r = -0,3092$) der Mepacrine Aufnahme mit der Thrombozytenkonzentration wurde in Abbildung 38 dargestellt. Je höher die Thrombozytenkonzentration war, desto niedriger war die Mepacrine Aufnahme und desto stärker ausgeprägt ein δ -„storage pool“ Defekt. Es bestand allerdings keine statistische Auffälligkeit (p -Wert = 0,1977).

4.1.6.2 Mepacrine-Freisetzung aus den thrombozytären δ -Granula nach Aktivierung mit Convulxin

Durch die Thrombozyten-Aktivierung wird ADP als löslicher Agonist zur autokrinen Verstärkung aus den δ -Granula ausgeschüttet. Demnach wird auch ADP-gebundenes Mepacrine sezerniert die gemessene Mepacrine Fluoreszenz der Thrombozytensinkt physiologischerweise nach dem Aktivierungsreiz in der durchflusszytometrischen Einzelzellanalyse. Ein deutlicher Abfall der Fluoreszenz war in beiden Kontrollgruppen zu beobachten. Die Fluoreszenzintensität der ET Gruppen verringerte sich tendenziell weniger. Der Unterschied in der Fluoreszenzintensität von Mepacrine der ET Patientengruppen zeigte sich aber nur bei den ET Patienten mit *JAK2 V617F* Mutation ohne HU Therapie im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS statistisch auffällig (unpaired t-Test, $p = 0,0199^*$) als statistisch auffällig.

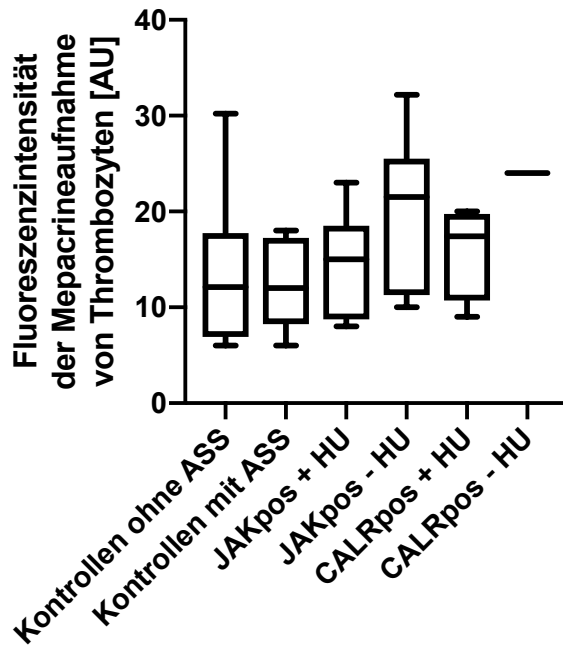


Abbildung 29: Mepacrine Freisetzung nach Aktivierung durch Convulxin 20 ng/ml. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

4.1.6.3 Mepacrine-Freisetzung aus den thrombozytären δ -Granula nach Aktivierung mit Thrombin

Durch die Aktivierung durch Thrombin sank die Fluoreszenzintensität der Kontrollen ohne ASS nicht so stark, wie nach Stimulierung mit Convulxin. Die Mepacrine Freisetzung der Kontrollen mit ASS hingegen sank weiter als die Kontrollen ohne ASS, sodass der Unterschied zwischen den beiden Kontrollgruppen statistisch auffällig war (unpaired t-Test, $p = 0,0262$). Alle ET Gruppen, außer die *JAK2* V617F Gruppe ohne HU, zeigten eine deutliche Fluoreszenzabnahme, vergleichbar mit den Kontrollen mit ASS. Statistisch auffällig war nur der Fluoreszenzunterschied zwischen den ET Patienten mit *CALR* Mutation mit HU Therapie (unpaired t-Test, $p = 0,0362$) und den ET Patienten mit *JAK2* V617F Mutation mit HU Therapie (Mann-WhitneyTest, $p = 0,0306$) und den Kontrollen ohne ASS. Die *CALR* Gruppe ohne HU zeigte nach Aktivierung durch Thrombin 0,2 U/ml eine deutlich höhere Fluoreszenz als alle anderen ET Gruppen und Kontrollen. Da nur ein Wert in dieser Gruppe eingeschlossen war, konnte aber keine statistische Auswertung durchgeführt werden.

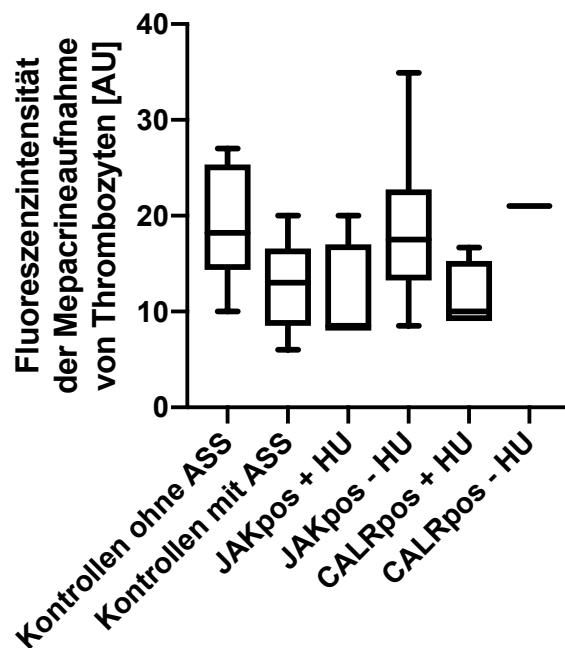


Abbildung 30: Mepacrine Freisetzung nach Aktivierung durch Thrombin mit 0,2 U/ml. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

4.1.6.4 Mepacrine-Freisetzung aus den thrombozytären δ -Granula nach Aktivierung mit Thrombin und Convulxin

Die Ausschüttung von ADP aus den δ -Granula war durch die kombinierte Aktivierung von Thrombin und Convulxin in allen Gruppen vergleichbar. Die Mepacrine Freisetzung der ET Patientengruppen zeigten sich nur in der JAK2 V617F Gruppe ohne HU im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS bei Thrombin 0,2 U/ml + Convulxin 5 ng/ml statistisch auffällig.

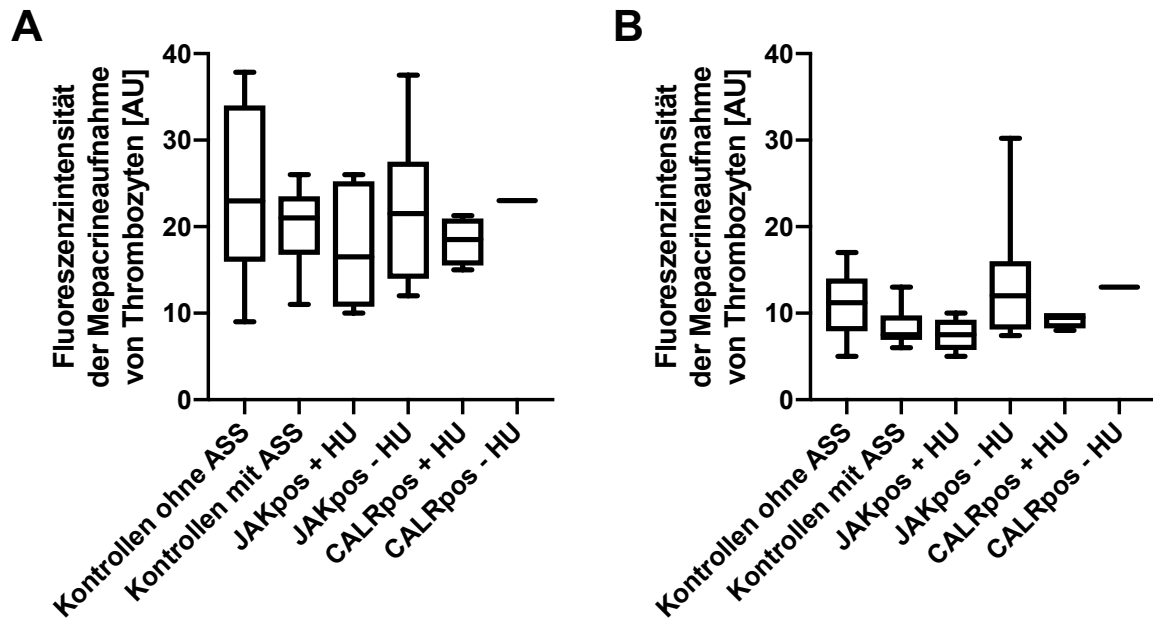


Abbildung 31: Mepacrine Freisetzung nach Aktivierung durch Convulxin 5 ng/ml + Thrombin mit 0 (A) bzw. 0,2 (B) U/ml. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

4.1.7 *Ex vivo* und Agonisten induzierte lysosomale Exozytose durch Betrachtung der LAMP-1 Expression auf der Thrombozytenoberfläche

4.1.7.1 *Basale LAMP-1 Expression auf der Thrombozytenoberfläche*

Die basale Expression von LAMP-1 als Merkmal der Lysosomen Exozytose war in beiden Kontrollgruppen vergleichbar. Die mittlere LAMP-1 Expression der ET Patienten mit *JAK2* V617F Mutation ohne HU Therapie (Mann-Whitney Test, $p = 0,0077$) und mit *CALR* Mutation mit HU Therapie (Mann-Whitney Test, $p = 0,03$) war im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS statistisch nennenswert erhöht. Der stark erhöhte Wert in der *CALR* Gruppe ohne HU kann als Einzelwert statistisch nicht ausgewertet werden.

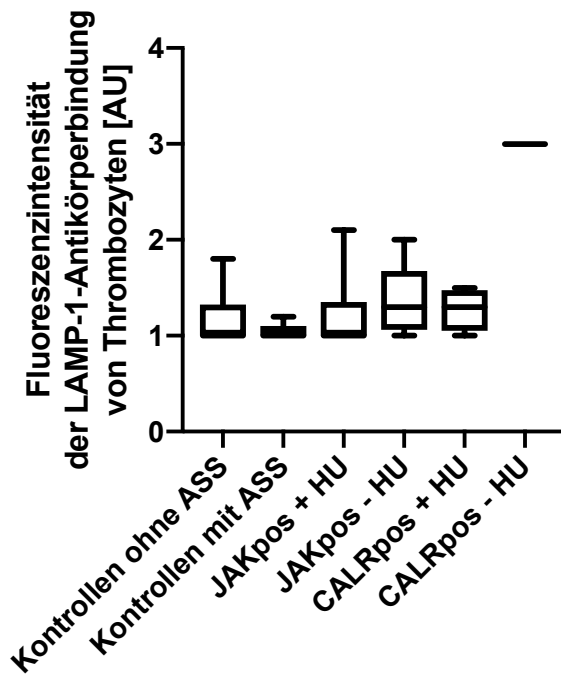


Abbildung 32: Basale LAMP-1-Expression ohne zusätzliche Agonistengabe. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

4.1.7.2 Thrombozytäre LAMP-1 Oberflächen-Expression nach Aktivierung mit Convulxin

Die LAMP-1 Expression der Kontrollgruppe ohne ASS war nach Aktivierung mit Convulxin 5 ng/ml tendenziell erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe mit ASS (statistisch auffällig, Mann-Whitney test $p = 0,0196$) Die beiden *JAK2* V617F Gruppen und in der Gruppe *CALR* mit HU zeigten eine tendenziell verminderte LAMP-1 Expression gegenüber beiden Kontrollgruppen. Statistisch signifikant war dabei die verminderte Expression von LAMP-1 auf der Thrombozytenoberfläche der ET Patienten mit *JAK2* V617F Mutation mit HU Therapie (unpaired t-Test, $p = 0,0115$) gegenüber den Kontrollen ohne ASS.

Nach Aktivierung mit 20 ng/ml waren beide Kontrollgruppen vergleichbar und die beiden *JAK2* V617F Patientengruppen und die *CALR* positiven Patienten ohne HU Therapie deutlich vermindert gegenüber beiden Kontrollgruppen. Die verminderte Expression von LAMP-1 auf der Thrombozytenoberfläche der ET Patienten mit *JAK2* V617F Mutation mit HU Therapie gegenüber den Kontrollen mit (unpaired t-Test, $p = 0,0114$) und ohne (Mann-Whitney test, $p = 0,01$) ASS war statistisch auffällig.

Ebenso war der Unterschied zwischen den ET Patienten mit *JAK2* V617F Mutation ohne HU Therapie gegenüber den Kontrollen ohne ASS (Mann-Whitney Test, $p = 0,0005$) statistisch auffällig. Die *CALR* Gruppe mit HU zeigte eine große Spannweite, aber zeigte sich tendenziell mit den Kontrollgruppen vergleichbar. Die Exozytose der Lysosomen nach Aktivierung durch Convulxin war bei Patienten mit der *JAK2* V617F Mutation tendenziell vermindert.

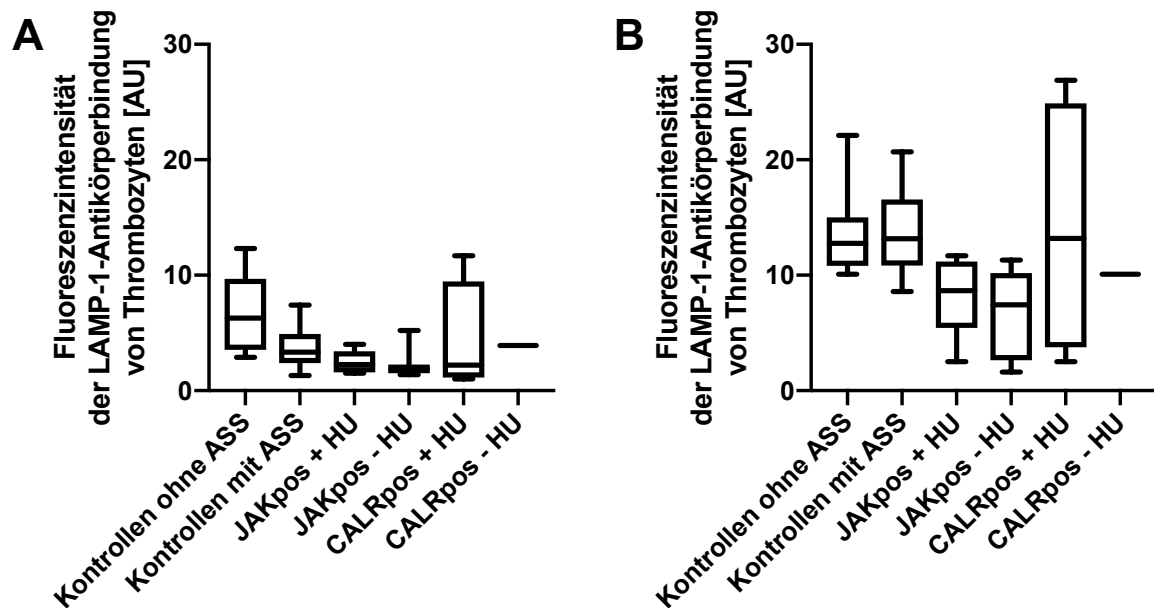


Abbildung 33: Thrombozytäre LAMP-1 Oberflächen-Expression nach Aktivierung durch Convulxin mit 5 (A) bzw. 20 (B) ng/ml. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

4.1.7.3 Thrombozytäre LAMP-1 Oberflächen-Expression nach Aktivierung mit Thrombin

Bei der Thrombozyten-Aktivierung durch Thrombin war die Lysosomen-Exozytose und Präsentation von LAMP-1 nur auf der Thrombozytenoberfläche der ET Patienten mit *JAK2* V617F Mutation mit HU Therapie vermindert. Statistisch auffällig war es im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS bei Aktivierung durch Thrombin 0,1 U/ml (unpaired t-Test, $p = 0,0478$) und 0,2 (unpaired t-Test, $p = 0,0143$) U/ml.

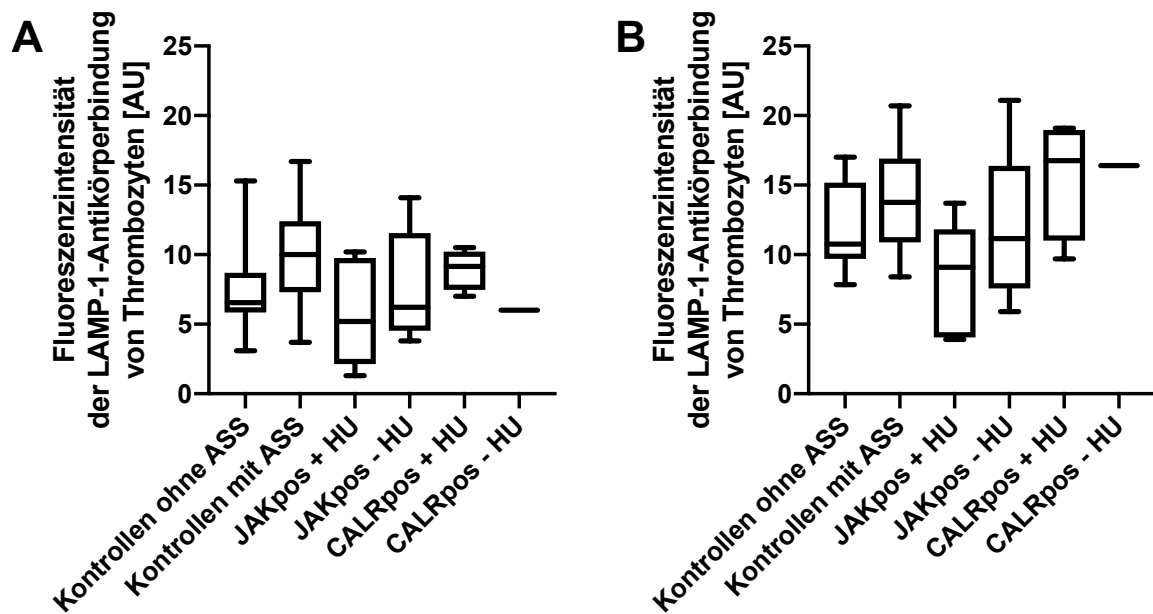


Abbildung 34: Thrombozytäre LAMP-1 Oberflächen-Expression nach Aktivierung durch Thrombin mit 0,1 (A) bzw. 0,2 (B) U/ml. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

4.1.7.4 Thrombozytäre LAMP-1 Oberflächen-Expression nach Aktivierung mit Thrombin plus Convulxin

Bei der erneuten Untersuchung nach Aktivierung mit (Thrombin 0 U/ml +) Convulxin 5 ng/ml war wie in der vorherigen Convulxin 5 ng/ml Untersuchung die LAMP-1 Expression der Kontrollen ohne ASS höher als die der Kontrollen mit ASS (statistisch auffällig, Mann-Whitney test $p = 0,0140$). Die Exozytose von Lysosomen in beiden Kontrollgruppen und mit der *JAK2* V617F positiven Gruppe ohne HU und beiden *CALR* positiven Gruppen vergleichbar. Die *JAK2* V617F positive ET Gruppe mit HU (unpaired t-Test, $p = 0,0049$) und ohne (unpaired t-Test, $p = 0,0035$) Therapie zeigten eine statistisch auffällige verminderte Expression von LAMP-1 im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS.

Bei der simultanen Aktivierung durch Thrombin und Convulxin waren beiden Kontrollgruppen vergleichbar. Die ET Patienten mit *JAK2* V617F Mutation und HU Therapie zeigten wieder eine tendenziell verminderte LAMP-1 Expression, die aber nicht statistisch nennenswert war.

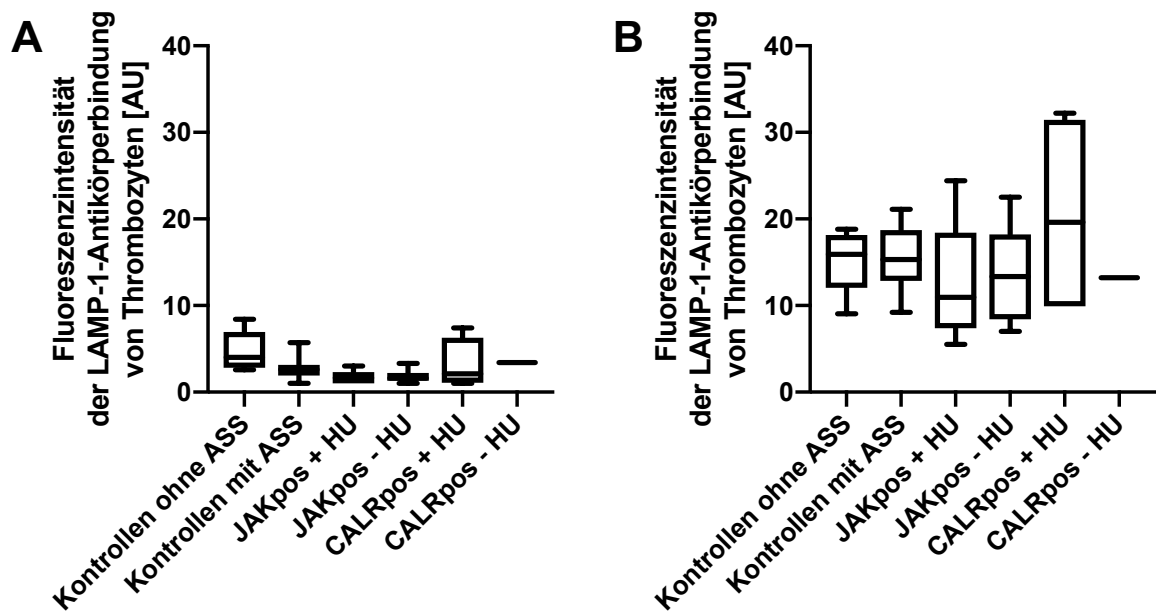


Abbildung 35: Thrombozytäre LAMP-1 Oberflächen-Expression nach Aktivierung durch Convulxin 5 ng/ml + Thrombin mit 0 (A) bzw. 0,2 (B) U/ml. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

4.1.7.5 Thrombozytäre LAMP-1 Oberflächen-Expression nach Aktivierung mit Ca^{2+} Ionophor

Durch die Aktivierung durch Ca^{2+} Ionophor war in beiden Kontrollgruppen vergleichbar. In den ET Gruppen *JAK2* V617F mit HU und in den CALR Gruppen mit und ohne HU zeigte sich wieder eine tendenziell verminderte LAMP-1 Expression. Davon zeigte sich die *JAK2* V617F Gruppe mit HU im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS statistisch auffällig vermindert (Mann-Whitney Test, $p = 0,021$).

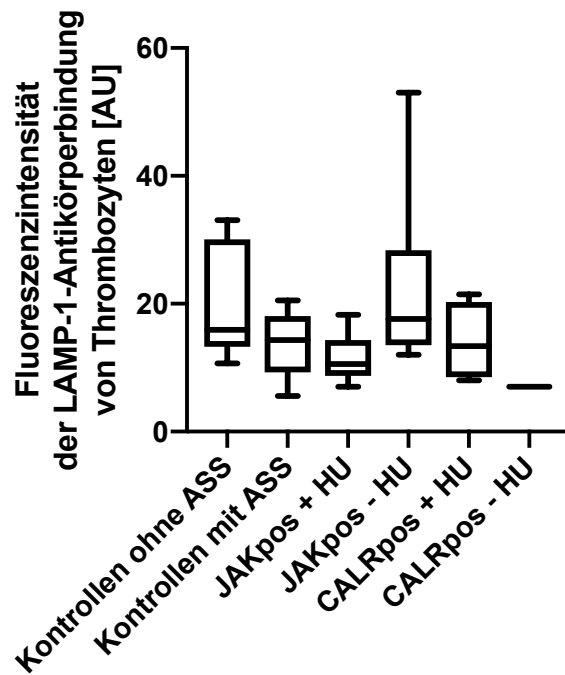


Abbildung 36: Thrombozytäre LAMP-1 Oberflächen-Expression nach Aktivierung durch Ca^{2+} Ionophore 20 μM . Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwert der jeweiligen Gruppe.

4.1.8 Messung des mitochondrialen Membranpotenzials (MMP) der Thrombozyten bei ET Patienten anhand von JC1 *ex vivo*

In der Abbildung 37 wurde das Verhältnis der rötlich-orangen Fluoreszenz der JC1 Aggregate zur grünen Fluoreszenz der JC1 Monomere für alle Gruppen graphisch dargestellt. Je stärker die innere Mitochondrienmembran polarisiert war, desto stärker verschob sich das Verhältnis von Aggregaten zu Monomeren in Richtung der Aggregate (vermehrte rote Fluoreszenz im Vergleich zur grünen Fluoreszenz) und der Quotient wurde größer. War die innere Mitochondrienmembran depolarisiert verschob sich das Verhältnis zur grünen Fluoreszenz. Der Quotient wurde kleiner. Zu beobachten war das geringe MMP der Kontrollgruppen. Das MMP der Kontrollgruppen ohne ASS war im Vergleich zu den Kontrollgruppen mit ASS statistisch auffällig vermindert (Mann-Whitney Test, $p = 0,0266$). Im Vergleich dazu zeigten die zwei Patientengruppen mit der *JAK2* V617F Mutation eine große Spannweite mit sehr hohen und sehr niedrigen Werten. In der Gruppe der ET Patienten mit *JAK2* V617F Mutation mit HU Therapie zeigten zwei von sechs Patienten ein sehr deutlich erhöhtes MMP im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen. Zusätzlich zeigten drei weitere ET Patienten dieser Gruppe ein erhöhtes MMP im

Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS. Ein Patient zeigte ein deutlich vermindertes MMP im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen. In der Gruppe der ET Patienten mit *JAK2* V617F Mutation ohne HU Therapie zeigten ebenfalls zwei von acht Patienten ein stark erhöhtes MMP im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen. Weitere zwei Patienten zeigten ein erhöhtes MMP im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS und vier von acht Patienten zeigten ein MMP, was mit den Kontrollen ohne ASS vergleichbar war. Die Ausprägung war trotz HU Therapie in einem Arm sehr ähnlich. Statistisch auffällig waren das erhöhte MMP der ET Patienten mit *JAK2* V617F Mutation mit HU Therapie (Mann-Whitney Test, $p = 0,0460$) im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS.

Die Patientengruppen mit *CALR* Mutation mit HU Therapie zeigte ein deutlich erhöhtes MMP im Vergleich zu beiden Kontrollen (statistisch signifikant im Mann-Whitney Test, ohne ASS: $p = 0,0028$ und mit ASS: $p = 0,002$). Da zeigten sich vier von vier Patienten mit einem erhöhten MMP im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen. Der Patient mit *CALR* Mutation ohne HU Therapie zeigte ein normales MMP, wobei aufgrund des einzelnen Wertes, eine abschließende Aussage nicht zu treffen war.

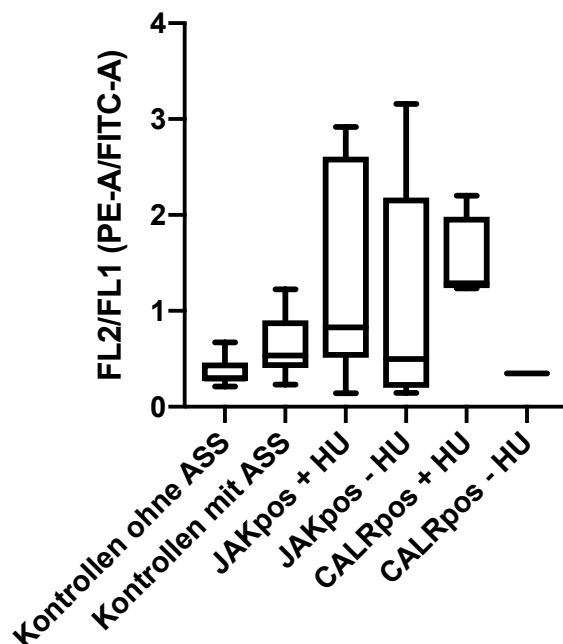


Abbildung 37: Thrombozytäres mitochondriales Membranpotenzial *ex vivo*. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwerte der jeweiligen Gruppe.

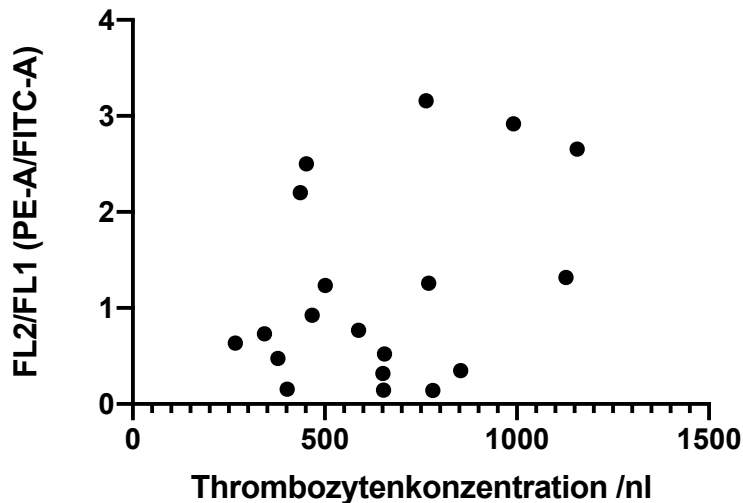


Abbildung 38: Korrelation zwischen der Thrombozytenkonzentration und dem mitochondrialen Membranpotenzial der Thrombozyten nach Pearson

Die Abbildung 38 stellt die Stärke des Zusammenhangs zwischen der Thrombozytenkonzentration und der Höhe des MMP dar. Tendenziell war zu beobachten, je höher die Thrombozytenkonzentration, desto höher war auch das MMP der Mitochondrien der Thrombozyten ($r = 0,3630$). Es bestand allerdings keine statistische Auffälligkeit (p -Wert = $0,1266$).

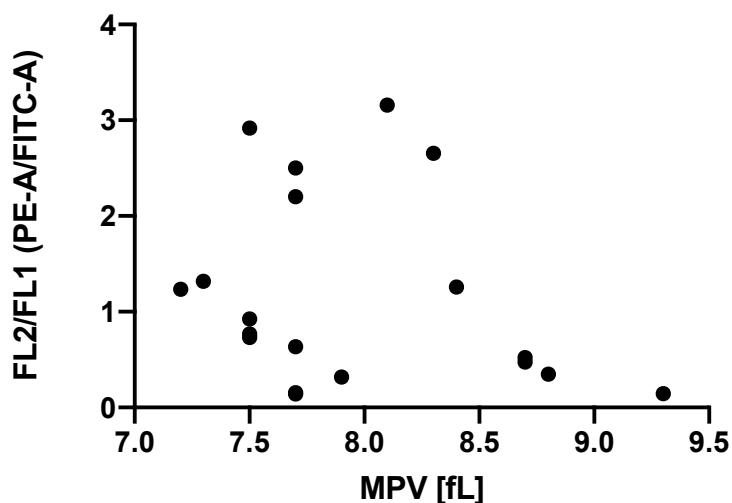


Abbildung 39: Korrelation zwischen dem MPVs und dem mitochondrialen Membranpotenzial der Thrombozyten nach Pearson

In der Abbildung 39 wird die schwache negative Korrelation des MPVs mit dem MMP dargestellt. Je kleiner das MPV, desto größer war das MMP ($r = -0,2438$). Statistisch ergab sich keine Auffälligkeit (p -Wert = $0,3145$).

4.1.9 PDI Oberflächenexpression *ex vivo* auf Thrombozyten von ET Patienten

In der Abbildung 34 ist die mittlere Fluoreszenzintensität des anti-PDI-AKs auf der Thrombozytenoberfläche dargestellt. Die PDI Expression der Kontrollen mit ASS zeigt sich statistisch auffällig vermindert im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS (unpaired t-Test, $p= 0,016$). In der Gruppe der ET Patienten mit *JAK2 V617F* Mutation mit HU Therapie zeigten fünf von sechs Patienten eine erhöhte PDI Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe mit ASS. Auch in der Gruppe der ET Patienten mit *JAK2 V617F* Mutation ohne HU Therapie zeigten sechs von sieben Patienten eine erhöhte PDI Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe mit ASS. Weiterhin zeigten drei von vier Patienten der Gruppe der *CALR* mutierten Patienten mit HU Therapie eine erhöhte PDI Expression vor. Statistisch nennenswert war die erhöhte anti-PDI Expression im unpaired t-Test der ET Gruppen im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS, wie in Tabelle 34 dargestellt. Die Gruppe der *CALR* mutierten Patienten mit HU Therapie wiesen dabei aber eine große Spannweite auf. Die Patienten mit der *JAK2 V617F* Mutation mit HU hatten eine tendenziell geringere Expression von PDI auf der Thrombozytenoberfläche als die *JAK2 V617F* Patienten, die kein HU nehmen. Ein Einfluss von HU auf die PDI Oberflächenexpression ist nicht auszuschließen.

Tabelle 34: p-Werte im unpaired t Test der PDI Expression der ET Patienten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen. * statistisch auffälliger Wert. Keine statistische Auswertung der *CALR*-HU Gruppe möglich, da diese Gruppe nur einen Wert beinhaltet.

	JAK +HU	JAK - HU	CALR +HU
Kontrollen ohne ASS	0,6036	0,332	0,1958
Kontrollen mit ASS	0,0002*	0,0003*	0,0028*

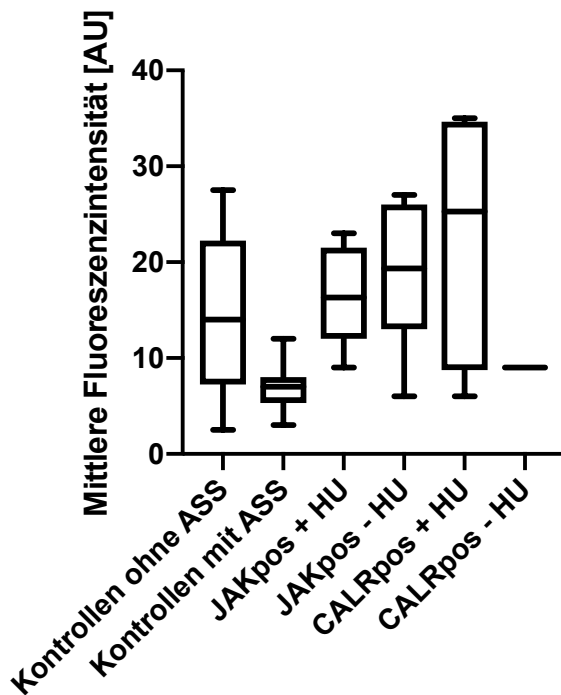


Abbildung 40: Vergleich der PDI Oberflächenexpression. Boxplotdarstellung mit Minimal- und Maximalwerte der jeweiligen Gruppe.

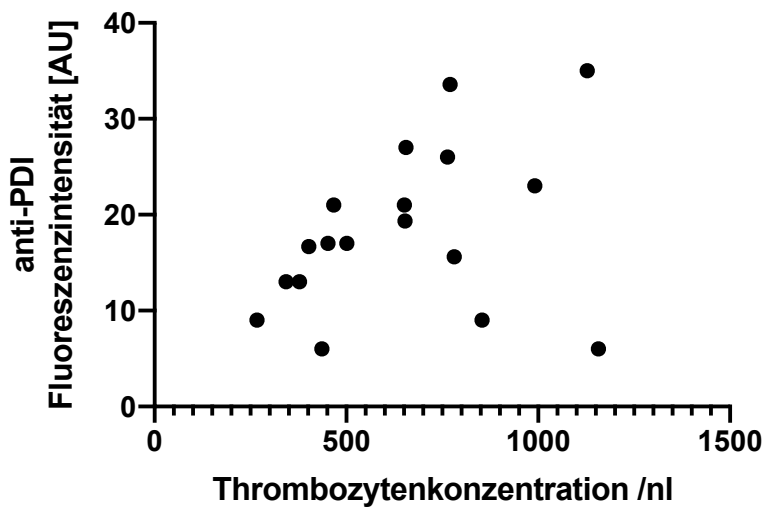


Abbildung 41: Korrelation zwischen der Thrombozytenkonzentration und der PDI Expression auf der Oberfläche der Thrombozyten nach Pearson

In der Abbildung 41 konnte graphisch und anhand des Korrelationskoeffizients tendenziell eine positive Korrelation zwischen der Thrombozytenkonzentration und der PDI Expression auf der Thrombozytenoberfläche beobachten werden ($r = 0,3500$). Statistisch auffällig war diese Beobachtung bei der geringen Fallzahl aber nicht ($p\text{-Wert} = 0,1544$).

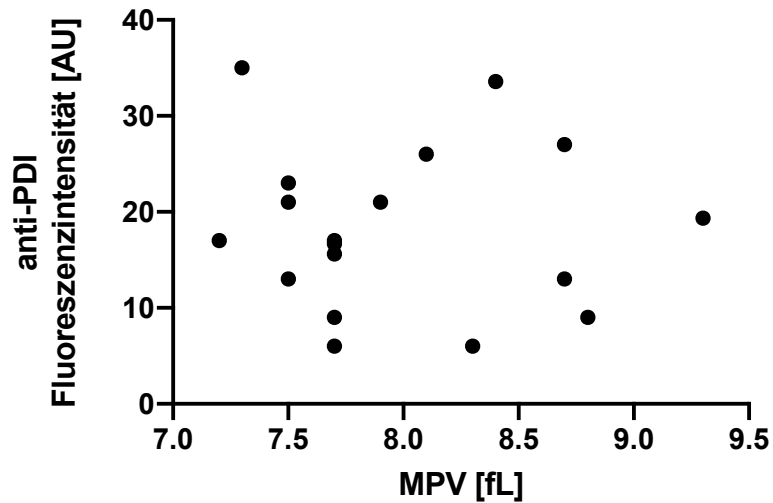


Abbildung 42: Korrelation zwischen dem MPVs und der PDI Expression auf der Oberfläche der Thrombozyten nach Pearson

In der Abbildung 42 konnte mit einem Korrelationskoeffizienten nahe null ($r = -0,05065$), keine Korrelation zwischen dem MPV und der PDI Expression auf der Oberfläche der Thrombozyten festgestellt werden (p -Wert = $0,8418$).

5 Diskussion

Die Aufklärung der Pathogenese der paradoxen thrombotischen und hämorrhagischen Ereignisse in der ET und die Identifikation von prädiktiven Parametern für das Eintreten dieser Komplikationen bei ET Patienten sind schon lange im Fokus von intensiven Untersuchungen. Einzelne Parameter, die auf eine erhöhte Aktivierung der Thrombozyten bei ET Patienten hinweisen, sind beschrieben [120–122]. Die Verbesserung der medizinischen Versorgung dieser Patienten konnte damit aber nicht erzielt werden. Diese Studie untersuchte erstmals thrombozytäre Aktivierungsparameter *ex vivo* und *in vitro* vergleichend in den beiden größten Gruppen der „driver mutation“ (*JAK2* V617F Mutation mit 55 % der betroffenen ET Patienten und *CALR* Mutation mit 25 % der betroffenen ET Patienten) mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Außerdem wurde der Einfluss einer zytoreduktiven Therapie mit HU auf die jeweilige Gruppe erstmals betrachtet. Als Kontrollen wurden 10 gesunde Probanden sowohl ohne als auch mit ASS-Einnahme untersucht. Untersucht wurde die Thrombozytenfunktion anhand der Sekretion von α -Granula, δ -Granula und Lysosomen. Auch beurteilt wurden die Bindungskapazität von vWF und die Aktivität des GPIIb/IIIa Rezeptors anhand der Fibrinogenbindung und der PAC-1 Expression auf der Thrombozytenoberfläche. Erstmals wurde das mitochondriale Membranpotenzial (MMP) der Thrombozyten von ET Patienten *ex vivo* untersucht, das eine regulatorische Rolle der Thrombozytenfunktion übernimmt. Auch die Untersuchung der Expression der extrazellulären PDI auf der Thrombozytenoberfläche war erstmalig Gegenstand der Untersuchung. Es konnte gezeigt werden, dass das MMP der Thrombozyten von ET Patienten tendenziell hyperpolarisiert ist und die PDI Expression auf der Thrombozytenoberfläche tendenziell erhöht ist.

Insgesamt umfasste die Studie Daten von 19 ET Patienten. Die häufigere *JAK2* V617F Mutation war mit 14 Patienten repräsentiert und die *CALR* Mutation mit fünf Patienten. Die beiden Patientengruppen wurden zusätzlich unterteilt, ob eine zytoreduktive Therapie mit HU angewendet wurde oder nicht. In der Gruppe der *JAK2* V617F Mutation waren sechs Patienten mit und acht Patienten ohne HU eingestellt. In der Gruppe der *CALR* Mutation nahmen vier Patienten HU und nur einer kein HU. Ebenfalls gehört die Thrombozytenaggregation mit ASS zur Standardtherapie, die bei mehr als 50% der ET-Patienten in jeder Gruppe erfolgte. Mögliche „non-responder“ trotz der Einnahme von ASS bzw. Patienten mit

mangelnder „Compliance“ und somit mit intakter Thromboxan-A₂-Synthese konnten anhand der in dieser Arbeit benutzten Methoden nicht festgestellt werden und werden im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit aus der Arbeitsgruppe von [REDACTED] untersucht.

Die in dieser Studie untersuchten thrombozytären Parameter repräsentieren etablierte und neue Funktionsparameter von Thrombozyten im Bereich der primären Hämostase, die eine differenzierte Beurteilung der Aktivierung von Thrombozyten *in vivo* und deren Aktivierbarkeit *in vitro* erlauben. Alle Parameter wurden anhand von Fluorochrom-markierten-AK oder -Marker in der Durchflusszytometrie gemessen. Die Durchflusszytometrie ist besonders für die Analyse von einzelnen Rezeptoren und Molekülen von Subpopulationen interessant [123]. Allerdings erlaubt die gemessene Fluoreszenz nur indirekte Rückschlüsse auf die Quantität und/oder Qualität der untersuchten Epitope. Weiterhin ist die Durchflusszytometrie eine statische Untersuchung, die die untersuchten Thrombozyten, nur zu einem bestimmten Zeitpunkt in der peripheren Blutzirkulation abbildet. Der entscheidende Vorteil der Durchflusszytometrie ist aber, dass eine sehr große Anzahl an Zellen mit verhältnismäßig wenig Aufwand und auf Einzelbasis untersucht werden können. Durch den Einsatz von Fluorochrom-markierten AKs oder -Markern ist eine spezifische Untersuchung von einzelnen Strukturen möglich, die die Erforschung der primären Hämostase auf zellulärer Ebene möglich machen. Das verfolgte Ziel war ein besseres Verständnis der Funktion der Thrombozyten von ET Patienten und des Einflusses, den die zugrunde liegende Mutation und die angewendete Therapie auf die Thrombozytenfunktion hat.

Zum Zeitpunkt der Untersuchung muss mit interindividuell variierenden Verhältnissen ausgegangen werden. Sie kommen bereits bei gesunden Probanden vor und herrschen auch bei den Patienten. Generell ist die Untersuchung eines dynamischen Geschehens, wie dem der Hämostase eine Herausforderung. Zu dem Zweck wurde bei jedem Patienten für jeden Funktionsparameter ein Basalwert eruiert und für die Thrombozyten-Reaktivität *in vitro* verschiedene Agonisten mit unterschiedlichen Konzentrationen für etablierten Funktionsparameter untersucht.

Das Kollektiv der Patienten war wegen der Seltenheit der ET-Erkrankung sehr klein, sodass eine Power-Kalkulation für relevante thrombozytäre Funktionsparameter nicht

zu der erforderlichen Gruppengröße führte. Dies erschwerte eine statistische Evaluierung der Ergebnisse. Die durchgeführten statistischen Analysen bestätigten Auffälligkeiten zwischen den gemessenen Gruppen, bildeten aber keine Signifikanzen, die auf die Gesamtpopulation übertragen werden können.

Die mittlere Dauer der HU Therapie in beiden Mutationsgruppen der ET Patienten unterscheidet sich deutlich. Die ET Patienten mit *JAK2* V617F Mutation in unserem Kollektiv nahmen die HU Therapie bis zum Untersuchungszeitpunkt im Mittel seit 3 Jahren und 7 Monaten. Darunter ist die mittlere Thrombozytenkonzentration im Mittel bei 550 Thrombozyten/nl, also noch leicht erhöht im Vergleich zum oberen Normwert von 450 /nl. Die ET Patienten mit *CALR* Mutation hingegen nahmen die HU Therapie im Mittel seit deutlich längerer Zeit ein, und zwar bis zum Untersuchungszeitpunkt seit 8 Jahren und einem Monat. In dieser Gruppe ist zum Untersuchungszeitpunkt die mittlere Thrombozytenkonzentration 709/nl. Dies könnte erklärt werden durch die generell erhöhten Thrombozytenkonzentration bei ET Patienten mit *CALR* Mutation [2] und dem früheren Therapiebeginn aufgrund dieser sehr hohen Zahl. Allerdings ist die Anwendung und Dosis auch immer durch das Nebenwirkungsspektrum limitiert [41], sodass in dieser Gruppe immer noch sehr hohe Thrombozytenkonzentrationen gemessen wurden, auch mit HU Therapie. In ihrer Untersuchung zum Ansprechen der HU Therapie bei ET Patienten zeigten Carrobio et al. [124], dass nach 12 Monaten Therapiedauer der größte Anteil (58%) eine partielle Remission erreicht (Thrombozytenkonzentration zwischen 400-600 /nL, Persistenz einer Leukozytose oder klinische Symptome, wie mikrovaskuläre Symptome oder Splenomegalie). Der Anteil an „non responder“ war gering. Die beste Wirkung zeigte HU bei Patienten mit einer *JAK2* V617F Mutation oder >60 Jahre. Auch in dieser Studie zeigte sich die Anzahl der Thrombosen unabhängig von der Thrombozytenzahl.

5.1 *Ex vivo* Aktivierungstatus der Thrombozyten bei ET-Patienten

Die basale Ausprägung der Thrombozytenmerkmale spiegelt den *in vivo* Aktivierungszustand der Thrombozyten bei ET Patienten wider. Dadurch entsteht ein Abbild der Thrombozyten bei ET Patienten, wie sie in der Blutzirkulation der Patienten vorkommen. Betrachtet wurden die vWF-Bindung, die Fibrinogenbindung als indirekter Marker und die PAC-1 als direkter Marker der GPIIb/IIIa Aktivierung, die Oberflächenexpression von CD62P, CD63, LAMP-1; und die Mepacrine Aufnahme.

Die basale Bindung von vWF auf der Thrombozytenoberfläche unterscheidet sich zwischen den beiden Kontrollgruppen. Es zeichnet sich eine deutlich höhere basale Bindung von vWF auf der Thrombozytenoberfläche der Kontrollen mit ASS als der Kontrollen ohne ASS. Da durch die Therapie mit ASS die intra-thrombozytäre Thromboxan A₂ Produktion irreversibel gehemmt ist und zwischen den beiden Kontrollgruppen ein deutlicher Unterschied zu sehen ist, liegt die Vermutung nahe, dass die basale vWF Bindung durch die Thromboxan A₂ Produktion und Freisetzung beeinflusst wird.

Alle ET Gruppen zeigen eine tendenziell höhere vWF Bindung auf der Thrombozytenoberfläche als bei der Kontrollgruppe ohne ASS. Die vWF Bindung zeigte sich allerdings in allen ET Gruppen nicht so erhöht, wie in der Kontrollgruppe mit ASS.

Der vWF ist ein einzigartiges Plasmaprotein, das Thrombozyten unter hohen Scherkräften an einer Gefäßläsion über die Bindung an Kollagen abbremst. Die Scherkräfte sind besonders in arteriellen Gefäßen und in der Mikrozirkulation hoch. Gerade in diesen beiden Gebieten des Gefäßsystems findet man bei ET Patienten die häufigsten Thrombosen [6]. Die Erythromelalgie als eindrucksvolle Manifestation einer mikrovaskulären Störung wurde ausführlich untersucht, in dem man kutane Biopsien entnahm [125,126]. In diesen Biopsien konnten mikrovaskuläre, thrombozytäre Gefäßverschlüsse nachgewiesen werden [25]. Die Anfärbung dieser Thrombi, die auf Arteriolen begrenzt waren, zeigte eine hohe Expression an vWF und kaum Fibrin [25,125,126]. Auch konnten im Blutaussstrich aktivierte Thrombozyten mit Pseudopodien und zentralisierten Granula beobachtet werden, die sich zu Thrombozytenaggregaten zusammenlagerten [6]. Die zusätzliche Beobachtung, dass unter ASS Therapie eine prompte Besserung einsetzte, die unter Antikoagulation mit Warfarin fehlte [8] und erhöhte Marker der Thromboxanproduktion (Thromboxan B₂ als Marker für Thromboxan A₂ im Serum und Urin erhöht), sprechen für einen thrombozytären Ursprung der mikrovaskulären Störungen [127].

Mithilfe der im Rahmen dieser Dissertation gewonnenen Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass alle ET Gruppen eine tendenziell höhere vWF Bindung auf der Thrombozytenoberfläche als bei der Kontrollgruppe ohne ASS zeigen. Die JAK2 V617F-positiven Patienten zeigen eine tendenziell erhöhte vWF Bindung als die CALR-positiven Patienten. Im Vergleich bezüglich der HU Therapie wird auch

ersichtlich, dass in beiden Mutationsgruppen die vWF Bindung höher war, wenn keine HU Therapie durchgeführt wurde.

Der erhöhte basale Wert der vWF Bindung könnte sich mit der Hypothese decken, dass eine *in vivo* Hyperreaktivität der Thrombozyten bei ET Patienten herrscht oder zumindest die Schwelle der Aktivierung der Thrombozyten bei ET geringer ist [6]. Die Kombination von erhöhtem Scherstress mit hyperreaktiven Thrombozyten kann zu einer Scherstress-induzierten Aktivierung der Thrombozyten und zu einer vWF-abhängigen Thrombusbildung, führen, wie sie in den histopathologischen Befunden von Erythromelalgie Patienten beobachtet wurden. Jensen et al. [120] berichten, dass einige Glykoproteine/Rezeptoren auf der Membran der Thrombozyten vermindert exprimiert werden, darunter auch GPIb α , als Bindungsstelle für den vWF. Es wurden 50 Patienten mit MPN (ET, PV und PMF) untersucht. Bereits die basale Expression von GPIb α war bei dieser ebenfalls durchflusszytometrischen Untersuchung vermindert. Leytin et al. [128] wiesen in ihrer Untersuchung nach, dass hoher Scherstress zur Aktivierung der Thrombozyten und Herunterregulierung von GPIb α führt. Dies wäre ein weiterer Hinweis auf die Zirkulation von aktivierten Thrombozyten im basalen Zustand. Allerdings geht eine Verminderung von GPIb α eher mit einer verminderten als mit einer erhöhten vWF-Bindung einher. Bei nachgewiesener erhöhter vWF-Bindung im basalen Zustand muss vWF über einen weiteren Rezeptor an der Thrombozytenoberfläche gebunden werden. Die Rezeptorquantifizierung inklusive GPIb α und GPIIb/IIIa wird im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit aus der Arbeitsgruppe von ██████████ untersucht.

Ob diese Beobachtung auf intrinsische Veränderungen der ET Thrombozyten in Kombination mit dem erhöhten Scherstress der Mikrozirkulation zu erklären ist, muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Das Ausmaß der PAC-1 Expression und die Fibrinogenbindung auf der Thrombozytenoberfläche stellen den finalen Zustand des aktivierten GPIIb/IIIa Rezeptors durch vielseitige Signalwege dar. Im basalen Zustand war die PAC-1 Expression bei den Kontrollen und bei den ET Patienten unabhängig der Mutation und Therapie niedrig und zwischen allen Gruppen vergleichbar. In der Literatur wird kein statistischer Unterschied der basalen PAC-1 Expression zwischen den MPN Patienten und den Kontrollen beschrieben (Jensen et al. [120]). Diese Ergebnisse

konnten auch, trotz des unterschiedlichen Patientenkollektivs, in dieser Untersuchung reproduziert werden. Es wurde aber nicht nur der Nachweis der aktivierungsabhängigen Domäne des GPIIb/IIIa Rezeptors anhand der anti-PAC-1 Expression untersucht, sondern auch die Fibrinogen-Bindungskapazität als indirekter Marker für die GPIIb/IIIa Aktivierung. Die thrombozytäre Fibrinogenbindung über aktivierte GPIIb/IIIa Rezeptoren führt zur Thrombozyten-Aggregation und leitet die die thrombozytäre Thrombusentstehung ein. Die basale Fibrinogenbindung an den Thrombozyten war tendenziell bei der Kontrollgruppe mit ASS vermindert im Vergleich zu der Kontrollgruppe ohne ASS. Diese Beobachtung kann zu dem Schluss führen, dass die Hemmung der Thromboxan A₂ Produktion in den Thrombozyten und nachfolgende Freisetzung zu einer verminderten Fibrinogenbindung an deren Oberfläche führen kann. Durch die verminderte Fibrinogenbindung auf der Thrombozytenoberfläche ist die Bildung eines Thrombozyten-reichen Thrombus eingeschränkt, was die Wirkung von ASS als antiaggregatorische Substanz bestätigt .

Die ET Patienten unabhängig von der Mutation und der Therapie mit oder ohne HU zeigten eine deutlich verminderte Fibrinogenbindung an der Oberfläche ihrer Thrombozyten im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS. Die verminderte Fibrinogenbindung stellte sich in unserer Untersuchung ähnlich vermindert wie bei den Kontrollen mit ASS dar. Tendenziell binden die ET Patienten mit HU Therapie auch noch weniger Fibrinogen als die respektiven Gruppen ohne HU. Es wurde die Beobachtung gemacht, dass HU die Thrombozyten-Leukozyten Interaktion bei ET Patienten hemmt und dadurch auch die Fibrinogenbindung an der Thrombozytenoberfläche herunterreguliert wird [130,131].

Im basalen Zustand ist somit vorrangig die verminderte Fibrinogenbindung der ET Patienten im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS auffällig. Basierend auf den Ergebnissen dieser Doktorarbeit ist keine Aussage über eine quantitative Verminderung des GPIIb/IIIa möglich, allerdings ist diese ebenfalls von Jensen et al. im basalen Zustand beschrieben. Die Rezeptorquantifizierung inklusive GPIIb/IIIa wird im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von ██████████ untersucht.

Die CD62P Oberflächen-Expression ist ein weiterer wichtiger Parameter für den Aktivierungsstatus der Thrombozyten und repräsentiert die Sekretion/Exozytose der α -Granula.

Thrombozyten von Kontrollen ohne ASS exprimieren tendenziell etwas mehr P-Selektin als die Kontrollen mit ASS, anders als von Trelinski et al. beschrieben. Alle ET Gruppen exprimieren mehr CD62P als die Kontrollen mit ASS. Die ET Gruppen beider Mutationen ohne HU Therapie sogar tendenziell mehr als die Kontrollen ohne ASS.

Die *JAK2* V617F-positive ET Gruppe ohne HU zeigt sogar eine statistisch auffällige Erhöhung der CD62P Expression im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS (*CALR* ohne HU statistisch nicht auswertbar). Die ET Patienten mit HU scheinen tendenziell weniger CD62P zu exprimieren, als die ET Patienten ohne HU. In der Studie von Trelinski et al. [131] wird beschrieben, dass nach Therapie mit ASS oder HU eine tendenziell erhöhte CD62P Expression unter anderem auch basal zu beobachten ist. Der Nachweis der P-Selektin Präsentation auf der Oberfläche von Thrombozyten ist eine geläufige Untersuchung der Thrombozytenfunktion und des Aktivierungsstatus. Sie dient dem Nachweis der akuten Exozytose der α -Granula als wichtiger Verstärkungsmechanismus der initialen Thrombozytenaktivierung. Somit kann man anhand dieses Parameters sagen, dass die Thrombozyten bei ET Patienten in einem Zustand zirkulieren, bei dem es bereits zur partiellen Exozytose der α -Granula gekommen ist. Diese Ergebnisse decken sich mit der Studie von Jensen et al. [120], dessen Beobachtungen sich auf ET, PV und PMF Patienten stützen. Auch Falanga et al. [121] beobachteten eine erhöhte basale Expression von P-Selektin, bei dem sie zwischen *JAK2* V617F-positive und -negative Patienten unterschieden. Seit die *CALR* Mutation 2013 als zweithäufigste „driver mutation“ identifiziert wurde, kann die Gruppe der *JAK2* V617F-negativen Patienten anhand dieser Mutation weiter aufgeschlüsselt werden. In der Studie, auf der diese Arbeit basiert, wurden daher Patienten mit *JAK2* V617F- und *CALR* Mutation verglichen. Auch bei genauerer Unterscheidung beider Gruppen bleibt die basale P-Selektin Expression in beiden Gruppen basal tendenziell erhöht im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS. Falanga et al. [121] notierten zwar die Therapie ihrer ET Patienten, untersuchten die P-Selektin Ausprägung aber nicht danach. In dieser Arbeit wurde auf die Therapie in der Auswertung Rücksicht genommen und dargestellt. Die reduzierte CD62P Expression bei ET Patienten mit zytoreduktiver HU Therapie, zeigt, dass bei diesen Patienten im

basalen Zustand weniger α -Granula ausgeschüttet worden sind. Die HU Therapie ist eine symptomatische Therapie, die die Thrombozytenkonzentration senkt. Zum aktuellen Zeitpunkt wird davon ausgegangen, dass HU die Reaktivität der Thrombozyten nicht beeinflusst [29]. Durch den geringeren Thrombozytenumsatz zirkulieren aber weniger junge Thrombozyten, die Thrombozyten sind weniger reaktiv, womit die geringere P-Selektin Expression zusammenhängen kann [133,134]. In der Studie von Karakantza et al. [122], die die CD62P und CD63 Expression bei Patienten mit ET und PV vor und nach dem Beginn einer HU Therapie maßen, wurde kein signifikanter Einfluss der HU Therapie auf die Expression von CD62P und CD63 festgestellt.

Der wiederholte Nachweis von basal erhöhter P-Selektin Expression, ob in Vollblut Untersuchungen wie bei Falanga et al. oder im PRP wie in dieser Studie, decken sich mit der Hypothese von zirkulierenden hyperreaktiven bzw. aktivierten Thrombozyten in vivo, wie von Michiels et al. postuliert [6].

Auch die CD63 Oberflächenexpression ist ein etablierter Marker zur Einschätzung der Thrombozytenfunktion, der bei ET Patienten untersucht wurde. Wie CD62P, wird er als Marker des Sekretionsprozesses von intrathrombozytären Granula genutzt und erlaubt eine Aussage zur Störungen der Sekretion der δ -Granula und Lysosomen. Im basalen Zustand besteht kein statistisch auffälliger Unterschied zwischen den Kontrollgruppen, sodass man sagen kann, dass bei der basalen CD63 Oberflächenexpression die Thromboxan A₂-abhängige Aktivierung keine prominente Rolle spielt. In unserer Untersuchung ist die basale CD63 Expression bei den ET Gruppen tendenziell leicht erhöht im Vergleich zu den Kontrollgruppen, ausgenommen die ET Patienten mit der *CALR* Mutation ohne HU Therapie. Die CD63 Expression der ET Patienten zeigt basal keine statistischen Auffälligkeiten im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen. Jensen et al. [120] fanden in ihrer Untersuchung von 50 MPN Patienten (ET, PV und PMF) keine basal erhöhte Expression von CD63. Karakantza et al. [122] fanden auch keine in vivo/basal signifikant erhöhte CD63 Expression bei ET und PV Patienten. Zu beobachten ist, dass die absoluten Fluoreszenzwerte der CD63 Expression deutlich geringer sind, als die von P-Selektin, da die Anzahl der beiden Granula-Gruppen deutlich kleiner ist, als die der α -Granula. Da sich CD63 auf der Membran von Lysosomen aber auch

von δ -Granula befindet, bildet dessen Präsentation auf der Thrombozytenoberfläche einen wichtigen Verstärkungsmechanismus der Thrombozytenaktivierung ab.

Die basale Mepacrine Aufnahme ist bei den Kontrollen mit ASS statistisch auffällig vermindert im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS. Dies spricht dafür, dass die Thromboxan A₂-abhängige Aktivierung eine Rolle in der Akkumulation/Retention von ADP und ATP in den δ -Granula spielen könnte. Die basale Mepacrine-Aufnahme der Thrombozyten von ET Patienten hingegen war im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen stark vermindert und im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS statistisch auffällig vermindert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Anzahl an δ -Granula oder der δ -Granula-Inhalt in den Thrombozyten der untersuchten ET Patienten unabhängig vom Mutationsstatus und der HU-Therapie vermindert ist. Diese Beobachtung ist vereinbar mit einer verminderten Konzentration von Adenin-Nukleotiden, wie z.B. ADP und ATP, oder einer verminderten Anzahl an δ -Granula in den Thrombozyten, wie sie bei einem δ -„storage pool“ Defekt vorkommen. Für eine weitere Diskussion des δ -„storage pool“ Defekts siehe Kapitel 5.2.3.

Die LAMP-1 Expression der Thrombozyten von ET Patienten ohne Stimulierung war tendenziell erhöht im Vergleich zu den Kontrollen ohne und mit ASS, was für eine bereits erfolgte lysosomale Exozytose spricht. CD63 ist als Oberflächenmarker auf Lysosomen und auf δ -Granula zu finden. Durch die Untersuchung der Mepacrine Aufnahme konnten wir feststellen, dass die δ -Granula bei ET Patienten beeinträchtigt sind. Jedoch haben wir auch eine tendenzielle Erhöhung des CD63 auf der Thrombozytenoberfläche der ET Patienten festgestellt. Dies könnte durch die durch die Überlagerung des lysosomalen Anteils von CD63 erklärt werden. Eine erhöhte lysosomale Exozytose bei ET Patienten ist aber bisher nicht beschrieben.

Die Ergebnisse der basalen Ausprägung der verschiedenen thrombozytären Aktivierungsmarker reproduzieren zum großen Teil die bekannten Feststellungen aus der Literatur. Neu ist die erhöhte basale Bindung von vWF auf der Thrombozytenoberfläche, die ein Hinweis auf den thrombozytären Ursprung der bei ET beobachteten Thrombosen ist.

5.2 Aktivierungspotential der Thrombozyten von ET-Patienten *in vitro*

Nachfolgend wird die Ausprägung der einzelnen Thrombozyten-Funktionsparameter nach Aktivierung mit verschiedenen Agonisten *in vitro* diskutiert.

5.2.1 Verminderte vWF-Bindung an die Thrombozytenoberfläche von ET-Patienten ohne HU-Therapie induziert durch Ristocetin bzw. Convulxin

Bei der Untersuchung des thrombozytären Bindungsverhaltens des vWF war zu beobachten, dass bei einer maximalen Convulxin Konzentration (20 ng/ml) die Thromboxan A₂ abhängige Aktivierung einen Einfluss auf die vWF-Bindung auf der Thrombozytenoberfläche bei Kontrollprobanden hat. Bei den ET Patienten fiel eine statistisch auffällig verminderte vWF Bindung der ET Patienten beider Mutationsgruppen ohne HU nach Aktivierung mit Ristocetin und Convulxin auf im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen.

Die erhöhte Thrombozytenkonzentration, die bei den ET Patienten vorliegt, kann mit einem erworbenen von Willebrand Syndrom (aVWD) assoziiert sein, bei dem es zu einer vermehrten Spaltung der „Ultralarge“ vWF-Multimeren (ULVWF) durch das Enzym „a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13“ (ADAMTS13) kommt. Der ULVWF bindet Thrombozyten mit hoher Affinität und bildet so eine prothrombotische Wirkung aus. Er wird aus Schutz vor übermäßiger Thrombozytenaggregation durch die ADAMTS13 zu kleineren Multimeren gespalten. Die ADAMTS13 Bindungsstelle des vWF ist in der globulären Struktur, in der der vWF im Plasma zirkuliert, nicht erreichbar, sondern nur in der entfalteten Konformation [135]. Bei der ET wird davon ausgegangen, dass die erhöhte Thrombozytenzahl zu einer erhöhten Bindung von vWF auf den Thrombozyten führt, dass ULVWF vermehrt in der entfalteten Konformation vorliegt und dadurch die Spaltung durch ADAMTS13 erleichtert wird [53–56]. Bei betroffenen Patienten können vermehrt kleine vWF Multimere gemessen werden [54]. Die kleineren vWF Multimere sind weniger koagulatorisch wirksam und äußern sich in einer milden Blutungsneigung. Eine extreme Thrombozytose ist als Risikofaktor für Blutungsereignisse bekannt und es konnte experimentell nachgewiesen werden, dass die proteolytische Spaltung exponentiell mit steigender Thrombozytenzahl zunimmt [53,54,136]. Das aVWD tritt im Rahmen von Grunderkrankungen wie

kardiovaskulären, lymphoproliferativen, myeloproliferativen und autoimmunen Erkrankungen auf [52,59,137]. Bei der ET wird es als die wichtigste Erklärung für die Blutungsneigung angesehen.

Die Patienten bei denen ein aVWD bekannt ist, zeigen eine tendenziell geringere vWF Bindung als das Gesamtkollektiv der jeweiligen Gruppe. In Ihrer Studie zum vWF Phänotyp in Patienten mit ET untersuchten Lancelloti et al.[138] unter anderem das vWF-Antigen (vWF:Ag), die vWF-Aktivität (vWF:Akt) und das Verhältnis vWF:Akt/vWF:Ag. Sie fanden heraus, dass das vWF-Antigen in den ET Patienten, unabhängig von der Blutgruppe ~30% höher war als bei den Kontrollen. Die vWF-Aktivität zeigte sich hingegen bei den ET Patienten um ~20% erniedrigt im Vergleich zu den Kontrollprobanden. Das Verhältnis von vWF:Akt/vWF:Ag zeigt sich bei ET Patienten in der Studie von Lancelloti et al. [138] im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erniedrigt. Ein erniedrigtes vWF:Akt/vWF:Ag Verhältnis weist oft auf ein dysfunktionelles vWF Molekül auf [59], sodass die Autoren auf eine qualitative Schädigung des vWF Moleküls schlossen. Der Referenzwert aus dem Zentrallabor der Unimedizin Mainz zur Diagnose eines aVWD liegt bei 0,7. In unseren Ergebnissen zeigte sich das vWF:Akt/vWF:Ag Verhältnis einer Patientin zum Zeitpunkt der Untersuchung unter diesen Wert erniedrigt. Generell fällt auf, dass bei den Patienten mit *JAK2* V617F Mutation mit HU Therapie der Wert höher ist und somit ein aVWD weniger wahrscheinlich, als bei den respektiven Patienten ohne HU Therapie. HU wirkt nach aktuellen Erkenntnissen rein symptomatisch durch Reduktion der Thrombozytenkonzentration ohne die Biologie der Thrombozyten zu beeinflussen[29].

Weitere Untersuchungen der Beeinflussung der vWF Bindung durch eine HU Therapie sollten Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

5.2.2 Verminderte Aktivierung des GPIIb/IIIa bei ET-Patienten unabhängig von der Mutation/Therapie und vom Agonisten

Anhand der Expression von PAC-1 und die Bindung von Fibrinogen auf der Thrombozytenoberfläche wurde das aktivierte GPIIb/IIIa untersucht. Nach Aktivierung mit den verschiedenen Agonisten zeigte sich die Fibrinogenbindung in beiden Kontrollgruppen immer vergleichbar, sodass man sagen kann, dass diese nicht primär durch Thromboxan A₂ beeinflusst wird. Es konnten außerdem eine verminderte Expression von aktiviertem GPIIb/IIIa der ET Patienten vor allem

gegenüber den Kontrollen ohne ASS festgestellt werden. Bereits in der Literatur wird die basale quantitative Reduktion von GPIIb/IIIa beschrieben (Jensen et al. [120]), unabhängig der Aktivierung. In dieser Untersuchung konnte eine reduzierte Aktivierung von GPIIb/IIIa im basalen Zustand reproduziert werden. Nachdem die Thrombozyten durch Convulxin, Thrombin, Thrombin+Convulxin bzw. Ca^{2+} Ionophor aktiviert wurden, kommt es normalerweise zu einer massiven Erhöhung der GPIIb/IIIa Rezeptoren und zur Aggregation der Thrombozyten über Fibrinogenbrücken. In allen Fällen fällt diese erwartete starke Zunahme an aktiviertem GPIIb/IIIa bei den Thrombozyten der ET-Patienten unabhängig vom Mutations- und Therapiestatus gering bis sehr gering aus. Allerdings gibt uns diese durchflusszytometrische Untersuchung keinen Hinweis ob eine quantitative Verminderung der GPIIb/IIIa Rezeptoren herrscht oder ob nur eine geringere Fraktion aktiviert wird, was auf eine Störung der „outside-in“ Signalwege hindeuten könnte. Interessanterweise, wurde durch eine englische Forschungsgruppe um Moore et al. [132] der Agonisten-induzierte intrazellulären Signalweg zur Aktivierung des GPIIb/IIIa bei ET Patienten untersucht. Sie verglichen 20 *JAK2* V617F-positive Patienten (ET und PV) mit 6 *JAK2* V617F-negativen Patienten und fanden heraus, dass der PI3 Kinase/Rap1 Signalweg in beiden Gruppen gestört ist, unabhängig des *JAK2* V617F Status. Die Aktivierung dieser Kinasen führen physiologischerweise zur Mobilisierung von Ca^{2+} Ionen aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern in das Zytosol und zur Aktivierung der Proteinkinase C, die zur Aktivierung des GPIIb/IIIa mittels inside-out signaling wesentlich beitragen. Durch den Nachweis der Störung dieses Signalweges, kann man davon ausgehen, dass die Aktivierung des GPIIb/IIIa in Thrombozyten von ET Patienten intrinsisch gestört ist [132]. Zur Beurteilung der quantitativen Störung des GPIIb/IIIa auf der Thrombozytenoberfläche von ET Patienten wird im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von [REDACTED] [REDACTED] die Rezeptorquantifizierung, inklusive GP IIb/IIIa, untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass auch die Fibrinogenbindung der Thrombozyten der ET Patienten unabhängig der Mutation vermindert ist. Weiterhin bestehen keine Unterschiede in der Oberflächen-Expression aktivierter GPIIb/IIIa-Rezeptoren bei Therapie mit HU oder nicht.

Die Daten dieser Arbeit und andere Untersuchungen zeigen die funktionelle und/oder quantitative Störung des thrombozytäre GPIIb/IIIa bei ET-Patienten unabhängig der Mutation und der HU-Therapie und des verwendeten Agonisten. Die

Fibrinogenbindung an den aktivierten GPIIb/IIIa Rezeptor bildet die Voraussetzung für die Thrombozyten-Aggregation und die Entstehung eines thrombozytären Thrombus. Demnach würde diese beobachtete Veränderung eher eine Blutungsneigung als eine Thromboseneigung der ET Patienten erklären. Weitere Untersuchungen, um alternative Aggregationswege bei Thrombosen bei ET Patienten zu charakterisieren, sind in der Zukunft notwendig.

5.2.3 δ -„storage pool“ Defekt bei Patienten mit ET

Der δ -„storage pool“ Defekt ist eine sehr heterogene Störung [65,139], die durch eine verminderte Anzahl an thrombozytären δ -Granula oder durch einen verminderten δ -Granulainhalt definiert ist [140]. Der Defekt liegt entweder in einer verminderten Granula-Anzahl oder in der funktionellen Störung der Akkumulation/Retention der δ -Granula Stoffe (ADP, ATP, Serotonin, Ca^{2+} -Ionen, Phosphat) [140]. Durch die verminderte Sekretion der sekundär verstärkenden Agonisten wie ADP und Serotonin kann eine milden Blutungsneigung beobachtet werden [139,140]. In dieser Arbeit wurden das Hauptmembranglykoprotein der δ -Granula CD63 und der intrathrombozytäre Gehalt von Adenin-Nukleotide durch eine Mepacrine-Färbung untersucht.

Wie bereits im Rahmen des *ex vivo* Aktivierungsstatus beschrieben, ist im basalen Zustand vor allem die stark erniedrigte Aufnahme von Mepacrine in den Thrombozyten der ET Patienten auffällig. Weiterhin ist hervorzuheben, dass die HU Therapie in unseren Ergebnissen zu keiner Veränderung in der basalen Adenin-Nukleotiden oder δ -Granula Verteilung führt, was auf eine intrinsische Störung bereits im Megakaryozyten hindeutet, wie bereits von Pareti et al. [141] postuliert. Eine weiterführende Untersuchung der ATP Freisetzung in der Aggregometrie bei ET Patienten mit *JAK2 V617F* und *CALR*-Mutation mit oder ohne HU Therapie wird im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von [REDACTED] zu diesem Thema durchgeführt.

Nach Aktivierung mit Convulxin, Thrombin und die Kombination von Convulxin und Thrombin zeigt sich die CD63 Oberflächenexpression aller ET Gruppen unabhängig von Mutation und Therapie statistisch auffällig vermindert im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen. Auch nach Aktivierung mit Ca^{2+} -Ionophore zeigten sich alle Gruppen der ET Patienten deutlich vermindert, sodass man sagen kann, dass die

verminderte CD63 Oberflächenexpression nicht durch eine veränderte Rezeptor-vermittelte intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung zurückzuführen ist, und entweder durch einen Ca^{2+} -abhängigen Signalweg bedingt ist oder intrinsisch Ca^{2+} unabhängig ist. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass nach Aktivierung durch mehrere starke Agonisten keine adäquate Exozytose der δ -Granula erreicht werden kann. Die Mepacrine Aufnahme in den Thrombozyten ist nach Aktivierung mit Convulxin tendenziell erhöht im Vergleich zu den Kontrollgruppen, besonders deutlich in den ET Gruppen ohne HU Therapie. Nach Aktivierung mit Thrombin zeigen sich die ET Gruppen ohne HU noch tendenziell erhöht, was für eine verminderte Abnahme der Adenin-Nukleotide spricht. Leoncini et al. [142] wiesen bei ET Patienten ohne Berücksichtigung der ursprünglichen Mutation oder Therapie erniedrigte ADP und ATP Werte in den δ -Granula und auch im Zytosol der Thrombozyten bei Betroffenen nach. Leoncini et al. [142] haben Anhalt zu glauben, dass die Phospholipid-Zusammensetzung der thrombozytären Plasmamembran durch die Grunderkrankung verändert ist und dadurch die Membranfluidität verändert wird. Zudem beschreiben sie bei ET Patienten mit vermindertem ADP und ATP einen erhöhten Abbau der Adenin-Nukleotide zu Hypoxanthin [142].

Eine weitere postulierte Erklärung des δ -„storage pool“ Defekt bei ET Patienten ist die Zirkulation der Thrombozyten im bereits aktivierten Zustand und dass ADP als Verstärkungsmechanismus bereits verbraucht wurde [6]. Tatsächlich ist die basale Aufnahme von Mepacrine durch Thrombozyten der ET Patienten vermindert. Anhand unserer Daten konnte man auch eine tendenzielle Korrelation sehen, dass je höher die Thrombozytenzahl ist, desto niedriger ist die Mepacrine Aufnahme. Dies könnte mit einer erhöhten *in vivo* Aktivierung, aber auch mit einem konstitutiven Defekt bei dysregulierter Thrombopoese in Einklang gebracht werden.

Studien zur weiteren Charakterisierung des δ -„storage pool“ Defekt bei ET Patienten und zur klinischen Relevanz in Form einer Blutungsneigung wären weiterhin zukünftig interessant.

5.2.4 Generell verminderte GPVI-vermittelte Thrombozyten-Aktivierung bei ET-Patienten

Im Rahmen dieser Arbeit untersuchten wir die Aktivierung der Thrombozyten mit einer mittleren (5 ng/ml) und maximalen (20 ng/ml) Konzentration des GPVI-selektiven Agonisten Convulxin. Besonders eindrücklich zeigte sich die verminderte

Convulxin-induzierte Thrombozyten-Aktivierung bei ET-Patienten bei Betrachtung der Exozytose der α -Granula anhand der CD62P Expression. Insbesondere nach Stimulierung durch eine erhöhte Convulxin Konzentration zeigten sich alle ET Gruppen unabhängig der Mutation und der Therapie deutlich vermindert im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen. Hingegen bei Aktivierung durch Thrombin waren beide Kontrollgruppen und alle ET Gruppen unabhängig der Mutation und der Therapie vergleichbar. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass bei den ET Patienten ein GPVI-Signaling-Defekt vorliegt.

Die Aktivierung des GPIIb/IIIa ist nach Aktivierung mit Convulxin bei den ET Patienten im Vergleich zu den Kontrollgruppen auch deutlich vermindert. Interessanterweise zeichnet sich ab, dass die Betroffenen mit *CALR* Mutation noch weniger Fibrinogen binden und PAC-1 binden als die Betroffene mit *JAK2* V617F Mutation. Auch nach der Aktivierung mit Thrombin war die GPIIb/IIIa Aktivierung in vergleichbarer Weise vermindert. Allerdings haben Moore et al [132] beschrieben, dass der PI3 Kinase/Rap1 Signalweg bei ET Patienten mit und ohne *JAK2* V617F Mutation intrinsisch gestört ist und eine Aktivierung des GPIIb/IIIa über ADP oder Thrombin nicht adäquat war. Patienten mit *CALR* Mutation wurden nicht explizit untersucht, allerdings zeichnet sich ab, dass der Signalweg in dieser Gruppe noch deutlicher gestört sein könnte. Anhand unserer Daten zeigte sich weiterhin eine statistisch auffällige Korrelation, dass je höher die Thrombozytenkonzentration, desto niedriger war die Fibrinogenbindung nach Aktivierung mit Convulxin 20 ng/ml.

Auch die CD63 Expression und die Mepacrine Ausschüttung sind nach Aktivierung mit Convulxin und Thrombin gestört. Die Aktivierung der Thrombozyten über die Bindung von Kollagen, in dieser Arbeit durch die Aktivierung mit Convulxin reproduziert, gelingt über die Bindung an den GPVI Rezeptor, der zur Aktivierung der gebundenen Thrombozyten führt und zur Ausschüttung von sekundären Agonisten wie z.B. ADP. Diese sekundären Agonsiten verstärken die Aktivierung und aggregieren weitere Thrombozyten [143]. Wie zuvor dargelegt, ist bei ET Patienten ein δ -„storage pool“ Defekt bereits beschrieben und auch anhand unserer Daten reproduzierbar. In dieser Konstellation kommt es zu keiner Verstärkung mittels ADP. Nylander et al. [144] berichten, dass ADP auch in der Aktivierung der Thrombozyten durch niedrige Konzentrationen von Thrombin eine Rolle spielt und zur weiteren Aktivierung der Thrombozyten führt, damit Thrombin über den PAR-4 Rezeptor seine volle Aktivierungskraft entfalten kann. Durch den δ -„storage pool“ Defekt könnte also

auch die Expression von CD63 auf der Thrombozytenoberfläche nach Aktivierung durch Thrombin erklärt werden.

5.2.5 Vergleichbare Thrombin-induzierte thrombozytäre α -Granula Exozytose von ET-Patienten mit Kontrollen unter ASS

Die P-Selektin Oberflächen-Expression als Ausdruck der α -Granula Exozytose war nach der Aktivierung der Thrombozyten mit den Agonisten Thrombin und Thrombin plus ADP zwischen den ET Patienten und beiden Kontrollgruppen vergleichbar, unabhängig der Mutation oder der Therapie. Es besteht demnach kein primärer Einfluss von Thromboxan A_2 auf die α -Granulasekretion nach Thrombin Aktivierung. Auch nach Aktivierung mit Ca^{2+} -Ionophor zeigten sich keine statistischen Auffälligkeiten zwischen den ET Patienten und den Kontrollen, was darauf hinweist, dass die Ca^{2+} -abhängige α -Granulasekretion bei ET-Patienten normal ist.

In ihrer Studie mit einem gemischten MPN Patientenkollektiv (PV, ET, PMF) kamen Jensen et al. [120] zu dem Ergebnis, dass bei Aktivierung durch ADP und über Agonisierung des Thrombin Rezeptors PAR-1 mit TRAP-6 („Thrombin receptor agonist peptide“) die P-Selektin Expression vermindert war. Arellano-Rodrigo et al. [145] untersuchten, wie in dieser Studie ausschließlich ET Patienten und beobachteten hingegen basal und nach Aktivierung mit Thrombin eine erhöhte Expression von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche. Die Erkenntnisse dieser Studie sprechen dafür, dass im basalen Zustand bereits eine α -Granula Exozytose stattgefunden hat, diese aber nicht erschöpft ist und nach thrombozytärer Aktivierung durch Thrombin adäquat erfolgen kann.

5.2.6 Verminderte Thrombin-induzierte thrombozytäre Lysosomen Exozytose von ET-Patienten im Vergleich mit Kontrollen unter ASS

Die Exozytose der Lysosomen wird anhand der Oberflächen-Expression von CD63 und LAMP-1 ermittelt, die sich beide auf der Membran der Lysosomen befinden und nach Aktivierung auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert werden. Allerdings ist CD63 kein selektiver Membranmarker der Lysosomen, sondern befindet sich auch an der Oberfläche der δ -Granula, sodass hiermit die Exozytose beider Granula in Betracht gezogen wird.

Die LAMP-1 Expression auf der Thrombozytenoberfläche ist wie CD63 und CD62P ein Membran-Aktivierungsmarker, der im Gegensatz zu CD63 selektiv in der lysosomalen Membran exprimiert wird. LAMP-1 wird nach Exozytose der Lysosomen in den Thrombozyten auf der Membran exprimiert, besonders nach Aktivierung mit dem starken Agonisten Thrombin [146]. Bei Aktivierung durch Thrombin 0,1 und 0,2 U/ml zeigen sich beide Kontrollgruppen jeweils vergleichbar. Somit hat Thromboxan A₂ keinen relevanten Einfluss auf die LAMP-1 Expression. Bei Aktivierung durch Thrombin 0,1 und 0,2 U/ml ist die LAMP-1 Expression der ET Patienten tendenziell vergleichbar mit den Kontrollen, außer bei den *JAK2* V617F-positive ET Patienten mit HU Therapie, die sich als einzige Gruppe statistisch auffällig erniedrigt zeigt. Nach Aktivierung mit Ca²⁺-Ionophore zeigten sich tendenziell alle ET Gruppen und Therapien vergleichbar, sodass man hieraus schließen kann, dass die Ca²⁺-abhängige lysosomale Granulasekretion bei ET-Patienten normal ist, hingegen besonders bei den Thrombozyten *JAK2* V617F-positive ET Gruppe mit HU ein anderer Thrombin-vermittelte Signal-Defekt vorliegen könnte.

Nach Aktivierung der Thrombozyten durch Thrombin ist die CD63 Expression der Kontrollen mit und ohne ASS vergleichbar. Bei Aktivierung durch Thrombin 0,1 und 0,2 U/ml zeigen sich alle ET Gruppen unabhängig der Mutation und der Therapie tendenziell vermindert im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen.

Die Studie von Jensen et al. [120], wo 50 Patienten mit MPNs ohne Therapie untersucht wurden, worunter 15 Patienten mit ET waren, zeigte, dass nach Aktivierung mit TRAP-6 die CD63 Expression auf der Thrombozytenoberfläche der Probanden auch signifikant vermindert war im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Auch in dieser Studie war die CD63 Expression nach der Aktivierung durch Thrombin unabhängig der Mutation und der Therapie vermindert. Im Regelfall würde man erwarten, dass die Ergebnisse der LAMP-1 und CD63 Oberflächenexpression die gleichen Tendenzen zeigen. In unserer Untersuchung ist aber die verminderte CD63 Expression deutlicher als die verminderte LAMP-1 Expression. Hierbei ist damit zu rechnen, dass es sich um eine Überlagerung durch den δ -„storage pool“ Defekt handelt, da die δ -Granula in größerer Zahl in den Thrombozyten vorzufinden sind als die Lysosomen.

Ob LAMP-1 eine funktionale Rolle für Thrombozyten nach der Expression auf der Thrombozytenoberfläche übernimmt ist unklar. Febbraio und Siverstein [146] postulieren, dass das stark glykolisierte Molekül zur Bildung der prothrombotischen

Oberfläche der Thrombozyten beitragen könnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern keine Hinweise, dass bei ET Patienten die Expression von LAMP-1 mit dem prokoagulatorischen Status einhergeht. Der prokoagulatorische Zustand bei der ET wird im Rahmen einer weiteren Dissertation zu diesem Thema in der Arbeitsgruppe von [REDACTED] untersucht.

5.2.7 Convulxin plus Thrombin-induziertes Aktivierungspotential der Thrombozyten bei ET-Patienten

Die Kombination der beiden starken Agonisten Convulxin und Thrombin als Ausdruck einer hämostaseologischen Ausnahmesituation führt zu einem besonderen Phänotyp der Thrombozyten, den „COAT“ Thrombozyten [91]. Diese zeichnen sich aus durch eine erhöhte Präsentation an prokoagulatorischem negativ-geladenem Phosphatidylserin und durch eine hohe Bindung von Gerinnungsfaktoren auf der Oberfläche der Thrombozyten aus [92]. In dieser Arbeit wurde die Ausprägung der verschiedenen thrombozytären Funktionsmarker bei ET Patienten nach kombinierter Aktivierung mit Convulxin plus Thrombin untersucht. Durch die kombinierte Aktivierung mit Convulxin und Thrombin kam es bei manchen Markern der Thrombozytenaktivierung zur Normalisierung im Vergleich zu einer oder beiden Kontrollgruppen. Die thrombozytäre vWF Bindung, die bei Aktivierung durch einzelne Agonisten in den ET-Gruppen ohne HU immer statistisch auffällig vermindert war, zeigte sich nach COAT Aktivierung in allen ET Gruppen mit den Kontrollen ohne ASS vergleichbar. Auch war durch die COAT Stimulation die Expression von P-Selektin der ET Patienten unabhängig vom Mutationsstatus und HU-Therapie mit den Kontrollen plus/minus ASS vergleichbar vermindert. Durch diesen starken Aktivierungsreiz erreichte ebenfalls die Abnahme der thrombozytären Mepacrine Fluoreszenz von den ET-Patienten das Niveau der Kontrollgruppen, was darauf hindeutet, dass die gestörte GPVI-vermittelte Thrombozytenaktivierung bei den untersuchten ET-Patienten durch eine Stimulation von Thrombin-Rezeptor-abhängigen Signalwegen kompensiert werden kann.

Sowohl die vWF-Bindung als auch die CD62P Expression sind wichtig bei der Bildung von COAT Thrombozyten. Auf den COAT Thrombozyten werden vermehrt Proteine exprimiert, die in α -Granula zu finden sind, wie z. B. der vWF [91]. Auch die stärkere Expression von thrombozytärem CD62P der ET Gruppen bei Induktion durch Convulxin plus Thrombin, im Vergleich zur Induktion nur durch einen einzelnen

Agonisten, spricht für eine vermehrte Freisetzung von Proteinen aus den α -Granula [91].

Andere Aktivierungsparameter wiesen trotz starker Doppelstimulation mit Convulxin und Thrombin keine Normalisierung auf. Die Expression von aktiviertem GPIIb/IIIa war nach doppelter Stimulation mit Convulxin und Thrombin weiterhin vermindert: Die Fibrinogenbindung der beiden ET Gruppen mit HU war noch statistisch auffällig vermindert im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS und die PAC-1 Bindung war für alle ET Gruppen im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS statistisch nennenswert vermindert. Auch die CD63 Expression war trotz Convulxin plus Thrombin Stimulierung im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen statistisch auffällig vermindert. Außerdem zeigten die *JAK2* V617F positiven Patienten mit HU Therapie eine verminderte LAMP-1 Expression im Vergleich zu beiden Kontrollen. Alle genannten Defekte wurden nicht durch eine Bildung von COAT Thrombozyten beeinflusst [91]. Die Fibrinogenbindung hingegen ist eine wichtige Veränderung der COAT Thrombozyten. Dabei ist aber zu beachten, dass sich diese Veränderungen auf die erhöhte Bindungsstärke des Fibrinogens an GPIIb/IIIa bezieht [91], die anhand der durchgeführten Experimente nicht beurteilt werden konnte.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass bei ET-Patienten trotz bestimmter thrombozytärer Aktivierungsdefekte die Bildung von COAT Thrombozyten möglich ist.

5.2.8 Tendenzielle Hyperpolarisation der thrombozytären inneren Mitochondrienmembran bei ET-Patienten

Das MMP spiegelt den elektrochemischen Gradienten und damit die gespeicherte Energie entlang der inneren Mitochondrienmembran wider, die durch verschiedenen Stoffwechselreaktionen entsteht. Diese Energie wird dann zur Generierung von ATP durch die ATP Synthase genutzt [147]. Erstmals wurde das mitochondriale Membranpotenzial (MMP) von Thrombozyten bei ET Patienten untersucht. In dieser Untersuchung zeigten sich sehr heterogene Ergebnisse. Es zeigte sich, dass das MMP der Kontrollgruppe ohne ASS im Vergleich zur Kontrollgruppe mit ASS statistisch auffällig vermindert war. Dies ist ungewöhnlich, da für neuronale Zellen beschrieben worden ist, dass eher der Einsatz von ASS zu einer Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran führt [148]. Bei den ET Patienten mit der *JAK2*

V617F Mutation zeigten sich mit und ohne HU Therapie teils sehr hohe, teils niedrige Werte des MMPs. Im Mittel kann man sagen, dass sich bei den ET Patienten mit der *JAK2* V617F Mutation mit HU Therapie im Vergleich zu den Kontrollen ohne ASS eine Neigung zur Hyperpolarisation abzeichnete. Die ET Patienten mit *CALR* Mutation unter HU Therapie zeigten eine statistisch auffällige und deutliche Erhöhung des MMPs im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen.

Das Aufrechterhalten des MMPs ist notwendig zur Gewährleistung der Energieversorgung der Zelle [147]. Wird der elektrochemische Gradient durchbrochen, gibt es keine ATP Produktion mehr und die Zelle geht in die Apoptose. Die Apoptose ist ein Mechanismus, der unter anderem mit der Fragmentation des Nucleus in eukaryontischen Zellen einhergeht [149]. Auch bei Thrombozyten, die keinen Zellkern besitzen, sind nach Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran ähnliche Signalwege zu beobachten, weshalb man auch bei Thrombozyten von Apoptose sprechen kann [150]. Nicht nur die Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran ist möglich sondern auch die Hyperpolarisation [107,147]. Die Hyperpolarisation der inneren Mitochondrienmembran bei aktivierten Thrombozyten konnte in einer Studie von Matarrese et al. [107] nachgewiesen werden. Sie inkubierten Thrombozyten mit einem Komplementsystemaktivator (opsonisiertes Zymosan A), die anschließend ein erhöhtes MMP zeigten. Es konnten aktivierungstypische Veränderungen, wie die Konformationsänderung der Thrombozyten beobachtet werden und nach 24 h kam es außerdem zur Aggregation der Thrombozyten. Dies zeigt, dass Thrombozyten auf zellulären Stress durch einen inflammatorischen Zustand mit der Erhöhung des MMPs reagieren. Die Hyperpolarisierung der inneren Mitochondrienmembran in den Thrombozyten im Rahmen der ET mit anschließender Aktivierung oder Präaktivierung könnte analog zur Aktivierung durch das Komplementsystem geschehen. Falanga et al.[8] postulieren, dass eine inflammatorische Antwort des Organismus den prothrombotischen Phänotyp der ET Patienten mitbeeinflusst. Die Hyperpolarisation der inneren Mitochondrienmembran geht auch mit einer erhöhten Produktion von „reactive oxygen species“ (ROS) einher [151]. Diese erhöhte Produktion von ROS führt zur erhöhten Thrombozytenaktivierung und Aggregation, wie durch Yamagishi et al. [110] bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 nachgewiesen werden konnte. Die Hyperglykämie führt zur erhöhten Sauerstoffradikalbildung, darüber wird der Kollagen-induzierte Signalweg der Thrombozyten präaktiviert und es kommt zu einer

stärkeren Thrombozytenaggregation mit Ausbildung von Mikrothromben [110]. Siewiera et al. [152] konnten in einem Mausmodell nachweisen, dass bei Tieren mit einem induzierten Diabetes mellitus das MMP der Thrombozyten hyperpolarisiert ist. Weiterhin zeigten die Thrombozyten aktivierungstypische Marker auf ihrer Oberfläche, wie erhöhtes CD62P und GPIIb/IIIa [152]. Man kann aus diesen Erkenntnissen schlußfolgern, dass chronische Erkrankungen, wie sie die ET ist, den Energiehaushalt von Thrombozyten derart verändern, dass es zu einem bestimmten Maße zur Aktivierung bzw. zur erhöhten Reaktivität der Thrombozyten kommt.

In unserer Untersuchung zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen dem MMP und der Thrombozytenkonzentration und dem MMP und dem MPV. Dies spricht dafür, dass die Veränderungen des MMPs intrinsisch sind und nicht von der (vermehrten) Thrombozytenproduktion bei der ET abhängen.

Die Mitochondrien der Thrombozyten regulieren wichtige Signalwege, die die Funktionen der Thrombozyten beeinflussen. Weitere Untersuchungen zur Entstehung der Hyperpolarisation in Thrombozyten von ET Patienten wären in der Zukunft interessant, um eventuell einen kausalen Zusammenhang des Aktivierungszustands der Thrombozyten bei der ET zu identifizieren und einen möglichen individuellen Marker zur Einschätzung des prothrombotischen Risikos zu beleuchten.

5.2.9 Erhöhte PDI-Präsentation auf der Thrombozytenoberfläche bei ET-Patienten *ex vivo*

Die Konformationsänderung der Integrine von einer geschlossenen zu einer offenen Konformation (Integrinaktivierung) ist für die Thrombozytenfunktion essentiell. Im Falle des GPIIb/IIIa ist es die Voraussetzung, damit es lösliches Fibrinogen binden und darüber Thrombozyten vernetzen kann. Durch die Integrin-Veränderung von der geschlossenen zur offenen Konformation ist die Aggregation der Thrombozyten zu einem primären Thrombus reguliert. Ein wichtiger Reiz für diese Konformationsänderung entsteht durch das „inside-out signaling“ über Aktivierung der Thrombozyten durch verschiedene Agonisten/Rezeptoren [56,57]. Die genauen regulativen Mechanismen der Konformationsänderung von GPIIb/IIIa sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Allerdings konnte in Studien [153,154] ein Einfluss von Thiol Isomerasen auf die irreversible Bindung von Fibrinogen an den GPIIb/IIIa Rezeptor

und somit auf die Thrombusformation gezeigt werden. Die Protein Disulfidisomerase (PDI), die klassischerweise als ER Chaperone bekannt ist, zeigt sich vermehrt auf aktivierten Thrombozyten als auf Thrombozyten im inaktiven Zustand [95,153,155,156] und scheint den Aktivitätszustand von GPIIb/IIIa zu modulieren [155,157]. Es wird davon ausgegangen, dass die PDI eine Konformationsänderung von GPIIb/IIIa katalysiert und zur irreversiblen Bindung von Fibrinogen führt [104,153]. Dies bestätigen die Arbeiten der Gruppe von Lahav et al. [102,157], die nachweisen konnte, dass der enzymatische Austausch von Disulfidverbindungen durch Thiol Isomerasen auf der Thrombozytenoberfläche die Integrin-vermittelte Adhäsion ermöglicht [102]. PDI als eine der bekanntesten Thiol Isomerasen auf der Oberfläche der Thrombozyten, spielt eine besondere Rolle [95]. Ihre Hemmung führte zu einer verminderten und reversiblen Bindung von Fibrinogen an GPIIb/IIIa [104,153,157,158].

Diese Ergebnisse nahmen wir zum Anlass, um erstmalig die PDI Expression auf der Oberfläche der Thrombozyten bei Patienten mit ET zu untersuchen. Wir stellten fest, dass die basale PDI-Expression auf der Thrombozytenoberfläche bei ET Patienten unabhängig von der Mutation und der Therapie erhöht ist im Vergleich zu den Kontrollen mit ASS. Dies weist darauf hin, dass die Thrombozyten von ET Patienten im aktivierten Zustand zirkulieren. Dies würde die Hypothese der basalen Aktivierung der Thrombozyten unterstützen [6]. Auch zellulärer Stress kann zur erhöhten Präsentation von PDI auf der Thrombozytenoberfläche führen [159].

Außerdem postulieren Kehrel et al. [156], dass frische, junge Thrombozyten ein erhöhtes Potenzial haben, Thiol Isomerasen aus dem ER an die Thrombozytenoberfläche zu sezernieren. Dadurch könne ein prothrombotischer Zustand generiert werden. Bei der ET kommt es durch die unkontrollierte Aktivierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen zum erhöhten Thrombozytenumsatz mit einem erhöhten Anteil an jungen Thrombozyten. Anhand der erhöhten PDI Expression auf der Oberfläche und dem erhöhten Anteil an jungen Thrombozyten könnte man auf ein höheres prothrombotisches Potenzial schließen [133]. Die Untersuchung der jungen Thrombozyten bei ET Patienten erfolgt im Rahmen einer weiteren Dissertation zu dieser Studie in der Arbeitsgruppe von [REDACTED].

Unklar ist zu diesem Zeitpunkt ob die erhöhte Expression von PDI als Folge einer Präaktivierung der Thrombozyten zu sehen ist, z.B. durch zellulären Stress, oder ob eine erhöhte PDI Produktion und Präsentation durch z.B. junge Thrombozyten zu

einer erhöhten Integrinaktivierung führt und damit zu einer erhöhten Neigung Fibrinogen zu binden. Im Rahmen der Untersuchung der Thrombozytenfunktion konnten wir jedoch zeigen, dass die Bindung von Fibrinogen an die Thrombozyten der ET Patienten tendenziell vermindert ist, weshalb zu diesem Zeitpunkt davon auszugehen ist, dass die erhöhte Präsentation von PDI auf der Thrombozytenoberfläche eher als Folge einer Aktivierung der Thrombozyten bei ET Patienten zu sehen ist. Auch in der Korrelationsuntersuchung zwischen dem MPV (junge Thrombozyten zeigen sich tendenziell eher vergrößert) und der PDI Expression ist kein wesentlicher Zusammenhang zu sehen. Weiterhin scheinen die HU Therapie und die zugrunde liegende Mutation keinen eindeutigen Einfluss auf die Präsentation von PDI zu haben. Allerdings zeichnete sich eine tendenziell positive Korrelation zwischen der Thrombozytenkonzentration und der PDI Präsentation ab. PDI beeinflusst sowohl die Thrombozytenaggregation in der primären Hämostase als auch die Thrombozyten-abhängige Thrombin-Generierung während der sekundären Hämostase. Einige Substanzen zur Hemmung sowohl der Thrombusformation als auch der Fibrinbildung wurden in dem Bezug schon identifiziert. Das Flavonoid Quercetin-3-rutinosid und weitere spezifische PDI Hemmer zeigten sich in ersten Studien gut verträglich [161]. Insbesondere mit der Gabe von Quercetin-3-rutinosid konnte eine Reduktion von kardiovaskulären Ereignissen in einem Kollektiv von älteren Männern in den Niederlanden gezeigt werden [161]. Weitere größer angelegte Studien sind allerdings zur genaueren Beurteilung des Wirkungs-/Nebenwirkungsspektrums notwendig.

Der Auslöser und Mechanismus der erhöhten PDI Expression auf der Thrombozytenoberfläche bei ET Patienten muss in zukünftigen Studien noch eingehender untersucht werden. Die Quantifizierung der exprimierten PDIs auf der Oberfläche als individueller Marker [156] könnte ein interessanter Ansatz sein, um das thrombotische Risiko der ET Patienten zu beurteilen und die Therapie zielführend in der Verhinderung von thrombotischen oder hämorrhagischen Ereignissen zu gestalten.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden für die primäre Hämostase relevante Thrombozytenfunktionen bei 19 erwachsenen Patienten mit essentieller Thrombozythämie (ET), 14 mit *JAK2* V617F-Mutation und fünf mit *CALR*-Mutationen nach Studieneinschluss im Vergleich zu 10 gesunden Probanden durchflusszytometrisch untersucht. Die unterschiedlichen Thrombozyten-Funktionsparameter wurden *ex vivo*, als Hinweis auf den *in vivo* Thrombozyten-Phänotyp, und nach Stimulierung mit verschiedenen Agonisten *in vitro* verglichen. Die Thrombozyten-Reaktivität wurde zwischen 4 Patientengruppen evaluiert: *JAK2* V617F-Mutation ohne zytoreduktive Hydroxyurea (HU)-Therapie; *JAK2* V617F-Mutation mit HU-Therapie; *CALR*-Mutation ohne HU-Therapie; *CALR*-Mutation mit HU-Therapie.

Ex vivo zeigten die Thrombozyten der ET Patienten eine erhöhte vWF-Bindung im Vergleich zu Probanden ohne ASS unabhängig vom Mutationsstatus und HU Therapie. Zudem ist eindrücklich, dass sich eine erhöhte Oberflächen-Expression des α -Granula Exozytose Markers P-Selektin bei den ET-Patienten ohne HU Therapie im Vergleich zu Probanden mit ASS zeigte. Auch zeigte sich eine erhöhte Oberflächen-Expression des lysosomalen Exozytosemarkers LAMP-1 besonders bei ET-Patienten mit *JAK2* V617F Mutation ohne HU Therapie und bei Patienten mit *CALR* Mutation mit HU Therapie im Vergleich zu Probanden mit ASS als Zeichen einer bereits erfolgten Lysosomen-Ausschüttung. Im Gegensatz dazu zeigten die Thrombozyten aller Patientengruppen unabhängig vom Mutationsstatus und HU-Therapie eine statistisch auffällig verminderte Mepacrine-Aufnahme im Vergleich zu Probanden ohne ASS vereinbar mit einem δ -„storage pool“ Defekt.

Es zeichnete sich weiterhin in allen ET-Gruppen ein hyperpolarisiertes Membranpotential der inneren Mitochondrienmembran der Thrombozyten *ex vivo* ab, das im Rahmen von anderen chronischen Erkrankungen mit einer erhöhten Aktivierung/Reaktivität der Thrombozyten einhergeht. Dieses Phänomen war bei den *CALR* positiven Patienten deutlicher als bei den *JAK2* V617F positiven Patienten. Außerdem zeigte sich die PDI als Enzym, das Disulfidbrücken von Proteinen wie dem Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa isomerisiert, tendenziell erhöht auf der Thrombozytenoberfläche bei allen ET Patienten und kommt damit als möglicher prothrombotischer Faktor in Betracht. Man beobachtet zudem einen generellen

Aktivierungsdefekt mit dem GPVI-selektiven Agonisten Convulxin aber nicht mit Thrombin, was auf einen GPVI-Signaling Defekt hinweist, der besonders bei der verminderten P-Selektin Expression bei den ET Patienten mit *JAK2 V617F* Mutation ohne HU Therapie nach Aktivierung mit Convulxin deutlich war, sich aber nach Aktivierung mit Thrombin vergleichbar mit den Kontrollen zeigte. Weiterhin ist unabhängig vom Agonisten ein Aktivierungsdefekt von GPIIb/IIIa im Vergleich zu den Kontrollen (mit/ohne) ASS zu beobachten. Auch auffällig ist in dem Rahmen die negative Korrelation der Fibrinogenbindung zur Thrombozytenkonzentration, die möglicherweise einen intrinsischen Defekt der Thrombozyten-Produktion widerspiegelt. Die Thrombin induzierte P-Selektin Expression auf Thrombozyten ist bei allen ET Patienten tendenziell vergleichbar mit den Kontrollen mit und ohne ASS. Dies trifft auch auf die durch Ca^{2+} -Ionophor aktivierten und COAT Thrombozyten zu. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Thrombin vermittelte Exozytose besonders der thrombozytären α -Granula bei Patienten mit ET unabhängig vom Mutationsstatus und zytoreduktiver Therapie mit HU normal verläuft und sogar GPVI-abhängige Defekte kompensieren kann.

Die spannende Frage, ob aus den untersuchten Parametern einer als spezifischer individueller Marker zur Evaluierung des individuellen prothrombotischen Risikos genutzt werden kann, muss in weiterführenden prospektiven Studien untersucht werden.

Die weitere Erforschung der Muster der primären Thrombozytenfunktion bei ET verbessert Stück für Stück das Verständnis der Erkrankung. Erst dadurch wird die Identifizierung von individuellen Risikofaktoren und der optimale Einsatz der Therapie zur Verhinderung von hämostaseologischen Komplikationen möglich.

7 Literaturverzeichnis

1. Grinfeld J, Nangalia J, Green AR. Molecular determinants of pathogenesis and clinical phenotype in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2017;102:7–17.
2. Rumi E, Pietra D, Ferretti V, Klampfl T, Harutyunyan AS, Milosevic JD, Them NCC, Berg T, Elena C, Casetti IC, Milanese C, Sant'Antonio E, Bellini M, Fugazza E, Renna MC, Boveri E, Astori C, Pascutto C, Kralovics R, Cazzola M. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*. 2014;123:1544 LP – 1551.
3. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017;129:667–79.
4. Barbui T, Barosi G, Birgegard G, Cervantes F, Finazzi G, Griesshammer M, Harrison C, Hasselbalch HC, Hehlmann R, Hoffman R, Kiladjan J-J, Kröger N, Mesa R, McMullin MF, Pardanani A, Passamonti F, Vannucchi AM, Reiter A, Silver RT, Verstovsek S, Tefferi A. Philadelphia-Negative Classical Myeloproliferative Neoplasms: Critical Concepts and Management Recommendations From European LeukemiaNet. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29:761–70.
5. Elliott MA, Tefferi A. Thrombosis and haemorrhage in polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *British Journal of Haematology*. 2005;128:275–90.
6. Michiels JJ, Berneman Z, Schroyens W, Finazzi G, Budde U, Van Vliet HHDM. The paradox of platelet activation and impaired function: Platelet-von Willebrand factor interactions, and the etiology of thrombotic and hemorrhagic manifestations in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 2006;32:589–604.
7. Harrison CN. Platelets and Thrombosis in Myeloproliferative Diseases. *ASH Education Program Book* . 2005;2005:409–15.
8. Falanga A, Marchetti M. Thrombotic disease in the myeloproliferative neoplasms. *ASH Education Program Book*. 2012;2012:571–81.
9. Barbui T, Finazzi G, Falanga A. Myeloproliferative neoplasms and thrombosis. *Blood*. 2013;122:2176–84.
10. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Borowitz MJ, Beau MM Le, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW, Westergaard T, Andersen PK, Pedersen JB, Olsen JH, Frisch M, Sorensen HT, Wohlfahrt J, Melbye M. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 1997;127:2391–406.
11. Kubuki Y, Shide K, Kameda T, Yamaji T, Sekine M, Kamiunten A, Akizuki K, Shimoda H, Tahira Y, Nakamura K, Abe H, Miike T, Iwakiri H, Tahara Y, Sueta M, Hashimoto K, Yamamoto S, Hasuike S, Hidaka T, Nagata K, Kitanaka A, Shimoda K. Differences in Hematological and Clinical Features Between Essential Thrombocythemia Cases With JAK2- or CALR-Mutations. *Ann Lab Med*. 2017;37:159–61.
12. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American Journal of Hematology*. 2018;92:94–108.
13. Al Assaf C, Van Obbergh F, Billiet J, Lierman E, Devos T, Graux C, Hervent A-S, Emmerechts J, Tousseyn T, De Paepe P, Papadopoulos P, Michaux L,

- Vandenberghe P. Analysis of phenotype and outcome in essential thrombocythemia with CALR or JAK2 mutations. *Haematologica*. 2015;100:893 LP – 897.
14. Al Assaf C, Van Obbergh F, Billiet J, Lierman E, Devos T, Graux C, Hervent AS, Emmerechts J, Tousseyn T, De Paepe P, Papadopoulos P, Michaux L, Vandenberghe P. Analysis of phenotype and outcome in essential thrombocythemia with CALR or JAK2 mutations. *Haematologica*. 2015;100:893–7.
 15. Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P, Pacilli A, Pancrazzi A, Fanelli T, Bosi A, Vannucchi A. Impact of Calreticulin Mutations on Clinical and Hematological Phenotype and Outcome in Essential Thrombocythemia. 2014;123:1552–6.
 16. Dusa A, Mouton C, Pecquet C, Herman M, Constantinescu SN. JAK2 V617F constitutive activation requires JH2 residue F595: A pseudokinase domain target for specific inhibitors. *PLoS ONE*. 2010;5:1–12.
 17. Babon JJ, Lucet IS, Murphy JM, Nicola NA, Varghese LN. The molecular regulation of Janus kinase (JAK) activation. *Biochemical Journal*. 2014;462:1 LP – 13.
 18. Bennett M, Stroncek DF. Recent advances in the bcr-abl negative chronic myeloproliferative diseases. *Journal of translational medicine*. 2006;4:41.
 19. Varghese LN, Defour JP, Pecquet C, Constantinescu SN. The thrombopoietin receptor: Structural basis of traffic and activation by ligand, mutations, agonists, and mutated calreticulin. *Frontiers in Endocrinology*. 2017;8:1–13.
 20. Chachoua I, Pecquet C, El-Khoury M, Nivarthi H, Albu RI, Marty C, Gryshkova V, Defour JP, Vertenoil G, Ngo A, Koay A, Raslova H, Courtoy PJ, Choong ML, Plo I, Vainchenker W, Kralovics R, Constantinescu SN. Thrombopoietin receptor activation by MPN associated calreticulin mutants. *Blood*. 2015;127:1325–36.
 21. Vannucchi AM, Harrison CN. Emerging treatments for classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017;129:693–703.
 22. Skeith L, Carrier M, Robinson SE, Alimam S, Rodger MA. Risk of venous thromboembolism in pregnant women with essential thrombocythemia: A systematic review and meta-analysis. *Blood*. 2017;129:934–9.
 23. Griesshammer M, Lengfelder E, Döhner K, Kvasnicka HM, Thiele J, Heimpel H. Essenzielle Thrombozythämie: Klinische Bedeutung, Diagnostik, Therapie. *Deutsches Ärzteblatt*. 2007;104:34–5.
 24. Michiels JJ, Berneman ZN, Schroyens W, Van Vliet HHDM. Pathophysiology and treatment of platelet-mediated microvascular disturbances, major thrombosis and bleeding complications in essential thrombocythaemia and polycythaemia vera. *Platelets*. 2004;15:67–84.
 25. Genderen PJJ, S Lucas I, van Strik R, D Vuzevski V, J Prins F, H van Vliet H, Michiels J. Erythromelalgia in Essential Thrombocythemia Is Characterized by Platelet Activation and Endothelial Cell Damage but not by Thrombin Generation. Vol. 76, *Thrombosis and haemostasis*. 1996. 333–338 p.
 26. Finazzi G, Carobbio A, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Ruggeri M, Rodeghiero F, Randi ML, Bertozzi I, Vannucchi AM, Antonioli E, Gisslinger H, Buxhofer-Ausch V, Gangat N, Rambaldi A, Tefferi A, Barbui T. Incidence and risk factors for bleeding in 1104 patients with essential thrombocythemia or prefibrotic myelofibrosis diagnosed according to the 2008 WHO criteria. *Leukemia*. 2012;26:716–9.
 27. Landolfi R, Cipriani MC, Novarese L. Thrombosis and bleeding in polycythemia vera and essential thrombocythemia: Pathogenetic mechanisms and

- prevention. *Best Practice and Research: Clinical Haematology*. 2006;19:617–33.
28. Rumi E, Cazzola M. How I treat How I treat essential thrombocythemia. *Blood*. 2016;128:2403–14.
 29. Birgegård G. The Use of Anagrelide in Myeloproliferative Neoplasms, with Focus on Essential Thrombocythemia. *Current Hematologic Malignancy Reports*. 2016;11:348–55.
 30. Alvarez-Larrán A, Pereira A, Guglielmelli P, Hernández-Boluda JC, Arellano-Rodrigo E, Ferrer-Marín F, Samah A, Griesshammer M, Kerguelen A, Andreasson B, Burgaleta C, Schwarz J, García-Gutiérrez V, Ayala R, Barba P, Gómez-Casares MT, Paoli C, Drexler B, Zweegman S, McMullin MF, Samuelsson J, Harrison C, Cervantes F, Vannucchi AM, Besses C. Antiplatelet therapy versus observation in low-risk essential thrombocythemia with a CALR mutation. *Haematologica*. 2016;101:926–31.
 31. Alvarez-Larrán A, Cervantes F, Pereira A, Arellano-Rodrigo E, Pérez-Andreu V, Hernández-Boluda J-C, Ayats R, Salvador C, Muntañola A, Bellosillo B, Vicente V, Hernández-Nieto L, Burgaleta C, Xicoy B, Besses C. Observation versus antiplatelet therapy as primary prophylaxis for thrombosis in low-risk essential thrombocythemia. *Blood*. 2010;116:1205 LP – 1210.
 32. Alvarez-Larrán A, Pereira A, Arellano-Rodrigo E, Hernández-Boluda JC, Cervantes F, Besses C. Cytoreduction plus low-dose aspirin versus cytoreduction alone as primary prophylaxis of thrombosis in patients with high-risk essential thrombocythaemia: An observational study. *British Journal of Haematology*. 2013;161:865–71.
 33. Pascale S, Petrucci G, Dragani A, Habib A, Zaccardi F, Pagliaccia F, Pocaterra D, Ragazzoni E, Rolandi G, Rocca B, Patrono C. Aspirin-insensitive thromboxane biosynthesis in essential thrombocythemia is explained by accelerated renewal of the drug target. *Blood*. 2012;119:3595–603.
 34. Dillinger J-G, Sollier CB dit, Sideris G, Ronez E, Henry P, Drouet L. Twice daily aspirin to improve biological aspirin efficacy in patients with essential thrombocythemia. *Thrombosis Research*. 2012;129:91–4.
 35. Gisslinger H, Gotic M, Holowiecki J, Penka M, Thiele J, Kvasnicka H-M, Kralovics R, Petrides PE. Anagrelide compared with hydroxyurea in WHO-classified essential thrombocythemia: the ANAHYDRET Study, a randomized controlled trial. *Blood*. 2013;121:1720 LP – 1728.
 36. Alimam S, Wilkins BS, Harrison CN. How we diagnose and treat essential thrombocythaemia. *British Journal of Haematology*. 2015;171:306–21.
 37. Cortelazzo S, Finazzi G, Ruggeri M, Vestri O, Galli M, Rodeghiero F, Barbui T. Hydroxyurea for Patients with Essential Thrombocythemia and a High Risk of Thrombosis. *New England Journal of Medicine*. 1995;332:1132–7.
 38. Harrison CN, Campbell PJ, Buck G, Wheatley K, East CL, Bareford D, Wilkins BS, van der Walt JD, Reilly JT, Grigg AP, Revell P, Woodcock BE, Green AR. Hydroxyurea Compared with Anagrelide in High-Risk Essential Thrombocythemia. *New England Journal of Medicine*. 2005;353:33–45.
 39. Gisslinger H, Gotic M, Holowiecki J, Penka M, Thiele J, Kvasnicka H-M, Kralovics R, Petrides PE. Anagrelide compared with hydroxyurea in WHO-classified essential thrombocythemia: The ANAHYDRET Study, a randomized controlled trial. *Blood*. 2013;121:1720–8.
 40. W Yarbro J. Mechanism of action of hydroxyurea. Vol. 19, *Seminars in oncology*. 1992. 1–10 p.
 41. Randi ML, Ruzzon E, Tezza F, Luzzatto G, Fabris F. Toxicity and side effects

- of hydroxyurea used for primary thrombocythemia. *Platelets*. 2005;16:181–4.
42. Tefferi A, Silverstein MN, Hogland HC. Primary thrombocythemia. *Seminars in oncology*. 1995;22:334–40.
 43. Petrides PE. Primäre Thrombozythämie: Diagnose und therapie. *Medizinische Klinik*. 2006;101:624–34.
 44. Cacciola RR, Cipolla A, Di Francesco E, Giustolisi R, Cacciola E. Treatment of symptomatic patients with essential thrombocythemia: Effectiveness of anagrelide. *American Journal of Hematology*. 2005;80:81–3.
 45. Wang G, Franklin R, Hong Y, Erusalimsky JD. Comparison of the biological activities of anagrelide and its major metabolites in haematopoietic cell cultures. *British Journal of Pharmacology*. 2005;146:324–32.
 46. Verstovsek S, Passamonti F, Rambaldi A, Barosi G, Rumi E, Gattoni E, Pieri L, Zhen H, Granier M, Assad A, Cazzola M, Kantarjian HM, Barbui T, Vannucchi AM. Ruxolitinib for essential thrombocythemia refractory to or intolerant of hydroxyurea: long-term phase 2 study results. *Blood*. 2017;130:1768–71.
 47. Finazzi G. Ruxolitinib in ET: not all MPN are equal. *Blood*. 2017;130:1873–4.
 48. Harrison CN, Mead AJ, Panchal A, Fox S, Yap C, Gbandi E, Houlton A, Alimam S, Ewing J, Wood M, Chen F, Coppell J, Panoskaltis N, Knapper S, Ali S, Hamblin A, Scherber R, Dueck AC, Cross NCP, Mesa R, McMullin MF. Ruxolitinib vs best available therapy for et intolerant or resistant to hydroxycarbamide. *Blood*. 2017;130:1889–97.
 49. Barbui T, Finazzi G, Carobbio A, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Ruggeri M, Rodeghiero F, Randi ML, Bertozzi I, Gisslinger H, Buxhofer-Ausch V, De Stefano V, Betti S, Rambaldi A, Vannucchi AM, Tefferi A. Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization-essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis). *Blood*. 2012;120:5128–33.
 50. Barbui T, Rumi E, Carobbio A, Gisslinger H, Finazzi G, Bertozzi I, Thiele J, Falcone C, Rodeghiero F, Tefferi A, De Stefano V, Rambaldi A, Passamonti F, Ruggeri M, Betti S, Vannucchi AM, Buxhofer-Ausch V, Randi ML. Practice-relevant revision of IPSET-thrombosis based on 1019 patients with WHO-defined essential thrombocythemia. *Blood Cancer Journal*. 2015;5:e369–e369.
 51. Alvarez-Iarrán A, Cervantes F, Pereira A, Arellano-rodrigo E, Ayats R, Salvador C, Muntañola A, Bellosillo B, Vicente V, Hernández-nieto L, Burgaleta C, Xicoy B, Alvarez-larra A, Pe V. Observation versus antiplatelet therapy as primary prophylaxis for thrombosis in low-risk essential thrombocythemia CME article Observation versus antiplatelet therapy as primary prophylaxis for thrombosis in low-risk essential thrombocythemia. *Blood*. 2013;116:1205–10.
 52. Mital A, Prejzner W, Bieniaszewska M, Hellmann A. Prevalence of acquired von Willebrand syndrome during essential thrombocythemia: A retrospective analysis of 170 consecutive patients. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnetrznej*. 2015;125:914–20.
 53. Budde U, Van Genderen PJJ. Acquired von Willebrand disease in patients with high platelet counts. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 1997;23:425–31.
 54. Budde U, Scharf RE, Franke P, Hartmann-Budde K, Dent J, Ruggeri ZM. Elevated platelet count as a cause of abnormal von Willebrand factor multimer distribution in plasma. *Blood*. 1993;82:1749–57.
 55. Tiede A, Rand JH, Budde U, Ganser A, Federici AB. How I treat the acquired von Willebrand syndrome. *Blood*. 2011;117:6777 LP – 6785.
 56. Jurk K, Kehrel BE. Pathophysiologie und Biochemie der Thrombozyten.

- Internist. 2010;51:1086–94.
57. Versteeg HH, Heemskerk JWM, Levi M, Reitsma PH. New Fundamentals in Hemostasis. *Physiological Reviews*. 2013;93:327–58.
 58. Sixma JJ, Slot J-W, Geuze HJBT-M in E. [26] Immunocytochemical localization of platelet granule proteins. In: *Platelets: Receptors, adhesion, secretion Part A*. Academic Press; 1989. p. 301–11.
 59. Pötzsch B, Madlener K. *Hämostaseologie*. 2010. 972 p.
 60. Jurk K, Ph D, Kehrel BE, Ph D. *Platelets: Physiology and Biochemistry*. 2005;1:381–92.
 61. White JG. The dense bodies of human platelets. Origin of serotonin storage particles from platelet granules. *The American journal of pathology*. 1968;53:791–808.
 62. Jurk K, Kehrel BE. Die rolle von Thrombozyten bei Hämostase, Thrombose, Immunabwehr und Entzündung. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 2008;133:1130–5.
 63. Gachet C. ADP receptors of platelets and their inhibition. Vol. 86, *Thrombosis and haemostasis*. 2001. 222–232 p.
 64. Israels SJ, McMillan-Ward EM, Easton J, Robertson C, McNicol A. CD63 associates with the alphaIIb beta3 integrin-CD9 complex on the surface of activated platelets. Vol. 85, *Thrombosis and haemostasis*. 2001. 134–141 p.
 65. Gordon N, Thom J, Cole C, Baker R. Rapid detection of hereditary and acquired platelet storage pool deficiency by flow cytometry. Vol. 89, *British journal of haematology*. 1995. 117–123 p.
 66. Da Prada M, Richards JG, Kettler R. Amine storage organelles in platelets. *Platelets in Biology and Pathology*. 1981;107–45.
 67. Jurk K. Analysis of platelet function and dysfunction. *Hamostaseologie*. 2015;35:60–72.
 68. Nieuwenhuis HK, van Oosterhout JJ, Rozemuller E, van Iwaarden F, Sixma JJ. Studies with a monoclonal antibody against activated platelets: evidence that a secreted 53,000-molecular weight lysosome-like granule protein is exposed on the surface of activated platelets in the circulation. *Blood*. 1987;70:838 LP – 845.
 69. Jurk K, Kehrel BE. Die zentrale Rolle der Thrombozyten im neuen Verständnis der Hämostase. *Hämostaseologie*. 2005;39–49.
 70. Dopheide SM, Maxwell MJ, Jackson SP. Shear-dependent tether formation during platelet translocation on von Willebrand factor. *Blood*. 2002;99:159 LP – 167.
 71. Savage B, Saldívar E, Ruggeri ZM. Initiation of Platelet Adhesion by Arrest onto Fibrinogen or Translocation on von Willebrand Factor. *Cell*. 1996;84:289–97.
 72. Jackson SP, Mistry N, Yuan Y. Platelets and the injured vessel wall - 'Rolling into action.' Focus on glycoprotein Ib/V/IX and the platelet cytoskeleton. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 2000;10:192–7.
 73. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific Synergy of Multiple Substrate–Receptor Interactions in Platelet Thrombus Formation under Flow. *Cell*. 1998;94:657–66.
 74. Kato K, Kanaji T, Russell S, J Kunicki T, Furihata K, Kanaji S, Marchese P, Reininger A, M Ruggeri Z, Ware J. The contribution of glycoprotein VI to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion. Vol. 102, *Blood*. 2003. 1701–1707 p.
 75. Jackson SP, Nesbitt WS, Kulkarni S. Signaling events underlying thrombus

- formation. Vol. 1, Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2003. p. 1602–12.
76. Ruggeri ZM, De Marco L, Gatti L, Bader R, Montgomery RR. Platelets have more than one binding site for von Willebrand factor. *The Journal of clinical investigation*. 1983;72:1–12.
 77. Ruggeri ZM. Mechanisms of Shear-induced Platelet Adhesion and Aggregation. *Thrombosis and Haemostasis*. 1993;70:119–23.
 78. Cicmil M, Thomas JM, Leduc M, Bon C, Gibbins JM. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 signaling inhibits the activation of human platelets. *Blood*. 2002;99:137–44.
 79. Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*. 2003;102:449 LP – 461.
 80. Hechler B, Nonne C, Eckly A, Magnenat S, Rinckel J-Y, Denis C V, Freund M, Cazenave J-P, Lanza F, Gachet C. Arterial thrombosis: relevance of a model with two levels of severity assessed by histologic, ultrastructural and functional characterization. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2010;8:173–84.
 81. Kuijpers MJE, Schulte V, Bergmeier W, Lindhout T, Brakebusch C, Offermanns S, Fässler R, Heemskerk JWM, Nieswandt B. Complementary roles of glycoprotein VI and $\alpha 2\beta 1$ integrin in collagen-induced thrombus formation in flowing whole blood ex vivo. *The FASEB Journal*. 2003;17:685–7.
 82. Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Mokhtari-Nejad R, Lindhout T, Heemskerk JW, Zirngibl H, Fässler R. Glycoprotein VI but not $\alpha 2\beta 1$ integrin is essential for platelet interaction with collagen. *The EMBO journal*. 2001;20:2120–30.
 83. Fabre J-E, Nguyen MT, Latour A, A. Keifer J, P. Audoly L, M. Coffman T, H. Koller B. Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice. Vol. 5, *Nature medicine*. 1999. 1199–1202 p.
 84. Walther DJ, Peter J-U, Winter S, Höltje M, Paulmann N, Grohmann M, Vowinkel J, Alamo-Bethencourt V, Wilhelm CS, Ahnert-Hilger G, Bader M. Serotonylation of Small GTPases Is a Signal Transduction Pathway that Triggers Platelet α -Granule Release. *Cell*. 2003;115:851–62.
 85. Bledzka K, Pesho MM, Ma Y-Q, Plow EF. Chapter 12 - Integrin $\alpha \text{IIb}\beta 3$. In: Michelson ADBT-P (Third E, editor. *Platelets*. Academic Press; 2013. p. 233–48.
 86. Cosemans JMEM, Iserbyt BF, Deckmyn H, Heemskerk JWM. Multiple ways to switch platelet integrins on and off. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2008;6:1253–61.
 87. Morel O, Morel N, Jesel L, Freyssinet J-M, Toti F. Microparticles: a critical component in the nexus between inflammation, immunity, and thrombosis. *Seminars in Immunopathology*. 2011;33:469.
 88. Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *European Journal of Clinical Investigation*. 2004;34:392–401.
 89. Pereira J, Alfaro G, Goycoolea M, Quiroga T, Ocqueteau M, Massardo L, Pérez C, Sáez C, Panes O, Matur V, Mezzano D. Circulating platelet-derived microparticles in systemic lupus erythematosus. *Thrombosis and haemostasis*. 2005;94:123–31.
 90. Sinauridze E, Kireev D, Popenko N, Pichugin A, Panteleev M, Krymskaya O, Ataulkhanov FI. Platelet Microparticle membranes have 50- to 100-fold higher specific procoagulant activity than activated Platelets. *Thrombosis and Haemostasis*. 2007;97:425–34.

91. Szasz R, Dale GL. COAT platelets. *Current Opinion in Hematology*. 2003;10.
92. Alberio L, Safa O, Clemetson KJ, Esmon CT, Dale GL, Ruggeri Z, Rosing J, Rijn J van, Bevers E, Dieijen G van, Comfurius P, Zwaal R, Jesty J, Nemerson Y, Tans G, Rosing J, Thomassen M, Heeb M, Zwaal R, Griffin J, Tracy P, Eide L, Bowie E, Mann K, Chesney C, Pifer D, Colman R, Grigg A, Dauer R, Thurlow P, Camire R, Kalafatis M, Simioni P, Girolami A, Tracy P, Bevers E, Comfurius P, Zwaal R, Sims P, Wiedmer T, Esmon C, Weiss H, Shattil S, Dachary-Prigent J, Freyssinet J-M, Pasquet J-M, Carron J-C, Nurden A, Polgar J, Clemetson J, Kehrel B, Esmon C, Esmon N, Bonniec B Le, Johnson A, Bonniec B Le, Esmon C, Bonniec B Le, Guinto E, Esmon C, Smirnov M, Safa O, Regan L, Esmon C, Jackson C, McEver R, Bennett E, Martin M, Alberio L, Dale G, Safa O, Morrissey J, Esmon C, Esmon N, Peng J, Friese P, Heilmann E, George J, Burstein S, Dale G, Viskup R, Tracy P, Mann K, Dale G, Friese P, Hynes L, Burstein S, Ault K, Knowles C, Rinder H, Tracey J, Recht M, Nesheim M, Furmaniak-Kazmierczak E, Henin C, Cote G, Polgar J, Magnenat E, Wells T, Clemetson K, Bienz D, Clemetson K, Hayward C, Smith J, Horsewood P, Warkentin T, Kelton J, Hayward C, Furmaniak-Kazmierczak E, Cieutat A, Bouchard B, Catcher C, Thrash B, Adida C, Tracy P, Nieuwland R, Berckmans R, Rotteveel-Eijkman R, Geiser T, Sturzenegger M, Genewein U, Haerberli A, Beer J, Zwaal R, Comfurius P, Bevers E, Swords N, Tracy P, Mann K, Seghatchian J, Krailadsiri P. Surface expression and functional characterization of alpha-granule factor V in human platelets: effects of ionophore A23187, thrombin, collagen, and convulxin. *Blood*. 2000;95:1694–702.
93. Dale GL, Friese P, Batar P, Hamilton SF, Reed GL, Jackson KW, Clemetson KJ, Alberio L. Stimulated platelets use serotonin to enhance their retention of procoagulant proteins on the cell surface. *Nature*. 2002;415:175.
94. Wolberg AS, Campbell RA. Thrombin Generation, Fibrin Clot Formation and Hemostasis. *North*. 2009;38:15–23.
95. Jurk K, Lahav J, Van Aken H, Brodde MF, Nofer JR, Kehrel BE. Extracellular protein disulfide isomerase regulates feedback activation of platelet thrombin generation via modulation of coagulation factor binding. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2011;
96. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and Thrombin Generation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2002;22:1381–9.
97. Monroe DM, Hoffman M. What Does It Take to Make the Perfect Clot? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2006;26:41–8.
98. Dörmann D, Clemetson KJ, Kehrel BE. The GPIb thrombin-binding site is essential for thrombin-induced platelet procoagulant activity. *Blood*. 2000;96:2469 LP – 2478.
99. Rosing J, Tans G, Govers-Riemslog JWP, Zwaal RFA, Hemker H. The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex. Vol. 255, *The Journal of biological chemistry*. 1980. 274–283 p.
100. Tu BP, Weissman JS. Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *The Journal of cell biology*. 2004;164:341–6.
101. Essex D, Chen K, Swiatkowska M. Localization of protein disulfide isomerase to the external surface of the platelet plasma membrane. Vol. 86, *Blood*. 1995. 2168–2173 p.
102. Lahav J, Gofer-Dadosh N, Luboshitz J, Hess O, Shaklai M. Protein disulfide isomerase mediates integrin-dependent adhesion. *FEBS Letters*. 2000;475:89–92.

103. Lahav J, Jurk K, Hess O, J Barnes M, W Farndale R, Luboshitz J, Kehrel B. Sustained integrin ligation involves extracellular free sulfhydryls and enzymatically catalyzed disulfide exchange J Lahav, K Jurk, O Hess, MJ Barnes, RW Farndale, J Luboshitz, BE Kehrel *Blood* 100 (7), 2472-2478. Vol. 100, *Blood*. 2002. 2472–2478 p.
104. Essex DW, Li M. Protein disulphide isomerase mediates platelet aggregation and secretion. *British Journal of Haematology*. 1999;104:448–54.
105. Akkerman JWN. Regulation of Carbohydrate Metabolism in Platelets: A Review. Vol. 39, *Thrombosis and haemostasis*. 1978. 712–724 p.
106. Zharikov S, Shiva S. Platelet mitochondrial function: from regulation of thrombosis to biomarker of disease. *Biochemical Society Transactions*. 2013;41:118–23.
107. Matarrese P, Straface E, Palumbo G, Anselmi M, Gambardella L, Ascione B, Del Principe D, Malorni W. Mitochondria regulate platelet metamorphosis induced by opsonized zymosan A – activation and long-term commitment to cell death. *The FEBS Journal*. 2009;276:845–56.
108. Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nature Cell Biology*. 2001;3:E255–63.
109. Leytin V. Apoptosis in the anucleate platelet. *Blood Reviews*. 2012;26:51–63.
110. Yamagishi S, Edelstein D, Du X, Brownlee M. Hyperglycemia Potentiates Collagen-Induced Platelet Activation Through Mitochondrial Superoxide Overproduction. *Diabetes*. 2001;50:1491 LP – 1494.
111. Reers M, Smith TW, Chen LB. J-Aggregate Formation of a Carbocyanine as a Quantitative Fluorescent Indicator of Membrane Potential. *Biochemistry*. 1991;30:4480–6.
112. Perelman A, Wachtel C, Cohen M, Haupt S, Shapiro H, Tzur A. JC-1: Alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death and Disease*. 2012;3:e430-7.
113. Bio-Rad Laboratories Inc. *Flow Cytometry Basics Guide*. Bulletin 6636 Ver C. 2018;1–69.
114. Laudano AP, Doolittle RF. Synthetic peptide derivatives that bind to fibrinogen and prevent the polymerization of fibrin monomers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1978;75:3085–9.
115. Polgár J, Clemetson JM, Kehrel BE, Wiedemann M, Magnenat EM, Wells TNC, Clemetson KJ. Platelet activation and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (Tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272:13576–83.
116. Collier BS, Gralnick HR. Studies on the mechanism of ristocetin-induced platelet agglutination. Effects of structural modification of ristocetin and vancomycin. *The Journal of clinical investigation*. 1977;60:302–12.
117. Reed PW, Lardy HA. A23187: A Divalent Cation Ionophore. *Journal of Biological Chemistry* . 1972;247:6970–7.
118. White JG, Rao GH, Gerrard JM. Effects of the Ionophore A23187 on blood platelets I. Influence on aggregation and secretion. *The American journal of pathology*. 1974;77:135–49.
119. Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. *BioTechniques*. 2011;50:98–115.
120. Jensen MK, De Nully Brown P, Lund BV, Nielsen OJ, Hasselbalch HC. Increased platelet activation and abnormal membrane glycoprotein content and

- redistribution in myeloproliferative disorders. *British Journal of Haematology*. 2000;110:116–24.
121. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Balducci D, Russo L, Guerini V, Barbui T. V617F JAK-2 mutation in patients with essential thrombocythemia: relation to platelet, granulocyte, and plasma hemostatic and inflammatory molecules. *Blood*. 2007;35:702–11.
 122. Karakantza M, Giannakoulas NC, Zikos P, Sakellaropoulos G, Kouraklis A, Aktypi A, Metallinos IC, Theodori E, Zoumbos NC, Maniatis A. Markers of Endothelial and In Vivo Platelet Activation in Patients with Essential Thrombocythemia and Polycythemia Vera. *International Journal of Hematology*. 2004;79:253–9.
 123. Gutensohn K, Kuck K. Durchflußzytometrisch nachgewiesene Aktivierung von Thrombozyten im Verlauf der Rotablution. *Blood*. 2000;20:15–20.
 124. Carobbio A, Finazzi G, Antonioli E, Vannucchi AM, Barosi G, Ruggeri M, Rodeghiero F, Delaini F, Rambaldi A, Barbui T. Hydroxyurea in essential thrombocythemia: rate and clinical relevance of responses by European LeukemiaNet criteria. *Blood*. 2010;116:1051–5.
 125. Michiels JJ, Ten Kate FW, Vudzevski VD, Abels J. Histopathology of erythromelalgia in thrombocythaemia. *Histopathology*. 1984;8:669–78.
 126. Van Genderen PJJ, Michiels JJ. Erythromelalgia: A pathognomonic microvascular thrombotic complication in essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. 1997;23:357–63.
 127. Rocca B, Ciabattoni G, Tartaglione R, Cortelazzo S, Barbui T, Patrono C, Landolfi R. Increased Thromboxane Biosynthesis in Essential Thrombocythemia. *Thrombosis and haemostasis*. 1995;74:1225–30.
 128. Leytin V, Allen DJ, Mykhalov S, Mis L, Lyubimov E V, Garvey B, Freedman J. Pathologic high shear stress induces apoptosis events in human platelets. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004;320:303–10.
 129. Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, Gisslinger H, Tognoni G, Patrono C, Barbui T. Efficacy and Safety of Low-Dose Aspirin in Polycythemia Vera. *New England Journal of Medicine*. 2004;350:114–24.
 130. Evangelista V, Manarini S, Rotondo S, Martelli N, Polischuk R, McGregor JL, de Gaetano G, Cerletti C. Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction in dynamic conditions: evidence of adhesion cascade and cross talk between P-selectin and the beta 2 integrin CD11b/CD18. *Blood*. 1996;88:4183–94.
 131. Trelinski J, Tybura M, Smolewski P, Robak T, Chojnowski K. The influence of low-dose aspirin and hydroxyurea on platelet–leukocyte interactions in patients with essential thrombocythemia. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. 2009;20.
 132. Moore SF, Hunter RW, Harper MT, Savage JS, Siddiq S, Westbury SK, A.W. P, A.D. M. Dysfunction of the PI3 kinase/Rap1/integrin α IIb β 3 pathway underlies ex vivo platelet hypoactivity in essential thrombocythemia. *Blood*. 2013;121:1209–19.
 133. Panova-Noeva M, Marchetti M, Buoro S, Russo L, Leuzzi A, Finazzi G, Rambaldi A, Ottomano C, Ten Cate H, Falanga A. JAK2V617F mutation and hydroxyurea treatment as determinants of immature platelet parameters in essential thrombocythemia and polycythemia vera patients. *Blood*. 2011;118:2599–601.
 134. Harrison I.J. Mackie, S.J. Machin, P. MSCR. Reticulated platelets. *Platelets*. 1997;8:379–84.
 135. Tsai HM, Sussman II, Nagel RL. Shear stress enhances the proteolysis of von Willebrand factor in normal plasma. *Blood*. 1994;83:2171–9.

136. Shim K, J Anderson P, A Tuley E, Wiswall E, Sadler JE. Platelet-VWF complexes are preferred substrates of ADAMTS13 under fluid shear stress. Vol. 111, *Blood*. 2008. 651–657 p.
137. Federici AB, Rand J, Bucciarelli P, Budde U, Genderen PJJ, Mohri H, Meyer D, Rodeghiero F, Sadler JE. Acquired von Willebrand Syndrome: data from an International Registry. Vol. 84, *Thrombosis and haemostasis*. 2000. 345–349 p.
138. Lancellotti S, Dragani A, Ranalli P, Petrucci G, Basso M, Tartaglione R, Rocca B, De Cristofaro R. Qualitative and quantitative modifications of von Willebrand factor in patients with essential thrombocythemia and controlled platelet count. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2015;13:1226–37.
139. Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Sixma JJ. Patients with a prolonged bleeding time and normal aggregation tests may have storage pool deficiency: studies on one hundred six patients. *Blood*. 1987;70:620 LP – 623.
140. Israels SJ, McNicol A, Robertson C, Gerrard JM. Platelet storage pool deficiency: diagnosis in patients with prolonged bleeding times and normal platelet aggregation. *British Journal of Haematology*. 1990;75:118–21.
141. Pareti FI, Gugliotta L, Mannucci L, Guarini AR, Mannuccio PM. Biochemical and metabolic aspects of platelet dysfunction in chronic myeloproliferative disorders. *Thrombosis and haemostasis*. 1982;42:084–9.
142. Leoncini G, Maresca M, Buzzi E, Piana A, Armani U. Platelets of patients affected with Essential Thrombocythemia are abnormal in plasma membrane and adenine nucleotide content. Vol. 44, *European journal of haematology*. 1990. 116–120 p.
143. Atkinson BT, Stafford MJ, Pears CJ, Watson SP. Signalling events underlying platelet aggregation induced by the glycoprotein VI agonist convulxin. *European journal of biochemistry*. 2001;v. 268:5242-5248–2001 v.268 no.20.
144. Nylander S, Mattsson C, Ramström S, Lindahl TL. The relative importance of the ADP receptors, P2Y₁₂ and P2Y₁, in thrombin-induced platelet activation. *Thrombosis Research*. 2003;111:65–73.
145. Arellano-Rodrigo E, Alvarez-Larrán A, Reverter JC, Villamor N, Colomer D, Cervantes F. Increased platelet and leukocyte activation as contributing mechanisms for thrombosis in essential thrombocythemia and correlation with the JAK2 mutational status. Vol. 91, *Haematologica*. 2006. 169–175 p.
146. Febbraio M, Silverstein RL. Identification and characterization of LAMP-1 as an activation-dependent platelet surface glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry*. 1990;265:18531–7.
147. Zorova LD, Popkov VA, Plotnikov EY, Silachev DN, Pevzner IB, Jankauskas SS, Babenko VA, Zorov SD, Balakireva A V, Juhaszova M, Sollott SJ, Zorov DB. Mitochondrial membrane potential. *Analytical Biochemistry*. 2018;552:50–9.
148. Dikshit P, Chatterjee M, Goswami A, Mishra A, Jana NR. Aspirin Induces Apoptosis through the Inhibition of Proteasome Function. *Journal of Biological Chemistry* . 2006;281:29228–35.
149. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*. 1995;267:1445 LP – 1449.
150. Vanags DM, Orrenius S, Aguilar-Santelises M. Alterations in Bcl-2/Bax protein levels in platelets form part of an ionomycin-induced process that resembles apoptosis. *British Journal of Haematology*. 1997;99:824–31.
151. Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Letters*. 1997;416:15–8.

152. Siewiera K, Kassassir H, Talar M, Wieteska L, Watala C. Higher mitochondrial potential and elevated mitochondrial respiration are associated with excessive activation of blood platelets in diabetic rats. *Life Sciences*. 2016;148:293–304.
153. Chen K, Lin Y, Detwiler TC. Protein disulfide isomerase activity is released by activated platelets. *Blood*. 1992;79:2226–8.
154. Chen K, Detwiler TC, Essex DW. Characterization of protein disulphide isomerase released from activated platelets. *British Journal of Haematology*. 1995;90:425–31.
155. Holbrook L-M, Watkins NA, Simmonds AD, Jones CI, Ouwehand WH, Gibbins JM. Platelets release novel thiol isomerase enzymes which are recruited to the cell surface following activation. *British Journal of Haematology*. 2010;148:627–37.
156. Kehrel BE, Fender AC. Greetings from the endoplasmic reticulum (ER): escaping ER thiol isomerases regulate thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2018;16:364–6.
157. Lahav J, Jurk K, Hess O, Barnes MJ, Farndale RW, Luboshitz J, Kehrel BE. Sustained integrin ligation involves extracellular free sulfhydryls and enzymatically catalyzed disulfide exchange. *Blood*. 2002;100:2472 LP – 2478.
158. Manickam N, Sun X, Li M, Gazitt Y, Essex DW. Protein disulphide isomerase in platelet function. *British Journal of Haematology*. 2008;140:223–9.
159. Wiersma VR, Michalak M, Abdullah TM, Bremer E, Eggleton P. Mechanisms of Translocation of ER Chaperones to the Cell Surface and Immunomodulatory Roles in Cancer and Autoimmunity. *Frontiers in oncology*. 2015;5:7.
160. Stopa JD, Neuberger D, Puligandla M, Furie B, Flaumenhaft R, Zwicker JI. Protein disulfide isomerase inhibition blocks thrombin generation in humans by interfering with platelet factor V activation. *JCI Insight*. 2017;2.
161. Flaumenhaft R, Furie B, Zwicker JI. Therapeutic implications of protein disulfide isomerase inhibition in thrombotic disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2015;35:16–23.