

Aus der III. Medizinischen Klinik und Poliklinik
und dem Centrum für Thrombose und Hämostase (CTH)
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Durchflusszytometrische Untersuchungen der Thrombozytenfunktion
von Patient:innen mit hämorrhagischer Diathese unklarer Genese
oder mit von-Willebrand-Syndrom Typ 1 mit Verdacht auf
hereditäre nicht-syndromale Thrombozytopathien

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Carla Melissa Gutekunst
aus Berlin

Mainz, 2022

Tag der Promotion:

05. Mai 2023

Meinen Eltern gewidmet

in Liebe und Dankbarkeit für all ihre Unterstützung

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	9
Abbildungsverzeichnis	13
Tabellenverzeichnis	18
1 Einleitung und Zielsetzung	22
2 Literaturdiskussion	24
2.1 Die Hämostase.....	24
2.1.1 Thrombozyten	24
2.1.2 Primäre Hämostase.....	27
2.1.2.1 Thrombozytenadhäsion	27
2.1.2.2 Thrombozytenaktivierung	27
2.1.2.3 Thrombozytenaktivierung durch lösliche Agonisten	28
2.1.2.3.1 ADP	29
2.1.2.3.2 Adrenalin.....	29
2.1.2.3.3 Serotonin.....	30
2.1.2.3.4 Thrombin.....	30
2.1.2.3.5 Thromboxan A ₂	31
2.1.2.4 Thrombozytenaggregation.....	31
2.1.3 Sekundäre Hämostase	32
2.1.3.1 Initiation.....	32
2.1.3.2 Amplifikation	33
2.1.3.3 Propagation	33
2.1.4 Inhibitoren der Hämostase.....	34
2.1.5 Fibrinolyse	34
2.2 Hämorrhagische Diathesen	35
2.2.1 Definition, Ätiologie, Epidemiologie.....	35
2.2.2 Symptomatik.....	35
2.2.3 Klassifikation	35
2.2.3.1 Thrombozytopathien.....	36
2.2.3.1.1 Adhäsionsstörungen	37
2.2.3.1.2 Fibrinogenbindungsstörungen.....	38
2.2.3.1.3 Granulasekretionsstörungen	38
2.2.3.1.4 Signaltransduktionsstörungen	39
2.2.3.1.5 Störungen der prokoagulanten Aktivität.....	40
2.2.3.2 Thrombozytopenien.....	40
2.2.3.3 Plasmatische Gerinnungsstörungen	41
2.2.3.3.1 Von-Willebrand-Syndrom	42

2.2.3.4	Vaskuläre hämorrhagische Diathesen	44
2.2.4	Diagnostik.....	44
2.2.4.1	Thrombozytenfunktionsdiagnostik.....	48
2.2.5	Therapie	50
3	Material und Methoden	52
3.1	Material	52
3.1.1	Geräte	52
3.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	52
3.1.3	Reagenzien	53
3.1.4	Antikörper.....	53
3.1.5	Software-Programme.....	54
3.2	Methoden	54
3.2.1	Studiendesign.....	54
3.2.1.1	Studienpopulation, -art, Zeitraum.....	54
3.2.1.2	Genehmigung.....	55
3.2.1.3	Datenschutz, Dokumentation, Datenspeicherung	55
3.2.1.4	Fallzahlplanung	55
3.2.1.5	Statistische Analyse.....	56
3.2.1.6	Patient:innenrekrutierung.....	56
3.2.1.6.1	Einschlusskriterien	57
3.2.1.6.2	Ausschlusskriterien	57
3.2.1.7	Kontrollproband:innenrekrutierung.....	58
3.2.1.7.1	Einschlusskriterien	58
3.2.1.7.2	Ausschlusskriterien	58
3.2.2	Erfassung der Blutungseigenanamnese mit Hilfe des ISTH-BAT	58
3.2.3	Familienanamnese, Medikation, Komorbiditäten.....	59
3.2.4	Venöse Blutentnahme	60
3.2.5	Automatischer Hämatologie-Analysator.....	60
3.2.6	Durchflusszytometrie - Allgemeines Versuchsprinzip.....	61
3.2.7	Durchflusszytometrische Quantifizierung der Rezeptor-Antigenbindungsstellen (ABS) der Hauptglykoproteine auf der Thrombozytenoberfläche	62
3.2.8	Durchflusszytometrische Erhebung des Aktivierungsstatus und der Agonisten-induzierten Aktivierungsfähigkeit der Thrombozyten <i>in vitro</i>	63
3.2.8.1	Gewinnung von thrombozytenreichem Plasma.....	63
3.2.8.2	Thrombozytenaktivierungsmarker.....	64
3.2.8.2.1	Mepacrine	64
3.2.8.2.2	Fibrinogen	64
3.2.8.2.3	vWF	65
3.2.8.2.4	CD62P, CD63, LAMP-1.....	65

3.2.8.3	Agonisten	65
3.2.8.3.1	ADP	66
3.2.8.3.2	Convulxin	66
3.2.8.3.3	Epinephrin.....	66
3.2.8.3.4	Ristocetin	66
3.2.8.3.5	Thrombin.....	66
3.2.8.4	Agonistentitration.....	67
3.2.8.5	Durchflusszytometrische Analyse	68
4	Ergebnisse	69
4.1	Deskriptive Statistik	69
4.1.1	Patient:innen- und Kontrollproband:innencharakteristika	69
4.1.2	Blutzellparameter.....	72
4.1.3	Ausgewählte Charakteristika von Patient:innen mit bestätigter PFD	76
4.1.4	Prävalenzerhebung von Patient:innen mit vermutlich hereditären, nicht-syndromalen Thrombozytopathien der hämostaseologischen Ambulanz des CTH und der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz im Zeitraum September bis November 2018.....	78
4.2	Explorative Analyse	80
4.2.1	Erfassung der Blutungseigenanamnese mit Hilfe des ISTH-BAT	80
4.2.2	Durchflusszytometrische Quantifizierung der Rezeptor-ABS der Hauptglykoproteine auf der Thrombozytenoberfläche <i>ex vivo</i>	84
4.2.3	Durchflusszytometrische Erhebung der vWF-Bindung an den thrombozytären Rezeptor GPIIb α <i>in vitro</i> (Agonistentitration)	88
4.2.3.1	Basale vWF-Bindung	89
4.2.3.2	Agonisten-induzierte vWF-Bindung.....	90
4.2.3.2.1	Ristocetin-induzierte vWF-Bindung	90
4.2.4	Durchflusszytometrische Erhebung der Aktivierung des thrombozytären Rezeptors GPIIb/IIIa (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) quantifiziert durch die Fähigkeit der Fibrinogenbindung <i>ex vivo</i> und <i>in vitro</i> (Agonistentitration)	91
4.2.4.1	Basale Fibrinogenbindung	91
4.2.4.2	Agonisten-induzierte Fibrinogenbindung.....	92
4.2.4.2.1	ADP-induzierte Fibrinogenbindung.....	92
4.2.4.2.2	Epinephrin-induzierte Fibrinogenbindung	93
4.2.4.2.3	Convulxin-induzierte Fibrinogenbindung	94
4.2.4.2.4	Thrombin-induzierte Fibrinogenbindung	95
4.2.5	Durchflusszytometrische Erhebung der thrombozytären Granulasekretion <i>in vitro</i> durch Induktion der CD62P- (α -Granula), CD63- (δ -Granula und Lysosomen) und LAMP-1- (Lysosomen) Oberflächen-Expression (Agonistentitration).....	96
4.2.5.1	Basale CD62P-Oberflächen-Expression	96
4.2.5.2	Agonisten-induzierte CD62P-Oberflächen-Expression.....	97

4.2.5.2.1	Convulxin-induzierte CD62P-Oberflächen-Expression	97
4.2.5.2.2	Thrombin-induzierte CD62P-Oberflächen-Expression	98
4.2.5.3	Basale CD63-Oberflächen-Expression	100
4.2.5.4	Agonisten-induzierte CD63-Oberflächen-Expression	101
4.2.5.4.1	Convulxin-induzierte CD63-Oberflächen-Expression	101
4.2.5.4.2	Thrombin-induzierte CD63-Oberflächen-Expression	102
4.2.5.5	Basale LAMP-1-Oberflächen-Expression	103
4.2.5.6	Agonisten-induzierte LAMP-1-Oberflächen-Expression	104
4.2.5.6.1	Convulxin-induzierte LAMP-1-Oberflächen-Expression	104
4.2.5.6.2	Thrombin-induzierte LAMP-1-Oberflächen-Expression	106
4.2.6	Durchflusszytometrische Erhebungen der Patient:innen mit bestätigten PFD	107
4.2.6.1	Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozyten- aktivierung	107
4.2.6.1.1	Basale und ADP-induzierte Fibrinogenbindung	108
4.2.6.1.2	Epinephrin-, Convulxin- und Thrombin-induzierte Fibrinogenbindung	109
4.2.6.1.3	Convulxin- und Thrombin-induzierte Granulasekretion durch Induktion der CD62P-, CD63- und LAMP-1-Oberflächen-Expression	111
4.2.6.2	Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung	114
4.2.6.2.1	Basale und Epinephrin-induzierte Fibrinogenbindung	115
4.2.6.2.2	ADP-, Convulxin- und Thrombin-induzierte Fibrinogenbindung	116
4.2.6.2.3	Convulxin- und Thrombin-induzierte Granulasekretion durch Induktion der CD62P-, CD63- und LAMP-1-Oberflächen-Expression	118
4.2.6.3	Patient:innen mit δ -SPD	121
4.2.6.3.1	Convulxin- und Thrombin-induzierte Granulasekretion durch Induktion der CD63-Oberflächen-Expression	121
4.2.6.3.2	Convulxin- und Thrombin-induzierte Granulasekretion durch Induktion der CD62P- und LAMP-1-Oberflächen-Expression	125
4.2.6.3.3	ADP-, Epinephrin-, Convulxin- und Thrombin-induzierte Fibrinogenbindung	128
4.3	Konfirmatorische Analyse	130
4.3.1	Durchflusszytometrische Erhebung der thrombozytären Mepacrine- aufnahme in die δ -Granula <i>ex vivo</i> und der δ -Granulasekretion durch Mepacrinefreisetzung <i>in vitro</i> (Agonistentitration)	131
4.3.1.1	Basale Mepacrineaufnahme	131
4.3.1.2	Agonisten-induzierte Mepacrinefreisetzung	132
4.3.1.2.1	Convulxin-induzierte Mepacrinefreisetzung	132
4.3.1.2.2	Thrombin-induzierte Mepacrinefreisetzung	133
4.3.2	Durchflusszytometrische Erhebungen der Patient:innen mit bestätigten PFD	135
4.3.2.1	Patient:innen mit δ -SPD	135
4.3.2.1.1	Basale Mepacrineaufnahme in und Convulxin- und Thrombin- induzierte Mepacrinefreisetzung aus den δ -Granula	135

4.3.2.2	Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung	139
4.3.2.2.1	Basale Mepacrineaufnahme in und Convulxin- und Thrombin-induzierte Mepacrinefreisetzung aus den δ -Granula	139
4.3.2.3	Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung	140
4.3.2.3.1	Basale Mepacrineaufnahme in und Convulxin- und Thrombin-induzierte Mepacrinefreisetzung aus den δ -Granula	140
5	Diskussion	142
5.1	Unterschätzte Prävalenz von vermutlich hereditären, nicht-syndromalen Thrombozytopathien bei Patient:innen mit hämorrhagischer Diathese unklarer Genese oder mit vWS Typ 1.....	143
5.2	Limitierung der Erfassung von vermutlich hereditären, nicht-syndromalen Thrombozytopathien durch die globalen Thrombozytenfunktionstests PFA-100 und LTA nach Born.....	145
5.2.1	Präanalytische und weitere Herausforderungen in der Diagnostik von Thrombozytopathien und vWS.....	148
5.3	Pathologische Erhöhung des ISTH-BAT „bleeding score“ bei Patient:innen mit vermutlich hereditären, nicht-syndromalen Thrombozytopathien mit und ohne vWS Typ 1	148
5.4	Verminderte vWF-Bindung an den thrombozytären Rezeptor GPIIb <i>in vitro</i> bei Patient:innen mit vWS Typ 1 und Betrachtung des gemeinsamen Vorliegens einer Thrombozytopathie und eines vWS Typ 1	150
5.5	Verminderte Anzahl an Rezeptor-ABS der Hauptglykoproteine GPIIb und GPVI auf der Thrombozytenoberfläche bei Patient:innen mit Thrombozytopathie und vWS Typ 1	153
5.6	Verminderte Aktivierung des thrombozytären Rezeptors GPIIb/IIIa <i>in vitro</i> bei Patient:innen mit Störung der ADP- oder Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung bzw. mit „Gi-like“ Thrombozytopathie mit und ohne vWS Typ 1.....	155
5.7	Verminderung der Anzahl der δ -Granula bzw. der δ -Granula-Exozytose bei Patient:innen mit δ -SPD mit und ohne vWS Typ 1.....	158
5.8	Vergleichbare oder tendenziell leicht verminderte α -Granula-Exozytose bei Patient:innen mit Thrombozytopathie mit und ohne vWS Typ 1.....	161
5.9	Teilweise verminderte lysosomale Exozytose bei Patient:innen mit Thrombozytopathie mit und ohne vWS Typ 1	162
6	Zusammenfassung	164
7	Literaturverzeichnis.....	167

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
>	mehr als
≥	gleich oder mehr als
<	weniger als
≤	gleich oder weniger als
-	Minus / ohne
+	Plus / mit
α	alpha
β	beta
γ	gamma
δ	delta
μ-	Mikro-
Abb.	Abbildung
ABS	Antigenbindungsstelle
ADP	Adenosindiphosphat
APC	Allophycocyanin
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
ASH	„American Society of Hematology“
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
BAT	„bleeding assessment tool“
bsp.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Kalziumionen
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAT	„Calibrated Automated Thrombography“
CD	„Cluster of Differentiation“
COX	Cyclooxygenase
CRP	C-reaktives Protein
CTH	Centrum für Thrombose und Hämostase (Universitätsmedizin Mainz)
d-	Dezi-
DAG	Diacylglycerin

dd	doppelt destilliert
Epin.	Epinephrin
etc.	und Verschiedene mehr („et cetera“)
f-	Femto-
FI-XIII	inaktive Gerinnungsfaktoren I-XIII
FIa-XIIIa	aktivierte Gerinnungsfaktoren I-XIII
FVIII:C	Faktor VIII-Aktivitätstest
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellanalyse („fluorescence-activated cell sorting“)
fam.	familiär
FcR	„fragment crystallizable receptor“
Fe ^{2+/3+}	Eisenionen
FITC	Fluorescein isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht („forward scatter channel“)
g	Gramm
GFI1b	Transkriptionsfaktor „growth-factor-independence-1b“
ggf.	gegebenenfalls
GP	Glykoprotein
G-Protein	guaninnukleotidbindenes Protein
GPRP	Glycin-Prolin-Arginin-Prolin
H ₂ O	Wasser
HBSS	Salzlösung nach Hanks („Hank´s balanced salt solution“)
HNO	Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde
HWZ	Halbwertszeit
IBM	International Business Machines Corporation
i.d.R.	in der Regel
IgG	Immunglobulin G
IMBEI	Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (Mainz)
incl.	inclusive
ind.	induziert
INR	„international normalized ratio“
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPF	immature Plättchenfraktion
ISI	„international sensitivity index“
ISTH	Internationale Gesellschaft für Thrombose und Hämostase („International Society on Thrombosis and Haemostasis“)
ITAM	„immunoreceptor tyrosine-based activation motif“
l	Liter

LAMP	lysosomale Membranproteine („lysosomal associated membrane proteins“)
lin	linear
log	logarithmisch
LTA	Lichttransmissionsaggregometrie
m	Meter
m-	Milli-
M	Molar
max.	maximal
MCH	mittlerer Hämoglobin-Gehalt der Erythrozyten („mean corpuscular hemoglobin“)
MCHC	mittlere Hämoglobin-Konzentration der Erythrozyten („mean corpuscular hemoglobin concentration“)
MCV	mittleres Erythrozytenvolumen („mean corpuscular volume“)
MD	Median
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
Mg ²⁺	Magnesiumionen
min.	minimal
mol	Mol
MPV	mittleres Thrombozytenvolumen
MW	Mittelwert
n	Anzahl
n-	Nano
NaCl	Natriumchlorid
NAOH	Natriumhydroxid
nb	nicht bestätigt
NBEAL-2	„Neurobeachin-like 2“-Protein
NGS	„Next Generation Sequencing“
NHF	“National Hemophilia Foundation”
NSAID	nicht-steroidales Antiphlogistikum („non-steroidal anti-inflammatory drug“)
p-	Piko-
PAI	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor
PAR	Protease-aktivierender Rezeptor
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (“phosphate buffered saline”)
PDGF	„platelet-derived growth factor“
PE	Phycoerythrin
PFA	Thrombozytenfunktionsanalysator (“Platelet Function Analyser”)
PFD	Thrombozytenfunktionsstörung (“platelet function disorder”)

pH	Säuregrad ("potentia Hydrogenii")
PKC	Proteinkiniase C
PLC	Phospholipase C
PRP	thrombozytenreiches Plasma ("platelet-rich plasma")
RIPA	Ristocetin-induzierte Thrombozytenaggregation
rpm	Umdrehungen pro Minute ("revolutions per minute")
s	Sekunde/n
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannt
SPD	Storage-Pool-Erkrankung („storage pool deficiency“)
SSC	Seitwärtsstreulicht ("side scatter channel")
s.u.	siehe unten
TF	Gewebefaktor („tissue factor“)
TFPI	Gewebefaktor-Inhibitor („tissue factor pathway inhibitor“)
TP	Thromboxan A ₂ -Rezeptor
t-PA	Gewebe-Plasminogen-Aktivator („tissue-type plasminogen activator“)
TPO	Thrombopoietin
TSP-1	Thrombospondin-1
TxA ₂	Thromboxan A ₂
u.a.	unter anderem
u-PA	Urokinase („urinary-type plasminogen activator“)
v.a.	vor allem
v/v	Volumenprozent
vWF	von-Willebrand-Faktor
vWF:Ag	Antigentest des von-Willebrand-Faktors
vWF:CB	Kollagenbindungstest des von-Willebrand-Faktors
vWF:RCo	Ristocetin-Cofaktor-Aktivitätstest des von-Willebrand-Faktors
vWFpp	von-Willebrand-Faktor-Propeptid
vWS	von-Willebrand-Syndrom
VWS1	von Willebrand-Syndrom Typ 1
WFH	„World Federation of Hemophilia“
w/v	Gewichtsprozent
x	mal
xg	g-Kraft/ Zentrifugalbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
z.T.	zum Teil

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: ISTH-BAT „bleeding score“ aller Kontrollproband:innen und Patient:innen (A) und getrennt nach Geschlechtern: Frauen (B) und Männer (C). Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe	82
Abbildung 2: Quantifizierung der Rezeptor-ABS der Hauptglykoproteine GPIIb/IIIa (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) (A), GPIIb (B), GPIX (GPIIb/V/IX) (C), GPVI (D), GPIIa (Integrin β_1) (E) und CD36 (F und G) auf der Thrombozytenoberfläche der Kontrollproband:innen und Patient:innen. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe	86
Abbildung 3: Basalwerte der vWF-Bindung. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe	89
Abbildung 4: Ristocetin-induzierte Fibrinogenbindung nach Zugabe von 1,0 mg/ml Ristocetin. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe	90
Abbildung 5: Basalwerte der Fibrinogenbindung von extern zugesetztem Fibrinogen. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe	91
Abbildung 6: ADP-induzierte Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0,75 μ M ADP. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe	92
Abbildung 7: Epinephrin-induzierte Fibrinogenbindung nach Zugabe von 20 μ M Epinephrin. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe	93
Abbildung 8: Convulxin-induzierte Fibrinogenbindung nach Zugabe von 5 (A) und 20 (B) ng/ml Convulxin. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe	94
Abbildung 9: Thrombin-induzierte Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0,1 (A) und 0,2 (B) U/ml Thrombin. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe	95
Abbildung 10: Basalwerte der CD62P-Oberflächen-Expression. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe	97
Abbildung 11: CD62P-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 5 (A) und 20 (B) ng/ml Convulxin. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe	98
Abbildung 12: CD62P-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0,1 (A) und 0,2 (B) U/ml Thrombin. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe	99
Abbildung 13: Basalwerte der CD63-Oberflächen-Expression. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe	100
Abbildung 14: CD63-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 5 (A) und 20 (B) ng/ml Convulxin. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe	101
Abbildung 15: CD63-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0,1 (A) und 0,2 (B) U/ml Thrombin. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe	103
Abbildung 16: Basalwerte der LAMP-1-Oberflächen-Expression. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe	104
Abbildung 17: LAMP-1-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 5 (A) und 20 (B) ng/ml Convulxin. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe	105
Abbildung 18: LAMP-1-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0,1 (A) und 0,2 (B) U/ml Thrombin. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe	106
Abbildung 19: Basalwerte der Fibrinogenbindung von extern zugesetztem Fibrinogen (A) und ADP-induzierte Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0,75 μ M ADP (B) bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe	108

Abbildung 20: Agonistentitration der ADP-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0, 0,125, 0,25 und 0,75 μM ADP bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe.....	109
Abbildung 21: Agonistentitration der Epinephrin-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0, 1, 5, 10 und 20 μM Epinephrin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe.....	110
Abbildung 22: Agonistentitration der Convulxin-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe.....	110
Abbildung 23: Agonistentitration der Thrombin-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe.....	111
Abbildung 24: Agonistentitration der CD62P-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe.....	112
Abbildung 25: Agonistentitration der CD62P-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe.....	112
Abbildung 26: Agonistentitration der CD63-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe.....	113
Abbildung 27: Agonistentitration der CD63-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe.....	113
Abbildung 28: Agonistentitration der LAMP-1-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe.....	114
Abbildung 29: Agonistentitration der LAMP-1-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe.....	114
Abbildung 30: Basalwerte der Fibrinogenbindung von extern zugesetztem Fibrinogen (A) und Epinephrin-induzierte Fibrinogenbindung nach Zugabe von 20 μM Epinephrin (B) bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe	115

Abbildung 31: Agonistentitration der Epinephrin-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0, 1, 5, 10 und 20 μ M Epinephrin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe	116
Abbildung 32: Agonistentitration der ADP-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0, 0,125, 0,25 und 0,75 μ M ADP bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe	117
Abbildung 33: Agonistentitration der Convulxin-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe	117
Abbildung 34: Agonistentitration der Thrombin-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe	118
Abbildung 35: Agonistentitration der CD62P-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe	118
Abbildung 36: Agonistentitration der CD62P-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe	119
Abbildung 37: Agonistentitration der CD63-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe	119
Abbildung 38: Agonistentitration der CD63-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe	120
Abbildung 39: Agonistentitration der LAMP-1-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe	120
Abbildung 40: Agonistentitration der LAMP-1-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe	121
Abbildung 41: Basalwerte der CD63-Oberflächen-Expression (A) und nach Zugabe von 20 ng/ml Convulxin (B) bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe	122
Abbildung 42: Agonistentitration der CD63-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe	123

Abbildung 43: Basalwerte der CD63-Oberflächen-Expression (A) und nach Zugabe von 0,2 U/ml Thrombin (B) bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe.....	124
Abbildung 44: Agonistentitration der CD63-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe.....	125
Abbildung 45: Agonistentitration der CD62P-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe.....	126
Abbildung 46: Agonistentitration der CD62P-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe.....	126
Abbildung 47: Agonistentitration der LAMP-1-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Liniendiagramm (linear) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe.....	127
Abbildung 48: Agonistentitration der LAMP-1-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Liniendiagramm (linear) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe	127
Abbildung 49: Agonistentitration der CD62P-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient 6 mit δ -SPD sowie +0,375 μ M ADP. Liniendiagramm (logarithmisch) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe.....	128
Abbildung 50: Agonistentitration der CD62P-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient 6 mit δ -SPD sowie +0,375 μ M ADP. Liniendiagramm (logarithmisch) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe.....	128
Abbildung 51: Agonistentitration der ADP-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0, 0,125, 0,25 und 0,75 μ M ADP bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe.....	129
Abbildung 52: Agonistentitration der Epinephrin-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0, 1, 5, 10 und 20 μ M Epinephrin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe.....	129
Abbildung 53: Agonistentitration der Convulxin-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe.....	130
Abbildung 54: Agonistentitration der Thrombin-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe.....	130
Abbildung 55: Basalwerte der Mepacrineaufnahme. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe	132
Abbildung 56: Mepacrinefreisetzung nach Zugabe von 5 (A) und 20 (B) ng/ml Convulxin. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe	133

Abbildung 57: Mepacrinefreisetzung nach Zugabe von 0,1 (A) und 0,2 (B) U/ml Thrombin. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe	134
Abbildung 58: Basalwerte der Mepacrineaufnahme (A) und -freisetzung nach Zugabe von 20 ng/ml Convulxin (B) bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe	136
Abbildung 59: Agonistentitration der Mepacrineaufnahme und -freisetzung nach Zugabe von 0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Liniendiagramm (linear) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe	137
Abbildung 60: Basalwerte der Mepacrineaufnahme (A) und -freisetzung nach Zugabe von 0,2 U/ml Thrombin (B) bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe	138
Abbildung 61: Agonistentitration der Mepacrineaufnahme und -freisetzung nach Zugabe von 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Liniendiagramm (linear) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe	139
Abbildung 62: Agonistentitration der Mepacrineaufnahme und -freisetzung nach Zugabe von 0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe	140
Abbildung 63: Agonistentitration der Mepacrineaufnahme und -freisetzung nach Zugabe von 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe	140
Abbildung 64: Agonistentitration der Mepacrineaufnahme und -freisetzung nach Zugabe von 0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe	141
Abbildung 65: Agonistentitration der Mepacrineaufnahme und -freisetzung nach Zugabe von 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe	141

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Beispiele hereditärer syndromaler Thrombozytopathien.....	36
Tabelle 2: Beispiele hereditärer nicht-syndromaler Thrombozytopathien	37
Tabelle 3: Beispiele für Erkrankungen, die mit Thrombozytopenien assoziiert sind.....	41
Tabelle 4: Beispiele plasmatischer Gerinnungsstörungen.....	42
Tabelle 5: Klassifikation des von-Willebrand-Syndroms.....	43
Tabelle 6: Beispiele vaskulärer hämorrhagischer Diathesen.....	44
Tabelle 7: Blutgerinnungsscreening bei Verdacht auf hämorrhagische Diathese	46
Tabelle 8: Diagnosekriterien für das vWS Typ 1	47
Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Geräte	52
Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien.....	52
Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Reagenzien	53
Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Antikörper.....	53
Tabelle 13: In dieser Arbeit verwendete Software-Programme	54
Tabelle 14: Hauptglykoproteine der Thrombozyten mit verwendeten Antikörpern, physiologischen Agonisten, der laborintern bestimmten sowie im Literaturvergleich angenommenen Anzahl an Rezeptor-ABS pro Thrombozyt.....	62
Tabelle 15: Aktivierungsmarker mit verwendeten Agonisten	65
Tabelle 16: Verwendete Konzentrationen der Agonistentitration je Polystyrol-Röhrchen.....	67
Tabelle 17: Patient:innen- und Kontrollproband:innencharakteristika. Angabe der Mittelwerte sowie Minimal- und Maximalwerte bzw. Angabe als absolute und relative Häufigkeiten je Gruppe	71
Tabelle 18: Kleines Blutbild der Patient:innen und Kontrollproband:innen des automatischen Hämatologie-Analysators. Angabe der Mittelwerte sowie Minimal- und Maximalwerte je Gruppe	73
Tabelle 19: Blutgerinnungsscreening der Patient:innen der hämostaseologischen Ambulanz des CTH und der III. Medizinischen Klinik aus dem Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz. Angabe der Mittelwerte sowie Minimal- und Maximalwerte bzw. Angabe als absolute und relative Häufigkeiten je Gruppe.....	75
Tabelle 20: Ausgewählte Charakteristika von Patient:innen mit bestätigter PFD.....	77
Tabelle 21: Ergebnisse von jeweils zwei beispielhaften Untersuchungen des PFA-100 und der LTA nach Born in PRP aus dem Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz der Patient:innen mit bestätigter PFD.....	78
Tabelle 22: Ausschlusskriterien durch das systematische Screening der ambulanten Patient:innen mit hämorrhagischer Diathese der hämostaseologischen Ambulanz des CTH und der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz im Zeitraum September bis November 2018. Angabe als absolute Häufigkeiten	80
Tabelle 23: Prävalenzerhebung von vermutlich hereditären, nicht-syndromalen Thrombozytopathien bei Patient:innen mit hämorrhagischer Diathese unklarer Genese oder mit vWS Typ 1 der hämostaseologischen Ambulanz des CTH und der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz im Zeitraum September bis November 2018. Angabe als absolute bzw. relative Häufigkeiten	80

Tabelle 24: ISTH-BAT „bleeding score“ aller Kontrollproband:innen und Patient:innen und getrennt nach Geschlechtern. Angabe der Mittelwerte (MW) (Normalverteilung) und Mediane (MD) (keine Normalverteilung) (Zutreffendes hervorgehoben) sowie Minimal- und Maximalwert je Gruppe.....	82
Tabelle 25: p-Werte des ISTH-BAT „bleeding score“ im Vergleich zwischen allen Kontrollproband:innen und Patient:innen und getrennt nach Geschlechtern. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig	83
Tabelle 26: Abschnitte des ISTH-BAT aller Kontrollproband:innen und Patient:innen. Angabe der Mittelwerte sowie Minimal- und Maximalwert je Gruppe.....	84
Tabelle 27: Quantifizierung der Rezeptor-ABS der Hauptglykoproteine auf der Thrombozytenoberfläche der Kontrollproband:innen und Patient:innen. Angabe der Mittelwerte (MW) (Normalverteilung) und Mediane (MD) (keine Normalverteilung) (Zutreffendes hervorgehoben) sowie Minimal- und Maximalwert je Gruppe	87
Tabelle 28: p-Werte der Quantifizierung der Rezeptor-ABS der Hauptglykoproteine auf der Thrombozytenoberfläche im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig	88
Tabelle 29: p-Werte der Basalwerte der vWF-Bindung im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig	89
Tabelle 30: p-Werte der Ristocetin-induzierten vWF-Bindung nach Zugabe von 1,0 mg/ml Ristocetin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig	90
Tabelle 31: p-Werte der Basalwerte der Fibrinogenbindung von extern zugesetztem Fibrinogen im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig	92
Tabelle 32: p-Werte der ADP-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0,75 µM ADP im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig	93
Tabelle 33: p-Werte der Epinephrin-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe von 20 µM Epinephrin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig	94
Tabelle 34: p-Werte der Convulxin-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe von 5 und 20 ng/ml Convulxin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig	95
Tabelle 35: p-Werte der Thrombin-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig	96

Tabelle 36: p-Werte der Basalwerte der CD62P-Oberflächen-Expression im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig	97
Tabelle 37: p-Werte der CD62P-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 5 und 20 ng/ml Convulxin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig	98
Tabelle 38: p-Werte der CD62P-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig	99
Tabelle 39: p-Werte der Basalwerte der CD63-Oberflächen-Expression im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig	100
Tabelle 40: p-Werte der CD63-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 5 und 20 ng/ml Convulxin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig	102
Tabelle 41: p-Werte der CD63-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig	103
Tabelle 42: p-Werte der Basalwerte der LAMP-1-Oberflächen-Expression im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig	104
Tabelle 43: p-Werte der LAMP-1-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 5 und 20 ng/ml Convulxin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig	105
Tabelle 44: p-Werte der LAMP-1-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig	107
Tabelle 45: p-Werte der Basalwerte der Fibrinogenbindung von extern zugesetztem Fibrinogen und nach Zugabe von 20 μ M Epinephrin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig	116
Tabelle 46: p-Werte der Basalwerte der CD63-Oberflächen-Expression und nach Zugabe von 20 ng/ml Convulxin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig	122
Tabelle 47: p-Werte der Basalwerte der CD63-Oberflächen-Expression und nach Zugabe von 0,2 U/ml Thrombin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig	124

Tabelle 48: p-Werte der Basalwerte der Mepacrineaufnahme im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). **signifikant auffällig	132
Tabelle 49: p-Werte der Mepacrinefreisetzung nach Zugabe von 5 und 20 ng/ml Convulxin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). **signifikant auffällig	133
Tabelle 50: p-Werte der Mepacrinefreisetzung nach Zugabe von 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). **signifikant auffällig	134
Tabelle 51: p-Werte der Basalwerte der Mepacrineaufnahme und -freisetzung nach Zugabe von 20 ng/ml Convulxin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). **signifikant auffällig	136
Tabelle 52: p-Werte der Basalwerte der Mepacrineaufnahme und -freisetzung nach Zugabe von 0,2 U/ml Thrombin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). **signifikant auffällig	138

1 Einleitung und Zielsetzung

Hereditäre Thrombozytopathien sind eine heterogene Gruppe seltener Erkrankungen, die sich als hämorrhagische Diathesen unterschiedlicher Symptomausprägung präsentieren können. Sie unterscheiden sich bezüglich ihrer Häufigkeit, ihrem Schweregrad, ihrer Thrombozytendysfunktion, -konzentration und -volumen und entstehen durch verschiedene Gendefekte, die in einer veränderten Megakaryopoese, Thrombozytenproduktion und -funktion resultieren können (1-3). Erworbene Thrombozytopathien treten hingegen häufiger auf; sie werden durch bestimmte Medikamente, Nahrungs- und Genussmittel, Nahrungsergänzungstoffe, systemische Erkrankungen (bsp. Urämien, Lebererkrankungen oder myeloproliferative Erkrankungen) oder Operationen hervorgerufen (4, 5). Hereditäre Thrombozytopathien werden in syndromal (assoziiert mit anderen Blutzellveränderungen und/oder Phänotypen) und nicht-syndromal (isolierte Thrombozytenfunktionsstörungen) eingeteilt (6-8). Verschiedene hereditäre, syndromale Thrombozytopathien (wie bsp. das Hermansky-Pudlak-Syndrom) sind gut charakterisiert (8) und ihre Diagnostik ist in Routinelaboren beispielsweise mittels Thrombozytenaggregometrie und gezieltem Panel-basiertem „Next Generation Sequencing“ fest etabliert (9), wohingegen hereditäre, nicht-syndromale Thrombozytopathien (wie isolierte Thrombozytendefekte der Speichergranula oder der Signaltransduktion) und ihre Diagnostik bisher weniger untersucht wurden. Meist gehen sie mit milden bis moderaten Blutungsneigungen einher, es können jedoch auch lebensbedrohliche Blutungen während Operationen oder Traumata auftreten (8, 10, 11), weshalb ihre Diagnostik essentiell für eine adäquate Therapie ist. Die Diagnostik stellt jedoch noch immer eine Herausforderung dar (12) und ist mittels spezialisierter Thrombozyten-Phänotypisierungen und Funktionstests (13, 14) nur in wenigen Zentren möglich. Obwohl sie selten auftreten, wird ihre Prävalenz oft aufgrund der begrenzten diagnostischen Möglichkeiten unterschätzt (12, 15).

Ziel dieser Dissertation ist es, bei Patient:innen mit hämorrhagischer Diathese unklarer Genese mit durchflusszytometrischen Methoden nicht-syndromale, vermutlich hereditäre Thrombozytopathien zu identifizieren, näher zu charakterisieren und die Prävalenz dieser Erkrankungen in der hämostaseologischen Ambulanz des Centrums für Thrombose und Hämostase (CTH) und der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz zu erheben. Da auch bei Patient:innen mit von-Willebrand-Syndrom (vWS) Typ 1, welches mit einer Prävalenz von 1% die häufigste hereditäre Erkrankung der primären Hämostase darstellt (16), die anamnestische Blutungsneigung oft nicht ausreichend erklärt werden kann (17), wurden auch diese Patient:innen in die

Untersuchungen eingeschlossen. Besonders war die Betrachtung von Patient:innen mit gemeinsamem Vorliegen von vWS Typ 1 und hereditären, nicht-syndromalen Thrombozytopathien. Weiterhin wurden die identifizierten Thrombozytopathien unter Berücksichtigung der anamnestischen Beschwerden in der Eigen- und Familienanamnese analysiert sowie einige bisherige diagnostische Methoden näher betrachtet. Mit den Ergebnissen soll die vorliegende Arbeit zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie hereditärer, nicht-syndromaler Thrombozytopathien sowie ihrer Diagnostik und Bedeutung im klinischen Alltag beitragen, um zukünftig adäquatere Therapiemöglichkeiten für betroffene Patient:innen entwickeln zu können.

2 Literaturdiskussion

2.1 Die Hämostase

Der Begriff *Hämostase* kommt aus dem Altgriechischen und leitet sich von den Wörtern *häm-*, einer Bezeichnung für den roten Eisen-(II)-Protoporphyrin-Komplex, der Bestandteil von im Blut vorkommenden Proteinen ist, und *-stase*, übersetzt Stockung, Stauung, Stillstand, ab (18). Sie beschreibt den physiologischen und lebenswichtigen Prozess der Blutgerinnung mit dem Ziel, eine entstandene Blutung zu beenden (18). Neben dem Verschluss des geschädigten Gefäßes sorgt sie dafür, das Fließgleichgewicht des Blutes aufrecht zu erhalten und nach Wiederherstellung der Gefäßintegrität die entstandenen Blutgerinnsel mittels Fibrinolyse zu beseitigen (19). Eingeteilt wird die Hämostase in einen primären Prozess, bei dem es zur Bildung eines Thrombozytenaggregats und zur Vasokonstriktion des betroffenen Gefäßes kommt, und einen sekundären mit dem Ziel, durch Aktivierung plasmatischer Gerinnungsfaktoren den entstandenen Thrombus über Fibrinbrücken zu stabilisieren (20). *In vivo* finden diese Vorgänge jedoch zeitgleich und sich gegenseitig verstärkend statt (19, 21). Eine zentrale Rolle in der Steuerung der Hämostase und der Lokalisation auf den Ort der Verletzung spielen die Thrombozyten (22).

2.1.1 Thrombozyten

Die Bedeutung der Thrombozyten für die Hämostase wurde 1882 von Giulio Bizzozero entdeckt, nachdem sie 1865 von Max Schultze als dritte korpuskuläre Bestandteile des Blutes beschrieben wurden (23, 24). Mit einer Größe von $3,6 \times 0,7 \mu\text{m}$ sind sie die kleinsten menschlichen Blutzellen (25); ihre Konzentration im Blut beträgt zwischen $150\text{-}350 \times 10^9/\text{l}$ (26). Sie sind flache, kernlose Abschnürungen aus dem Zytoplasma von im Knochenmark lokalisierten Megakaryozyten, die täglich etwa 10^{11} Thrombozyten bilden, bei Bedarf bis zu 10-mal mehr (27). Megakaryozyten sind polyploide Riesenzellen, die sich aus myeloischen Stammzellen entwickeln und primär nach Stimulation durch das Hormon Thrombopoietin (TPO) differenzieren (28). Der Abbau der Thrombozyten erfolgt nach etwa 7-10-tägiger Zirkulation im Blut in Milz, Leber und Knochenmark (29).

Thrombozyten spielen eine zentrale Rolle in der Steuerung der Hämostase (22). Des Weiteren sind sie an physiologischen und pathologischen Prozessen wie der Aufrechterhaltung der Gefäßintegrität, Wundheilung, Immunabwehr, Entzündungsprozessen, Modulation von

Angiogenese und Arteriosklerose, Thromboseentstehung, hämatogenem Tumorwachstum und -metastasierung beteiligt (6, 26, 30).

Da Thrombozyten keinen Zellkern besitzen, werden die meisten thrombozyten-spezifischen Organellen und Proteine bereits in den Megakaryozyten angelegt. Dennoch sind sie durch die Ausstattung mit mRNA zur Translation einiger Proteine befähigt (31). Umgeben sind Thrombozyten von einer Lipiddoppelschicht mit verschiedenen integralen Glykoproteinen (GP), die als Rezeptoren für die Interaktion untereinander und mit anderen Zellen dienen (32, 33). Darunter lokalisiert ist das sog. Hyalomer, in dem sich das Zyto- und das Membranskelett, bestehend aus Mikrotubuli und Aktinfilamenten, befinden. Diese dienen der Stabilisierung und Organisation nicht-stimulierter Thrombozyten und ermöglichen nach Aktivierung einen Formwandel („shape change“) mit Ausbildung von zytoplasmatischen Fortsätzen, den Pseudopodien (33). Im Zentrum befindet sich das sog. Granulomer mit den thrombozytenspezifischen Speichergranula, deren Sezernierung eine entscheidende Rolle während der Hämostase spielt (33-35): Werden die Inhaltsstoffe der Granula nach Aktivierung freigesetzt, führt dies über auto- und parakrine Prozesse zu einer Verstärkung der Thrombozytenaktivierung. Die Freisetzung erfolgt über Exozytose, also durch die Fusion der Granula- mit der Plasmamembran. Dadurch gelangen die Inhaltsstoffe ins Blut und ehemals an der Innenseite der Granulamembran lokalisierte Rezeptoren auf die Thrombozytenoberfläche (34). Dort besteht die Möglichkeit, die Rezeptoren diagnostisch zu erfassen und somit über die Degranulation die Aktivierung der Thrombozyten nachzuweisen. Dieses Prinzip fand auch in dieser Arbeit Anwendung (s.u.). Unterschieden werden drei Haupttypen der Granula: die alpha- (α) und delta- (δ) Granula sowie die Lysosomen (35).

Die α -Granula sind mit einer Anzahl von 50-80 Stück pro humanem Thrombozyt (36) sowohl die häufigsten als mit einem Durchmesser von 300-500 nm (34) auch die größten Granula der Thrombozyten. Sie enthalten Adhäsionsproteine wie Fibrinogen, von-Willebrand-Faktor (vWF) und Thrombospondin-1 (TSP-1), Plasmaproteine wie Immunglobulin G (IgG) und Albumin, mitogene Wachstumsfaktoren wie den „platelet-derived growth factor“ (PDGF), Gerinnungsfaktoren wie Faktor V (FV) und Faktor VIII (FVIII) und Proteaseinhibitoren wie α_2 -Makroglobulin und α_2 -Antiplasmin (37, 38). Ihre innere Membran enthält Rezeptoren wie den GPIIb/IIIa-Komplex (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) und CD62P (P-Selektin), welche nach Aktivierung auf die äußere Membran gelangen (38). Die α -Granula enthalten damit gleichzeitig Proteine zur Förderung und Inhibition der Hämostase und leisten einen entscheidenden regulatorischen Beitrag. Des Weiteren spielen sie eine wichtige Rolle bei entzündlichen Prozessen, Wundheilung, Angiogenese und Arterioskleroseentstehung (35, 38). Hergestellt und in den α -Granula gespeichert werden die enthaltenen Proteine überwiegend in den Megakaryozyten;

ein weiterer beschriebener Weg ist die Endo- und Pinozytose von Faktoren wie Fibrinogen und IgG von Megakaryozyten oder zirkulierenden Thrombozyten aus dem Plasma (35, 38).

Die δ -Granula, aufgrund ihrer hohen Elektronendichte auch dichte Granula („dense bodies“) genannt (37), sind mit 3-8 Granula pro humanem Thrombozyt (39) in geringerer Anzahl vorhanden. Sie sind zudem kleiner und in ihrem Lumen herrscht ein saurer pH-Wert von 6,1 (34, 36). In den δ -Granula sind Moleküle mit niedrigem Molekulargewicht gespeichert; sie enthalten Adenosindiphosphat (ADP) und -triphosphat (ATP), Pyrophosphat, Kalzium- (Ca^{2+}) und Magnesium- (Mg^{2+}) Ionen, Serotonin und Histamin (34, 35, 37). In der Membran der δ -Granula wurde das GPIb und der GPIIb/IIIa-Komplex sowie CD63 (Granulophysin) nachgewiesen (40, 41). Auch sie gelangen nach Aktivierung der Thrombozyten wie oben beschrieben auf die äußere Membran. Die δ -Granula lassen sich zudem durchflusszytometrisch durch die Aufnahme und anschließende Sekretion mit dem fluoreszierenden Mepacrine nachweisen (42, 43), was auch in dieser Arbeit verwendet wurde (s.u.).

Die dritte Gruppe der sekretorischen Granula der Thrombozyten sind die Lysosomen. Sie sind in noch geringerer Anzahl vorhanden, 175-250 nm groß und haben eine heterogene Morphologie (44, 45). Sie enthalten saure Glykohydrolasen, Kathepsine und Heparinasen (35, 37). Die lysosomalen Membranproteine („lysosomal associated membrane proteins“ (LAMP)) sind LAMP-1 (46), LAMP-2, was auch in der Membran der δ -Granula nachgewiesen wurde (47), und LAMP-3, was CD63 entspricht und damit ebenfalls in der Membran der δ -Granula vorhanden ist (48).

Viele der enthaltenen Substanzen der thrombozytären Speichergranula sind für die Aktivierung der Thrombozyten während der Hämostase essentiell. Störungen der Synthese oder Sekretion der Granula oder ein Rezeptordefekt von Agonisten oder darüber vermittelter Signaltransduktionen sind mit unterschiedlich starken Blutungsneigungen assoziiert (2, 4). Die Diagnostik einiger dieser Thrombozytopathien ist in Routinelaboren fest verankert (9); andere, vor allem Erkrankungen, die mit milden bis moderaten Blutungsneigungen assoziiert sind, bei denen jedoch lebensbedrohliche Blutungen während Traumata oder chirurgischen Eingriffen auftreten können (8, 10, 35), stellen noch immer eine Herausforderung dar (12, 14). Durch eine gezielte Analyse von Patient:innen mit milden bis moderaten Blutungsneigungen auf bestimmte Thrombozytopathien hin soll diese Arbeit zu einem besseren Verständnis der Bedeutung dieser Erkrankungen im klinischen Alltag und ihrer Diagnostik beitragen. Dafür ist die Kenntnis der Bedeutung der Thrombozyten während des Prozesses der Hämostase

Voraussetzung für das Verständnis und die Diagnostik resultierender Funktionsstörungen und soll im Folgenden beschrieben werden.

2.1.2 Primäre Hämostase

Der erste Prozess der Stillung einer Blutung nach Gefäßverletzung wird als *primäre Hämostase* bezeichnet. Dies geschieht durch Adhäsion, Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten sowie der Vasokonstriktion des betroffenen Gefäßes (22).

2.1.2.1 Thrombozytenadhäsion

Kommt es zur Verletzung einer Gefäßwand, werden subendotheliale Strukturen freigelegt und kommen mit dem Blut in Kontakt. Dabei sind Thrombozyten die ersten Zellen, die an der geschädigten Gefäßwand binden, um das Gefäß abzudichten (22). Die Adhäsion geschieht über spezifische Rezeptoren an die subendothelialen Matrixproteine vWF, TSP-1 und Kollagen (26). Die Art der Bindung hängt dabei von den lokalen Blutströmungsverhältnissen ab: In arteriellen Gefäßen unter hohem Scherstress müssen die Thrombozyten zunächst abgebremst werden (26); dies geschieht über die Interaktion des thrombozytären GPIb mit dem vWF (49) und TSP-1 (50). Der vWF kommt sowohl an der subendothelialen Matrix, wo er mit Kollagen assoziiert ist und somit den Thrombozyten multiple benachbarte Bindungsstellen bietet, als auch als lösliches Plasmaprotein vor (22). Erst wiederholter Kontakt und die Quervernetzung durch vWF-Multimere führt zur festeren Verankerung der Thrombozyten und ermöglicht die Bildung und Aktivierung des GPIb/V/IX-Komplexes (22, 25) sowie die Bindung an Rezeptoren mit geringer Bindungsrate wie dem Kollagen-bindenden GPVI (26). Herrschen im verletzten Gefäß niedrigere Scherkräfte, wie beispielsweise in venösen Gefäßen, erfolgt die Thrombozytenadhäsion und -aktivierung auch direkt über die Bindung des GPVI oder des GPIa/IIa-Komplexes (Integrin $\alpha_2\beta_1$) an Kollagen (25, 26).

2.1.2.2 Thrombozytenaktivierung

Durch die Adhäsion an die spezifischen Rezeptoren kommt es zur Aktivierung der Thrombozyten, was zunächst überwiegend durch die Bindung des GPVI an Kollagen erfolgt (25, 51). Über „outside-in“-Signalkaskaden in die Zelle hinein über Phosphorylierung des sog. „immune tyrosine based activation motifs“ (ITAM) (22, 52) und folgenden und anschließenden „inside-out“-Signalkaskaden aus der Zelle heraus kommt es zur Aktivierung weiterer, in der

Thrombozytenmembran lokalisierter Rezeptoren wie dem Fibrinogen- und vWF-bindenden GPIIb/IIIa-Komplex, der eine aktivierende Konformationsänderungen erhält (25, 26).

Die Aktivierung der Thrombozyten führt zur Sekretion der Speichergranula durch Exozytose, wodurch die enthaltenen Substanzen (37) ins Blut gelangen. Dort wirken sie auto- und parastimulatorisch, wodurch es zu einer Verstärkung der initialen Aktivierung sowie der Aktivierung weiterer Thrombozyten kommt (25).

Auch bewirkt die Aktivierung einen Formwandel („shape change“) der Thrombozyten durch Ausbildung von Pseudopodien. Diese Zytoplasmaausläufer dienen der Oberflächenvergrößerung und erleichtern die Vernetzung mit anderen Thrombozyten (33).

Neben der Freisetzung der Granula sind Thrombozyten in der Lage, kleine zytoplasmahaltige Membranpartikel, die sogenannten „Mikropartikel“, abzuschneiden (26). Dies geschieht unter anderem bei sehr starker Aktivierung durch Kollagen plus Thrombin (22). Die Mikropartikel wirken durch Vergrößerung der Thrombozytenoberfläche sowie über in der Membran enthaltene Substanzen wie beispielsweise dem Gewebefaktor („Tissue Faktor“ (TF)), einem wichtigen Initiator der sekundären Hämostase, sehr prokoagulatorisch (22).

2.1.2.3 Thrombozytenaktivierung durch lösliche Agonisten

Sind die Thrombozyten aktiviert, kommt es durch Exozytose der thrombozytären Speichergranula zu einem Verstärkungsmechanismus der Aktivierung. Die ausgeschütteten Substanzen stimulieren die Thrombozyten über spezifische Rezeptoren, wobei es „starke“ Agonisten wie Thrombin und „schwache“ wie ADP, Adrenalin, Serotonin und Thromboxan A₂ (TxA₂) gibt (33).

Viele lösliche Agonisten wie ADP, Adrenalin, Serotonin, Thrombin und TxA₂ stimulieren die Thrombozyten über guaninnukleotidbindende-Protein- (G-Protein) gekoppelte Rezeptoren (4, 53). Diese heterotrimeren Rezeptoren werden nach der Familienzugehörigkeit ihrer α -Untereinheit eingeteilt, wozu die G_i-, G_q-, G_s- und G_{12/13}-gekoppelten Proteine gehören (54). Andere Agonisten wie Immunglobulinkomplexe, Kollagen und vWF stimulieren über Rezeptorquervernetzung, „Clustering“ und tyrosinkinasevermittelte Proteinphosphorylierungen (55).

Die löslichen Agonisten werden rasch metabolisiert, um die Wirkung lokal zu regulieren und schnell beenden zu können (56). Im Folgenden werden die in dieser Arbeit bedeutenden löslichen Agonisten sowie einige weitere vorgestellt.

2.1.2.3.1 ADP

ADP, bestehend aus dem Nucleosid Adenosin und zwei veresterten Phosphorsäuren, entsteht unter energieübertragender Abspaltung einer Phosphatgruppe aus ATP (57). 50% des ADPs der Thrombozyten wird in den δ -Granula gespeichert, weshalb diese auch als "Speicherpool" für ADP bezeichnet werden (25). ADP wird bei Aktivierung der Thrombozyten freigesetzt und wirkt auto- und parakrin an den G-Protein-gekoppelten Purinrezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₂ (52, 56, 58, 59). Es spielt vor allem eine wichtige Rolle beim Rückkopplungsmechanismus der Verstärkung der Thrombozytenaktivierung durch andere Agonisten (56).

Der P2Y₁-Rezeptor ist G_q-Protein-gekoppelt und führt über die Aktivierung der Phospholipase C β zur Bildung der „second messenger“ Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃), die unter anderem zu einem intrazellulären Anstieg von Ca²⁺-Ionen führen, welche durch Aktivierung der Myosin-Leichtketten-Kinase mitverantwortlich für den Formwandel der Thrombozyten sind. Des Weiteren unterstützt die Aktivierung des Rezeptors die TxA₂-Synthese und fördert eine schnelle, aber reversible Aggregation (52, 60).

Der P2Y₁₂-Rezeptor ist G_i-Protein-gekoppelt und inhibiert den Signalweg der Adenylatzyklase (59), die im aktivierten Zustand die Bildung des second messengers cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) aus ATP fördert, welches die Proteinkinase A aktiviert, die unter anderem für die Regulation von Schlüsselenzymen sowie der Transkription einiger Gene zuständig ist (54). Des Weiteren sorgt ein hoher cAMP-Spiegel für die Inhibition einiger an der Thrombozytenaktivierung beteiligter Proteine, die bei Aktivierung des G_i-Proteins durch den Wegfall der Inhibition durch einen niedrigen cAMP-Spiegel aktiviert werden (56). Diese bewirken eine Verstärkung der Granulasekretion sowie eine irreversible Aggregation (61). Abgebaut wird ADP durch die endotheliale Ekto-ADPase CD39 zu AMP, wodurch die Wirkung zeitlich limitiert ist (62).

2.1.2.3.2 Adrenalin

Adrenalin ist ein in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks gebildetes Hormon, was zur Gruppe der Katecholamine gehört. Des Weiteren kommt es als Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (ZNS) vor (63). Es wird aus Tyrosin gebildet und ist neben seiner zentralen Funktion der Aktivitätssteigerung des Herz-Kreislauf-Systems und raschen Mobilisierung von Energiereserven (63) auch an der Blutgerinnung beteiligt (64). Adrenalin aktiviert die Thrombozyten über α_2 -adrenerge Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche, welche G_i-Protein-gekoppelt (s.o.) sind und eine Hemmung der Adenylatzyklase und damit der

Thrombozytenaktivierung sowie eine Verstärkung der Wirkung durch andere Agonisten bewirken (33, 64, 65). Dabei wirkt Adrenalin synergistisch mit Arachidonsäure (66). Ist der Adrenalin Spiegel beispielsweise aufgrund von Stress oder Nikotinzufuhr erhöht, kann es zu einer pathologisch gesteigerten Thrombozytenaktivierung kommen (64).

2.1.2.3.3 Serotonin

Serotonin ist ein biogenes Amin, das aus Tryptophan synthetisiert wird und als Neurotransmitter im ZNS und als Hormon in der Darmmukosa und in Thrombozyten vorkommt (67). In die Thrombozyten wird es aktiv aus dem Plasma über den SERT-Transporter aufgenommen und in den δ -Granula gespeichert (37). Serotonin wirkt stark vasokonstriktorisch und verstärkt über die Bindung am G_q -Protein-gekoppelten (s.o.) $5HT_{2A}$ -Rezeptor die Thrombozytenaktivierung (25). Es fördert über freigesetzte Ca^{2+} -Ionen den Formwandel und die Freisetzung der α -Granula, was zu einem positiven Rückkopplungsmechanismus beiträgt (67).

2.1.2.3.4 Thrombin

Thrombin, auch als aktivierter Gerinnungsfaktor II (FIIa) bezeichnet, ist einer der stärksten Agonisten der Thrombozytenaktivierung und essentiell für die Bildung eines stabilen Thrombus (68). Es ist eine Serinprotease, dessen inaktive Vorstufe Prothrombin (FII) in der Leber synthetisiert und während der Hämostase an der Membran aktivierter Thrombozyten durch den Prothrombinasekomplex, bestehend aus FVa, FXa, Ca^{2+} und Phospholipiden, zu Thrombin gespalten wird (69). Die zentrale Aufgabe vom Thrombin besteht in der Spaltung von Fibrinogen (FI) zu Fibrin (FIa), was die Bildung eines stabilen Thrombozytenaggregats und damit den sicheren Wundverschluss während der sekundären Hämostase (s.u.) ermöglicht (69). Zugleich spielt es eine wichtige Rolle in der Thrombozytenaktivierung, was in erster Linie über Protease-aktivierende Rezeptoren (PAR) und den GPIb/V/IX-Komplex erfolgt (56). Von den PAR bindet Thrombin vorwiegend an PAR1 und PAR4, welche G_q - (s.o.) und $G_{12/13}$ -Protein gekoppelt sind (52). Der $G_{12/13}$ -Protein-gekoppelte Rezeptor bewirkt über die Aktivierung des Proteins Rho und der Rho-Kinase die Inaktivierung der Myosin-Leichtketten-Phosphatase (54) und fördert so ebenfalls den Formwandel und die Granulafreisetzung der Thrombozyten (56). Außerdem ist Thrombin an weiteren physiologischen Prozessen wie der Wundheilung, aber auch an pathologischen wie Entzündung, Sepsis und Tumorausbreitung, beteiligt (68).

Bei all diesen Prozessen reguliert Thrombin seine eigene Bildung über die Aktivierung von Protein C durch Komplexbildung mit Thrombomodulin auf der Oberfläche von Endothelzellen, wodurch FV und FVIII inhibiert und somit eine überschießende Hämostase vermieden wird (68). Der physiologische Inhibitor Antithrombin mindert ebenfalls die koagulatorischen Eigenschaften von Thrombin. Dieser wird auch pharmakologisch genutzt; beispielsweise verstärkt das Antikoagulans Heparin die Wirkung von Antithrombin um ein Vielfaches (70).

2.1.2.3.5 Thromboxan A₂

Thromboxan A₂ (TxA₂) wird enzymatisch von der thrombozyteneigenen Cyclooxygenase 1 (COX-1) aus Arachidonsäure hergestellt (53). Die vierfach ungesättigte Fettsäure Arachidonsäure ist Teil vieler biologischer Membranen und trägt zu Fluidität bei; des Weiteren ist sie Bestandteil von bestimmten Ionenkanälen, Rezeptoren und Enzymen. Bei Aktivierung der Thrombozyten wird sie aus der inneren Thrombozytenmembran freigesetzt und TxA₂ gebildet (52, 71). TxA₂ bindet über den TxA₂-Rezeptor (TP), welcher G_q- und G_{12/13}-Proteingekoppelt (s.o.) ist und führt so zur Thrombozytenaktivierung (56) und spielt eine wichtige Rolle beim Rückkopplungsmechanismus und Formwandel, wobei die Wirkung aufgrund der kurzen Halbwertszeit lokal begrenzt ist (52, 53). Pharmakologisch kann die COX-1 durch nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs) wie Acetylsalicylsäure (ASS) irreversibel blockiert werden, was zu einer effektiven Inhibition der Thrombozytenaktivierung führt (52, 70).

2.1.2.4 Thrombozytenaggregation

Die durch die Aktivierung der Thrombozyten ausgelösten Signalkaskaden führen zu einer aktivierenden Konformationsänderung insbesondere des in der Thrombozytenmembran enthaltenen GPIIb/IIIa-Komplexes, der bereits auf nicht-aktivierten Thrombozyten 50% der Oberfläche einnimmt (22). Aktiviert ist er in der Lage, lösliches Fibrinogen aus dem Plasma zu binden, was den Thrombozyten die Quervernetzung untereinander ermöglicht (25). Unter hohem Scherstress ist der GPIIb/IIIa-Komplex auch in der Lage, vWF zu binden, nachdem er durch vorherige Bindung von vWF über das GPIb aktiviert wurde (22). Die Vernetzung der Thrombozyten führt zur Bildung eines Thrombozytenaggregats (25), auch „Abscheidungsthrombus“ oder „weißer Thrombus“ genannt (72). Das Thrombozytenaggregat nimmt rasch an Größe zu, da auch nicht-aktivierte Thrombozyten in der Lage sind, rezeptorgebundenen Fibrinogen auf der Membran aktivierter Thrombozyten zu erkennen und sich anlagern (73). Somit kommt es zu einer ersten Abdichtung des verletzten Gefäßes und zur Stillung der Blutung (33).

2.1.3 Sekundäre Hämostase

Ziel der sekundären Hämostase, auch als plasmatische Hämostase bezeichnet, ist es, die entstandenen Thrombozytenaggregate zu stabilisieren und die Wunde sicher zu verschließen. Dies geschieht über Fibrinpolymerisation (72).

Es gibt verschiedene Modelle, die den Ablauf der sekundären Hämostase beschreiben. Bis heute bekannt ist das 1964 von Davie und Ratnoff sowie von Macfarlane entwickelte Modell, das die Aktivierung der Gerinnungsenzyme in einem kaskadenartigen Prozess aufzeigt. Dabei werden zwei getrennt ablaufende Systeme, das intrinsische und das extrinsische, mit gemeinsamer Endstrecke dargelegt (74, 75). Aktueller ist das 2001 von Hoffman und Monroe beschriebene Modell, welches einen zellbasierten Prozess mit großer Bedeutung der spezifischen zellulären Rezeptoren darstellt und nicht mehr in zwei getrennt ablaufende Prozesse, sondern in drei überlappende Phasen einteilt: Initiation, Amplifikation und Propagation (21, 76).

Alle Modelle beschreiben die Aktivierung der 13 Gerinnungsenzyme, deren Aktivierung gegenseitig sowie durch lösliche oder zelluläre, verstärkende oder inhibitorische Faktoren beeinflusst wird. Viele der Gerinnungsfaktoren sind Serinproteasen oder Serinprotease-Cofaktoren, einige werden Vitamin-K-abhängig in der Leber synthetisiert (77). Für ihre Aktivierung müssen sie aus ihrer inaktiven Form, auch Proenzym oder Zymogen genannt, in ihre aktive Form (Kennzeichnung mit einem „a“ am Ende) überführt werden, was häufig durch proteolytische Spaltung geschieht (77). Kontrolliert wird dieser Prozess zellulär über Menge und Geschwindigkeit der Thrombingenerierung (21).

2.1.3.1 Initiation

Die Initiation startet, wenn nach Verletzung eines Gefäßes und damit Unterbrechung der Integrität der Endothelschicht Gewebefaktor- („tissue factor“ (TF)) exprimierende, subendotheliale Zellen wie Fibroblasten oder glatte Muskelzellen freiliegen und mit dem Blutfluss in Kontakt kommen (19, 21). Im Rahmen von inflammatorischen Prozessen kann der TF auch von Endothelzellen oder anderen im Blut befindlichen Zellen wie Monozyten exprimiert werden, weswegen entzündliche Reaktionen den Gerinnungsprozess ebenfalls initiieren können (78). TF bindet an den sich im Blutplasma befindlichen FVII und aktiviert ihn zu FVIIa. Der TF/FVIIa-Komplex aktiviert durch proteolytische Spaltung FIX und FX. FXa bildet Ca²⁺-abhängig zusammen mit FVa den sogenannten Prothrombinasekomplex, der

proteolytisch Prothrombin (FII) zu Thrombin (FIIa) spaltet und damit erste kleine Mengen des zentralen Gerinnungsenzyms bereitstellt (21). Die Thrombinbildung geschieht auf der Oberfläche TF-exprimierender Zellen sowie auf der Thrombozytenoberfläche, deren Adhäsion und Aktivierung zeitgleich am verletzten Gefäß stattfindet (21). Die Oberfläche bietet aufgrund der Expression negativ geladener Phospholipide wie Phosphatidylserin sowie dem Schutz vor Inhibitoren der Hämostase wie dem Gewebefaktor-Inhibitor („tissue factor pathway inhibitor“ (TFPI)) und Antithrombin aus dem Plasma optimale Gegebenheiten für die Thrombingenerierung (13, 19). Die Inhibitoren sorgen dafür, dass sich lösendes Thrombin abgebaut wird und somit die Gerinnung auf den Ort der Schädigung lokalisiert bleibt (21).

2.1.3.2 Amplifikation

Das in kleinen Mengen entstandene Thrombin reicht noch nicht aus, um genügend Fibrin für die Bildung eines stabilen Fibringerinsels zu bilden (22). Es hat aber verschiedene Aufgaben, von denen die Aktivierung der Thrombozyten eine der wichtigsten ist (21). Die Thrombozyten adhären bereits an der verletzten Gefäßwand und sind zum Teil aktiviert; als starker Agonist sorgt Thrombin für eine deutliche Verstärkung dieser Aktivierung (s.o.) (79). Des Weiteren fördert Thrombin die Aktivierung von FV, FVIII und FXI (21).

2.1.3.3 Propagation

Die Propagation findet aufgrund der optimalen Gelegenheiten auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten statt (19, 21). FXIa fördert die Aktivierung von FIX, der zusammen mit FVIIIa den sogenannten Tenasekomplex bildet. Dieser aktiviert FX, der zusammen mit FVa den Prothrombinasekomplex bildet, was zu einer positiven Rückkopplung und damit zur Verstärkung der Bildung führt (21). Über den Prothrombinasekomplex kommt es anschließend zu einer massiven Thrombingenerierung, die auch als „thrombin burst“ bezeichnet wird (22).

Thrombin ist das zentrale Gerinnungsenzym und spaltet das im Thrombozytenaggregat bindende Fibrinogen (FI) in Fibrin (FIa). Der ebenfalls durch Thrombin aktivierte FXIII sorgt für eine Quervernetzung zwischen den Fibrinmonomeren, die polymerisieren und ein Netz bilden. Dadurch entsteht ein stabiler Thrombus, der die Wunde sicher verschließt (19, 72).

Am sich anschließenden Prozess der Wundheilung, Gewebereparatur und Wiederherstellung der Gefäßintegrität spielen die Thrombozyten ebenfalls eine entscheidende Rolle (13).

2.1.4 Inhibitoren der Hämostase

Um eine überschießende Hämostase zu vermindern, deren unkontrollierte Aktivität letal wäre, gibt es physiologische Inhibitoren (33). Einer der wichtigsten Inhibitoren ist das in der Leber synthetisierte Antithrombin, das Thrombin sowie die Gerinnungsfaktoren FXa, FXIa und FXIIa durch Komplexbildung inaktiviert (72). Ein weiterer Inhibitor ist der sog. Aktivierter Protein C-Komplex, der aus aktiviertem Protein C und Protein S, die ebenfalls Vitamin-K-abhängig in der Leber gebildet werden, besteht. Er inaktiviert FVa und FVIIIa, wodurch es zur verminderten Thrombinbildung kommt (72). Auch der Gewebefaktor-Inhibitor TFPI, der die Interaktion des TF/FVIIa-Komplexes und FXa und damit die Bildung des Prothrombinasekomplexes verhindert, ist ein wichtiger Inhibitor der Hämostase (33).

Bei einem Mangel dieser sowie weiterer inhibitorischer Substanzen besteht ein erhöhtes Thromboserisiko (72).

2.1.5 Fibrinolyse

Um neben der Aktivierung von Inhibitoren der Hämostase der überschießenden Bildung von Thromben im Gefäßsystem entgegenzuwirken und den kompletten Verschluss eines verletzten Gefäßes zu verhindern, erfolgt parallel die Fibrinolyse, die zu einer Spaltung und dem Abbau von Fibrin führt (32). Hämostase und Fibrinolyse befinden sich normalerweise im Gleichgewicht; das Ausmaß eines Systems wird von den Aktivatoren bzw. Inhibitoren bestimmt (72). Die Fibrinolyse erfolgt durch Plasmin, welches aus Plasminogen entsteht, dessen Aktivierung durch FXIIa, hochmolekularem Kininogen und Kallikrein erfolgt (20). Auch Urokinase („urinary-type plasminogen activator“ (u-PA)) und Gewebe-Plasminogen-Aktivator („tissue-type plasminogen activator“ (t-PA)) ermöglichen durch die Spaltung von Plasminogen die Aktivierung der Fibrinolyse (20, 72). Die durch den Abbau von Fibrin entstehenden Spaltprodukte, D-Dimeren genannt, sind bei venösen Thromboembolien teilweise diagnostisch nachweisbar (32).

Zur erfolgreichen Gerinnselbildung während der Hämostase und um die Auflösung der Fibringerinnsel vor Heilung der Gefäßwand zu verhindern, gibt es Inhibitoren der Fibrinolyse. So kann beispielsweise lösliches, im Plasma vorkommendes α_2 -Antiplasmin freies Plasmin binden und dadurch inaktivieren. Auch die Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (PAI) 1 und 2 sind in der Lage, t-PA und u-PA zu inhibieren, indem sie die Umwandlung von Plasminogen zu Plasmin verhindern (33).

2.2 Hämorrhagische Diathesen

2.2.1 Definition, Ätiologie, Epidemiologie

Hämorrhagische Diathesen sind pathologische Blutungsneigungen mit zu langen oder zu starken Blutungen oder Blutungen ohne adäquaten Anlass (72). Unterschieden wird nach ihrer Ätiologie in thrombozytäre (ca. 70%), plasmatische (ca. 20%) und vaskuläre (ca. 10%) Störungen, von denen ein Großteil erworbene Störungen, vorwiegend Thrombozytopathien durch Thrombozytenaggregationshemmer, sind (72). Das von-Willebrand-Syndrom stellt die häufigste hereditäre hämorrhagische Diathese dar (16, 80, 81).

2.2.2 Symptomatik

Je nach Ätiologie sind bei hämorrhagischen Diathesen verschiedene Blutungstypen vorzufinden (20, 72, 82): Bei thrombozytären Erkrankungen finden sich überwiegend Haut- und Schleimhautblutungen in Form von kleinflächigen Blutungen wie Petechien, Purpura, Ekchymosen, Hämatomen, Epistaxis, Zahnfleischblutungen und Menorrhagie. Plasmatische Gerinnungsstörungen äußern sich in großflächigen, meist scharf begrenzten Blutungen wie Sugillationen und Suffusionen, Hämatomen, Einblutungen in Gelenke (Hämarthros) und Muskulatur. Bei vaskulär bedingten Erkrankungen finden sich vorwiegend Petechien und Purpura. Des Weiteren gibt es gemischte Formen bei kombinierten hämorrhagischen Diathesen.

2.2.3 Klassifikation

Eingeteilt werden hämorrhagische Diathesen nach ihrer Ätiologie in thrombozytäre, plasmatische und vaskuläre Gerinnungsstörungen, wobei die Thrombozytenstörungen weiter in Thrombozytopathien und -penien unterteilt werden (83). Des Weiteren gibt es kombinierte Formen. Die Gerinnungsstörungen können hereditär oder erworben sein; erworbene Blutungsneigungen entstehen beispielsweise durch bestimmte Medikamente, Vitamin-K-Mangel, Lebererkrankungen oder -transplantation, Urämie, Autoimmun-, maligne oder kardiovaskuläre Erkrankungen (5, 82, 84).

2.2.3.1 Thrombozytopathien

Thrombozytopathien sind hereditäre oder erworbene Störungen der Thrombozytenfunktion mit Blutungen unterschiedlicher Symptomausprägung und verschiedenen Schweregrades (4, 8, 72). Erworbene Thrombozytopathien treten deutlich häufiger auf; hervorgerufen werden sie durch bestimmte Medikamente (z.B. Thrombozytenaggregationshemmer (ASS, Clopidogrel etc.) oder COX-Inhibitoren (nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs) wie Ibuprofen, Diclofenac etc.)), Nahrungs- und Genussmittel, Nahrungsergänzungstoffe, systemische Erkrankungen (z.B. Urämien, Lebererkrankungen, myeloproliferative Erkrankungen) oder Operationen (4, 5, 84).

Hereditäre Thrombozytopathien hingegen sind eine heterogene Gruppe von seltenen Erkrankungen bezüglich ihrer Häufigkeit, ihrem Schweregrad, ihrer Thrombozytendysfunktion sowie ihrer Thrombozytenkonzentration und -volumen. Sie entstehen durch verschiedene Gendefekte, die in einer veränderten Megakaryopoese, Thrombozytenproduktion und -funktion resultieren (1-3) Unterschieden werden Adhäsions-, Fibrinogenbindungs-, Granulasekretions-, Signaltransduktionsstörungen und Störungen der prokoagulant Aktivität der Thrombozyten (4). Eingeteilt werden sie in syndromale (assoziiert mit anderen Blutzellveränderungen und/oder Phänotypen) und nicht-syndromale (isolierte Thrombozytenfunktionsstörungen) Thrombozytopathien (7, 8).

Tabelle 1: Beispiele hereditärer syndromaler Thrombozytopathien

Erkrankung (Auswahl)	Funktionsstörung
Cediak-Higashi-Syndrom (85)	Mutation im LYST-Gen, Ausbildung riesiger Lysosomen, okulokutaner Albinismus, Immundefizienz, silbrig-blondes Haar, Hepatosplenomegalie, Ganglion-Hypertrophie
Hermansky-Pudlak-Syndrom (8, 9, 86)	Mutation im BLOC-Gen mit Fehlfunktion/ Sekretionsdefekt von Vesikeln wie den δ -Granula, okulokutaner Albinismus, Lungenfibrose
Wiskott-Aldrich-Syndrom (7, 8)	Mutation im WAS-Gen, eingeschränkte Aktinpolymerisation, Thrombozytopenie, Infektionen, Ekzeme

Tabelle 2: Beispiele hereditärer nicht-syndromaler Thrombozytopathien

Erkrankung (Auswahl)	Funktionsstörung
ADP-Rezeptordefekt (3, 59, 87, 88)	Defekt im P2Y ₁₂ -Rezeptor
Adrenalin-Rezeptordefekt (89)	Defekt im α_2 -adrenergen Rezeptor
Bernard-Soulier-Syndrom (8, 9, 83)	Defekt im GPIb/V/IX-Komplex, Ausbildung von Riesenthrombozyten
Kollagen-Rezeptordefekt (4, 87)	Defekt im GPVI- oder GPIa/IIa Rezeptor
May-Hegglin-Syndrom (8, 83)	Mutation im MYH9-Gen (kodiert für Nicht-Muskel-Myosin), fehlerhafte Organisation des Zytoskeletts, Makrothrombozytopenie
Scott-Syndrom (4, 90)	Fehlende Expression von Phosphatidylserin und Mikropartikeln, verminderte Interaktion mit Gerinnungsfaktoren
Storage-Pool-Erkrankungen (α -, δ -, α/δ -SPD) (9, 86, 87)	Mangel oder Sekretionsstörung der thrombozytären Speichergranula und/oder deren Inhalt
Thrombasthenie Morbus Glanzmann- Naegeli (7, 8, 83, 87)	Defekt im GPIIb/IIIa, mangelnde Thrombozytenaggregation und vWF-Adhäsion
TxA ₂ -Rezeptordefekt, TxA ₂ -Signalwegdefekt/ „Aspirin-like-disease“ (3, 4, 87)	Defekt im TxA ₂ - Rezeptor, Störungen im Arachidonsäure-Metabolismus mit verminderter TxA ₂ -Synthese durch COX-1- oder Thromboxan-Synthase-Defekt

Hereditäre, syndromale Thrombozytopathien sind überwiegend gut charakterisierte Erkrankungen (8) und ihre Diagnostik ist in Routinelaboren fest etabliert (9). Hereditäre, nicht-syndromale Thrombozytopathien und ihre Diagnostik sind bisher weniger beschrieben; sie äußern sich klinisch mit einer milden bis moderaten Blutungsneigung mit Hämatomen, Petechien, Schleimhautblutungen, Epistaxis und Menorrhagie. Es kann jedoch zu lebensbedrohlichen Blutungen bei Operationen oder Traumata kommen (8, 10, 11, 34, 86), weshalb ihre Diagnostik essentiell, jedoch noch immer eine Herausforderung und nur in wenigen, spezialisierten Zentren möglich ist (10, 12, 14). Obwohl sie selten auftreten, wird ihre Prävalenz oft aufgrund begrenzter diagnostischer Möglichkeiten unterschätzt (12).

2.2.3.1.1 Adhäsionsstörungen

Nach einer Verletzung sind Thrombozyten die ersten Zellen, die an subendotheliale Matrixproteinen der geschädigten Gefäßwand binden, um das Gefäß abzudichten (22). Beteiligte Rezeptoren sind das GPIb, das die Bindung der Thrombozyten an den vWF und

TSP-1 vermittelt, und die Kollagen-bindenden Rezeptoren GPVI und GPIa/IIa (26, 49, 50). Bei Defekten dieser Rezeptoren kommt es zu Adhäsionsstörungen der Thrombozyten; Erkrankungen sind beispielsweise das Bernard-Soulier-Syndrom, bei dem ein Defekt im GPIb/V/IX-Komplex vorliegt, oder das vWS, welches auch zu den plasmatischen Gerinnungsstörungen gezählt und dort näher beschrieben wird (4, 9).

2.2.3.1.2 Fibrinogenbindungsstörungen

Fibrinogen ermöglicht den Thrombozyten eine Quervernetzung untereinander, die essentiell für die Bildung eines Thrombozytenaggregats ist (25). Die Bindung von Fibrinogen erfolgt über den GPIIb/IIIa-Komplex, der unter hohem Scherstress auch in der Lage ist, den vWF zu binden (22). Ein Defekt dieses Rezeptors, wie er beispielsweise bei der Thrombasthenie Morbus Glanzmann-Naegeli vorliegt, führt folglich zu einer verminderten Thrombozytenaggregation (4, 86).

2.2.3.1.3 Granulasekretionsstörungen

Die Inhaltsstoffe der thrombozytären Speichergranula dienen der Verstärkung der Thrombozytenaktivierung (34, 35). Erkrankungen, bei denen es zu einem Mangel der Granula und/oder deren Inhalt oder ihrer Sekretion kommt, werden Storage-Pool-Erkrankungen („storage pool deficiency“ (SPD)) genannt. Sie treten isoliert oder assoziiert mit Syndromen auf und können normale oder veränderte Thrombozytenkonzentrationen und -volumen aufweisen (7, 8). Es werden α -, δ - sowie kombinierte SPD unterschieden (9).

Bei α -SPD kommt es zu einer Minderung von Proteinen wie Fibrinogen, vWF FV, Fibronectin, Plasminogen und weiteren (91), was folglich zu einer verminderten oder verzögerten Thrombozytenaggregation führt. Ursächlich für die α -SPD ist eine Mutation im „Neurobeachin-like 2“- (*NBEAL-2*) Gen, das ein für den Vesikeltransport relevantes Protein codiert (92). Die Erkrankung wird als „Gray-Platelet-Syndrom“ bezeichnet. Außerdem wurden Defekte in den Transkriptionsfaktorgenen des „growth-factor-independence-1b“ (*GFI1b*) und *GATA1* als ursächlich für die α -SPD beschrieben (93).

δ -SPD führen zu einem Mangel von Serotonin, ADP, ATP, Ca^{2+} -Ionen und Pyrophosphat (91), wodurch es zu einer verminderten Verstärkung der Thrombozytenaktivierung kommt. Sie können isoliert oder in Kombination mit Syndromen wie beispielsweise dem Hermansky-Pudlak-Syndrom oder dem Chediak-Higashi-Syndrom auftreten (94). Aktuell sind nur wenige Gene bekannt, die mit einem isolierten δ -SPD assoziiert sind; zu ihnen gehören *NBEA*, *RUNX1*

und *FLI1* (95). Dies limitiert ihre Diagnostik und macht komplexere Analysen notwendig, die nur in spezialisierten Zentren möglich sind (35). Diese konnten jedoch aufzeigen, dass isolierte δ -SPDs häufiger als erwartet auftreten (35).

Auch eine Kombination von α - und δ -SPDs, denn sog. $\alpha\delta$ -SPDs, ist möglich (9, 96). Sie sind häufig mit der β -Thalassämie oder der erythropoetischen Porphyrrie assoziiert (8).

2.2.3.1.4 Signaltransduktionsstörungen

Die Aktivierung der Thrombozyten erfolgt nach Bindung verschiedener Agonisten über regulierte intrazelluläre Signalkaskaden (25, 52). Störungen der Signaltransduktion führen durch die verminderte Aktivierung der Thrombozyten zu einer reduzierten Thrombozytenaggregation und damit zu verlängerten Blutungszeiten (3, 4, 9, 11). Ursächlich können Rezeptordefekte (beispielsweise der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren), Enzymdefekte, Störungen des TxA_2 -Signalweges oder Zytoskelettdefekte sein.

Beispiele für Defekte der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind der G_i -Protein-gekoppelte α_2 -adrenergen ADP-Rezeptor und der G_q - und $G_{12/13}$ -Protein-gekoppelte TxA_2 -Rezeptor (4, 52). Ursächlich für den Defekt des TxA_2 -Rezeptors ist eine Mutation im Gen *TBXA2R* (3, 11). Störungen der G_q -Protein-gekoppelten Rezeptoren führen über die verminderte Aktivität der GTPase und der Phospholipase $C\beta$ zu einer reduzierten Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen und Arachidonsäure (97); Störungen der G_i -Protein-gekoppelten Rezeptoren durch einen niedrigen cAMP-Spiegel zu einer verminderten Granulasekretion (89).

Ein Defekt der Rezeptoren des Agonisten ADP, insbesondere des G_i -Protein-gekoppelten P2Y_{12} -Rezeptors, führt durch reduzierte Granulasekretion und folglich verminderter Verstärkung der Thrombozytenaktivierung durch andere Agonisten zu verlängerten Blutungszeiten (4, 9, 59, 98). Die Thrombozytenaggregation ist dabei unvollständig und reversibel, jedoch findet ein normaler Formwandel statt (11, 52). Die Wichtigkeit der verstärkenden Rückkopplungsmechanismen verdeutlicht der erfolgreiche therapeutische Einsatz von Inhibitoren des P2Y_{12} -Rezeptors zur Prävention ischämischer Ereignisse durch Thrombozytenaggregate (26, 59); eingesetzt werden die sogenannten ADP-Rezeptorantagonisten wie beispielsweise Clopidogrel, Prasugrel oder Ticagrelor (70). Bei den bisher beschriebenen Defekten des P2Y_{12} -Rezeptors handelt es sich um Mutationen während der Synthese, Veränderungen der Ligandenbindungsstelle oder Störungen der Wiederaufbereitung des Rezeptors (88, 99).

Auch Defekte des Zytoskeletts, wie es beim May-Hegglin-Syndrom beschrieben ist, führen zu Signaltransduktionsstörungen (8).

2.2.3.1.5 Störungen der prokoagulanten Aktivität

Aktivierte Thrombozyten bieten aufgrund der Oberflächenpräsentation von negativ geladenen Phospholipiden wie z.B. Phosphatidylserin optimale Gegebenheiten für die Bindung von Gerinnungsfaktoren während der sekundären Hämostase (100). Auch die Abschnürung von Mikropartikeln trägt zur Verstärkung der prokoagulatorischen Aktivität der Thrombozyten bei (26). Anionische Phospholipide wie z.B. Phosphatidylserin gelangen durch einen Flip-Flop-Mechanismus nach Aktivierung der Thrombozyten von der inneren auf die äußere Plasmamembran; in inaktivem Zustand sorgen ATP-abhängig Flippasen dafür, dass Phosphatidylserin an der inneren Plasmamembran lokalisiert bleibt (101). Nach Aktivierung der Thrombozyten und steigendem intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel werden die Flippasen inaktiviert, so genannte „Scramblasen“ aktiviert und Phosphatidylserin gelangt auf die äußere Plasmamembran (102). Dabei kann sich der Anteil von 2 auf 12% erhöhen (4). Fehlt die Expression von Phosphatidylserin wie beim Scott-Syndrom, kommt es zu Störungen der Bildung von Gerinnungsfaktorkomplexen und dadurch zu einer verminderten Thrombingenerierung (90).

2.2.3.2 Thrombozytopenien

Thrombozytopenien beschreiben das Absinken der Thrombozytenkonzentration auf $<150\,000$ Zellen/ μl (103); ab $<20\,000$ Zellen/ μl besteht ein deutlich erhöhtes Risiko für Spontanblutungen (104). Sie äußern sich typischerweise mit Petechien v.a. an Schleimhäuten, im Gesicht und an abhängenden Körperpartien, aber auch Hämorrhagien anderer Lokalisation, insbesondere gastrointestinal, urogenital und zerebral, sind möglich (83). Die Ursachen für Thrombozytopenien können vielfältig sein (72, 104-106): Durch beispielsweise generalisiertes Knochenmarkversagen, selektiver Megakaryozytendepression oder einer gestörten Megakaryo- oder Thrombopoese aufgrund hereditärer Genmutationen kann es zu Bildungsstörungen kommen; des Weiteren können ein gesteigerter peripherer Umsatz der Thrombozyten, beispielsweise immunologisch bedingt, oder eine abnorme Verteilung wie bei einem Hypersplenismus ursächlich sein. Auch können Verlust- oder Verdünnungsthrombozytopenien, beispielsweise bei Massentrans- oder Masseninfusionen, auftreten; weiterhin gibt es kombinierte Bildungs- und Abbaustörungen. Eingeteilt werden Thrombozytopenien nach ihrer Ursache oder in hereditäre bzw. erworbene und syndromale

bzw. nicht-syndromale Formen (106). Unterschieden werden kann auch, ob es sich um Mikro- bzw. Makrothrombozytopenien handelt und ob gleichzeitig eine Thrombozytopathie vorliegt (105, 106), was das Risiko für schwere Blutungen erhöht (105). Beispiele kombinierter Thrombozytopenien und -pathien sind das Bernard-Soulier-Syndrom, das „Gray-Platelet-Syndrom“, das „Platelet-type-von-Willebrand-Syndrom“ und das Wiskott-Aldrich-Syndrom (105). Im Folgenden sind Beispiele für Erkrankungen dargestellt, die mit Thrombozytopenien einhergehen, eingeteilt nach ihrer Ursache.

Tabelle 3: Beispiele für Erkrankungen, die mit Thrombozytopenien assoziiert sind

Ursache		Erkrankung (Auswahl)
Bildungsstörungen	hereditär (106, 107)	Fanconi Anämie
		„GATA1-related disease“
		„Gray-Platelet-Syndrom“
		May-Hegglin-Syndrom
		Radiusaplasie-Thrombozytopenie-Syndrom
		Wiskott-Aldrich-Syndrom
	erworben (72, 104)	Knochenmarkschädigungen durch Medikamente wie Zytostatika oder strahleninduziert
		Maligne hämatologische Erkrankungen wie Leukämien
Periphere Umsatzsteigerung (70, 72, 83, 104)	Hämolytisch-urämisches Syndrom	
	Heparin-induzierte Thrombozytopenie	
	Idiopathische thrombozytopenische Purpura	
	Neonatale Alloimmunthrombozytopenie	
	Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura	
Abnorme Thrombozytenverteilung (104)	Hypersplenismus	

2.2.3.3 Plasmatische Gerinnungsstörungen

Plasmatische Gerinnungsstörungen, auch Koagulopathien genannt, werden eingeteilt in Defektkoagulopathien, zu denen auch das vWS, die häufigste hereditäre hämorrhagische Diathese (16, 80, 81), gehört, Immunkoagulopathien, Verbrauchskoagulopathien und die Hyperfibrinolyse (72). Sie gehen je nach Ausmaß mit leichten bis hin zu schwersten Blutungen einher. Die häufigste hereditäre plasmatische Gerinnungsstörung mit schwerer Blutungsneigung ist der FVIII-Mangel, auch als Hämophilie A bezeichnet (82, 108). Auch ein Mangel von Fibrinolyse-Inhibitoren kann zu vermehrten Blutungsneigungen führen (109).

Tabelle 4: Beispiele plasmatischer Gerinnungsstörungen

Klassifikation	Erkrankung (Auswahl)
Defektkoagulopathien (72, 83, 104)	Hämophilie A und B
	Mangel an Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren II, VII, IX, X, Protein C, Protein S
	Von-Willebrand-Syndrom
Immunkoagulopathien (72, 83)	Alloantikörperbildung gegen FVIII oder FIX (Hemmkörperhämophilie)
	Autoantikörperbildung gegen Gerinnungsfaktoren bei immunologischen Erkrankungen (z.B. Anti-Phospholipid-Antikörpersyndrom)
Verbrauchskoagulopathien (72, 82, 104)	Disseminierte intravasale Gerinnung
Hyperfibrinolyse (72)	Lokal bei Operationen an Plasminogen-Aktivator-reichen Organen
	Systemisch bei α_2 -Antiplasminmangel oder fibrinolytischer Therapie

2.2.3.3.1 Von-Willebrand-Syndrom

Mit einer Prävalenz von 1% ist das von-Willebrand-Syndrom (vWS), auch von-Willebrand-Jürgens-Syndrom genannt, die häufigste hereditäre hämorrhagische Diathese (16, 80, 81). Es wird anhand eines quantitativen Mangels (Typ 1 und 3) oder einer qualitativen Funktionsminderung (Typ 2) des vWF in drei Typen eingeteilt, wobei der Typ 2 weiter in die Subtypen A, B, M und N unterteilt wird (80, 110). Beim Typ 1 ist eine milde Form („low vWF“) mit unterschiedlicher Ausprägung von Blutungssymptomen beschrieben (111, 112); abgegrenzt werden kann der Typ 1C mit einer erhöhten vWF-Clearance (113, 114), siehe Tabelle 5. Der vWF bewirkt die Bindung der Thrombozyten untereinander und an subendotheliale Strukturen über die Rezeptoren GPIb und GPIIb/IIIa und trägt zur Fibrinbildung bei, in dem er als Trägerprotein den FVIII vor proteasomaler Degradation schützt und so seine Halbwertszeit (HWZ) verlängert (81, 82, 110). Ist dies beeinträchtigt, kommt es zu einer kombinierten Störung der primären und sekundären Hämostase mit verminderter Thrombozytenadhäsion an die geschädigte Gefäßwand, gestörter Thrombozytenaggregation sowie zu einer verminderten Stabilisierung des FVIII, was je nach Ausmaß des vWS zu unterschiedlich schweren Blutungen führt (72). Der vWF ist das größte Glykoprotein im menschlichen Plasma und liegt in unterschiedlich großen Multimeren vor, die aus dimeren Untereinheiten zusammengesetzt sind (81). Er wird von Megakaryozyten und Endothelzellen

synthetisiert und in Thrombozyten in den α -Granula und in Endothelzellen in den Weibel-Palade-Körperchen gespeichert (80, 82). Der vWF wird kontinuierlich ins Blut sezerniert; zusätzlich erfolgt eine aktive Sekretion nach Aktivierung durch Agonisten wie Thrombin und weiteren (81).

Tabelle 5: Klassifikation des von-Willebrand-Syndroms

Typ	Charakteristika	Vererbung	Häufigkeit
Typ 1 (17, 72, 81, 115)	quantitative, milde bis moderate Verminderung des vWF und des FVIII bei gleichbleibendem Verhältnis zwischen vWF-Antigen, vWF-Aktivität und FVIII; strukturell und funktionell normalmolekulare Multimere	autosomal-dominant	ca. 80%
1C (113, 114)	erhöhte vWF-Clearance mit erhöhtem vWF-Propeptid im Vergleich zum vWF-Antigen		
Typ 2 (72, 80, 110, 115)	qualitativer Defekt durch Mutationen des vWF		ca. 20%
2A	Fehlen großmolekularer Multimere, verminderte Thrombozyten-abhängige vWF-Aktivität	autosomal-dominant	
2B	Fehlen großmolekularer Multimere, vermehrte Affinität zum thrombozytären GPIb, oft milde Thrombozytopenie	autosomal-dominant	
2M	normalmolekulare Multimere, verminderte Thrombozyten-abhängige vWF-Aktivität	autosomal-dominant	
2N	normalmolekulare Multimere, Mutation der FVIII-Bindungsstelle mit verminderter Affinität des vWF zum FVIII, verminderter FVIII-Spiegel	autosomal-rezessiv	
Typ 3 (72, 80)	quantitativ nahezu vollständiges Fehlen des vWF und starke Verminderung des FVIII	autosomal-rezessiv	ca. 1%
„Platelet-type-von-Willebrand-Syndrom“ (115-117)	Funktioneller Defekt des GPIb α der Thrombozyten mit übermäßiger Bindung von Thrombozyten und vWF, Verlust hochmolekularer Multimere, Thrombozytopenie		
Erworbenes vWS (72, 81, 115)	verminderter vWF und Verlust hochmolekularer Multimere durch bsp. erhöhte mechanische Kräfte, Adsorption an Tumore oder Autoimmuninhibitorbildung im Rahmen anderer Grunderkrankungen wie der monoklonalen Gammopathie, malignen Lymphome, myeloproliferativer Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen, struktureller Herzerkrankungen oder medikamentös bedingt (z.B. Valproinsäure)		

Klinisch äußert sich das vWS je nach Typ: Milde Formen sind bei Kindern und Männern oft asymptomatisch, Frauen leiden teilweise an Menorrhagien. Diagnostiziert werden diese Patient:innen oft erst nach hämostatischer Provokation wie bei einem Trauma, HNO- oder zahnärztlichen Operationen oder anderen chirurgischen Eingriffen (80). In symptomatischen Fällen kann es zu petechialen Blutungen, generalisierter Hämatomneigung, rezidivierender Epistaxis, Gingivablutungen, verstärkten Blutungen bei bzw. nach chirurgischen Eingriffen oder Verletzungen, schweren oder verlängerten Peripartalblutungen und starken Menorrhagien kommen (17, 80, 81, 112). Bei Patient:innen mit Typ 3 tritt meist zusätzlich ein hämphiler Blutungstyp auf (72).

2.2.3.4 Vaskuläre hämorrhagische Diathesen

Vaskuläre hämorrhagische Diathesen, auch Vaskulopathien genannt, sind Erkrankungen der Blutgefäße; sie entstehen nicht durch Veränderungen des thrombozytären oder plasmatischen Gerinnungssystems (83). Typische Hauteinblutungen sind aufgrund der verminderten Kapillarresistenz Petechien und hämorrhagische Maculae an den distalen Unterschenkelstreckseiten und am Gesäß; selten führen sie zu lebensbedrohlichen Blutungen (72). Eingeteilt werden sie in hereditäre und erworbene Diathesen.

Tabelle 6: Beispiele vaskulärer hämorrhagischer Diathesen

Klassifikation	Erkrankung (Auswahl)
hereditär	Ehlers-Danlos-Syndrom
	Morbus-Osler-Weber-Rendu (hämorrhagische Teleangiektasien)
erworben	Purpura-Schoenlein-Hennoch
	Vitamin-C-Mangel

2.2.4 Diagnostik

Für die diagnostische Erfassung einer hämorrhagischen Diathese erfolgen Anamnese, körperliche Untersuchung sowie mehrfache Blutuntersuchungen (118). Die Wiederholungen sind erforderlich, da einige Proteine wie beispielsweise der vWF oder FVIII „Akut-Phase-Proteine“ sind und damit erheblichen Schwankungen durch entzündliche Prozesse, physische Aktivität, Stress, Schwangerschaft etc. unterliegen. Bereits ihr Normbereich ist variabel (80, 81, 119).

Zur anamnestischen Erfassung einer hämorrhagischen Diathese gehört die Eigen- und die Familienanamnese sowie die Erhebung von Medikamenteneinnahme und Vorerkrankungen (72, 119, 120). Bei der Erfassung der Blutungssymptomatik sollte besonders auf Art und Zeitpunkt (spontan oder verletzungsbedingt) sowie die Lokalisation und das Alter bei Erstmanifestation der Blutung geachtet werden (119). Zur einheitlichen Erfassung der Blutungssymptomatik können verschiedene standardisierte Fragebögen behilflich sein (121). Einer davon ist der „bleeding assessment tool“- (BAT) Fragebogen der „International Society on Thrombosis and Haemostasis“ (ISTH) (122), der auch in dieser Arbeit Anwendung findet und in Kapitel 3.2.2 *Erfassung der Blutungseigenanamnese mit Hilfe des ISTH-BAT* genauer beschrieben wird. Die Fragebögen sollen bei einer umfassenden und standardisierten Erhebung und Auswertung der Blutungssymptomatik unterstützen, mögliches zukünftiges Blutungsrisiko vorhersagen helfen und bei der Einleitung gezielter diagnostischer Maßnahmen und Therapien assistieren sowie nicht erforderliche vermeiden (121).

Die körperliche Untersuchung geschieht durch Inspektion und ggf. Palpation der Hauteinblutungen mit folgender Bestimmung des Blutungstyps (72, 119).

Die Blutgerinnungsuntersuchungen erfolgen aus Citratplasma. Bei einem initialen Laborscreening bei Verdacht auf eine hämorrhagische Diathese werden ein kleines Blutbild, die Parameter der Globalgerinnung sowie der unspezifische Entzündungsparameter C-reaktives Protein (CRP) erhoben. Des Weiteren erfolgt die Testung des FXIII (nicht mit Parametern der Globalgerinnung beurteilbar) und bei Auffälligkeiten der Globalgerinnung ggf. weitere Einzelfaktor-, Hämophilie-, Fibrinolyse- oder weitere Parameterbestimmungen. Besteht der Verdacht auf ein vWS oder auf eine Thrombozytopathie, werden die vWF-Parameter erhoben bzw. globale Thrombozytenfunktionstests durchgeführt (20, 32, 119, 120).

Tabelle 7: Blutgerinnungsscreening bei Verdacht auf hämorrhagische Diathese

Parameter	Beschreibung	Referenzwert (Zentrallabor Mainz Universitätsmedizin)	
Kleines Blutbild	Erythrozytenkonzentration	3,7 – 4,8 /pl	
	Erythrozyten- Indizes	MCH	27 – 33 pg
		MCHC	32 – 35 g/dl
		MCV	83 – 100 fl
	Hämatokrit	34 – 44 %	
	Hämoglobinkonzentration	12 – 16 g/dl	
	Leukozytenkonzentration	3,5 – 10 /nl	
Thrombozytenkonzentration	150 – 360 /nl		
Globalgerinnung	Quick/ Prothrombinzeit/ Thromboplastinzeit	70 – 130 %	
	„International normalized ratio“ (INR)	0,9 – 1,1	
	aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)	25 – 37 s	
	Fibrinogen (abgeleitet)	200 – 390 mg/dl	
	Fibrinogen (nach Clauss)	200 – 390 mg/dl	
Entzündungs- parameter	CRP	<5 mg/dl	
Einzelfaktoren/ ggf. weitere Parameter	FXIII	75 – 155 %	
	ggf. weitere Parameter bei Auffälligkeiten der Globalgerinnung		
vWF-Parameter	vWF-Antigen (vWF:Ag)	42 – 176 %	
	vWF-Aktivität (Ristocetin-Cofaktor-Aktivität (vWF:RCo))	40 – 170 %	
	FVIII-Aktivität (FVIII:C)	50 – 150 %	
	Kollagenbindungstest (vWF:CB)	47 – 193 %	
	vWF-Multimeranalyse	vWF-Multimere	
Globale Thrombozyten- funktionstestungen	PFA-100 Kollagen/ADP	68 – 121 s	
	PFA-100 Kollagen/Epinephrin	84 – 160 s	
	LTA nach Born in PRP	Arachidonsäure (0,5 mg/ml)	>60 %
		ADP (10 µM)	>60 %
		Epinephrin (10 µM)	>60 %
		Kollagen (10 µg/ml)	>60 %
		Ristocetin (0,6 mg/ml)	Keine Angabe
Ristocetin (1,2 mg/ml)	Keine Angabe		

Zur Erfassung des vWS sind weitere diagnostische Schritte notwendig (81, 110); Tabelle 8 fasst die laboranalytische Diagnosekriterien für das vWS Typ 1 zusammen (10, 114, 123-126):

Tabelle 8: Diagnosekriterien für das vWS Typ 1

Parameter	vWS Typ 1
vWF-Antigen (vWF:Ag)	5 - 40 %
Thrombozyten-abhängige vWF-Aktivität (z.B. vWF:RCo oder neuere Assays wie vWF:GPIbM, vWF:GPIbR)	Verminderung proportional zum vWF:Ag
FVIII-Aktivität (FVIII:C)	Verminderung proportional zum vWF:Ag
Thrombozyten-abhängige vWF-Aktivität/vWF-Antigen (z.B. vWF:GPIbM/vWF:Ag)	>0,7
ggf. vWF:Ag/vWF:RCo	<1,5
ggf. Ristocetin-induzierte Thrombozytenaggregation (RIPA)	verlängert
ggf. vWF-Multimere	normal

Neue Empfehlungen der *ASH ISTH NHF WHF* (114) befürworten bei auffälligem initialen vWS-Screening (vermindertes vWF-Antigen und/oder Thrombozyten-abhängige vWF-Aktivität) die Bestätigung der Diagnose mit Erhebung des Quotienten aus Thrombozyten-abhängiger vWF-Aktivität und vWF-Antigen (z.B. vWF:GPIbM/vWF:Ag) ab einem vWF-Level <0,30IU/ml unabhängig von Blutungssymptomen bzw. bereits ab <0,50 IU/ml bei anamnestisch vermehrter Blutungsneigung. Dabei ist nicht mehr erforderlich, die genetisch bedingte, um 20-30% verminderte vWF-Aktivität bei Menschen mit Blutgruppe O (80, 120) zu beachten (114). Bei Verdacht auf ein vWS Typ 1C mit erhöhter vWF-Clearance wird statt des bislang vorrangig verwendeten Quotienten aus vWF-Propeptid und vWF-Antigen (vWFpp/vWF:Ag) ein Desmopressin-Test mit 1- und 4-stündiger Postinfusions-Blutuntersuchung empfohlen (114, 127).

Kann aus den Ergebnissen eine Diagnose abgeleitet werden, wird entsprechend therapiert. Nicht selten kommt es jedoch zu keiner eindeutigen Ursachenfindung und die Patient:innen erhalten die Diagnose „Hämorrhagische Diathese unklarer Genese“ (128) oder bei entsprechenden Befunden „mildes vWS Typ 1“. Dies kann jedoch die anamnestische Blutungsneigung oft nicht ausreichend erklären (17); häufig leiden die Patient:innen an milden bis moderaten Blutungsneigungen, die sich meist in Schleimhautblutungen äußern, bei denen jedoch lebensbedrohliche Blutungen während Operationen oder bei Traumata auftreten

können (120, 128, 129). Daher ist ihre Diagnostik essentiell, stellt aber bis heute eine Herausforderung (12, 120) dar. Auch die Differenzierung zur Allgemeinbevölkerung ist entscheidend, da auch dort häufig von mindestens einem Blutungssymptom berichtet wird (130). Studien haben gezeigt, dass mögliche Ursachen dieser milden bis moderaten Blutungsneigungen Thrombozytopathien sein können (129).

2.2.4.1 Thrombozytenfunktionsdiagnostik

„Derzeit existiert kein Thrombozytenfunktionstest, der die funktionelle Komplexität der Thrombozyten vollständig erfasst“ (118). Es gibt zwar eine Vielzahl von Mess- und Testmethoden, jedoch eignen sich nur einige davon für die klinische Praxis (42) oder sind nur in wenigen, spezialisierten Zentren möglich.

Die Indikation einer Thrombozytenfunktionsdiagnostik ist der Verdacht auf eine Thrombozytopathie. Ein Diagnosealgorithmus wurde 2015 von Paolo Gresele et al. (10) sowie in der aktuellen Leitlinie für Thrombozytopathien der *Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF)* (42) entwickelt: Er beginnt mit der anamnestischen Erhebung der Blutungsneigung, empfohlen wird hierfür der ISTH-BAT. Anschließend soll eine Anamnese der Medikamente, Nahrungs- und Genussmittel und Nahrungsergänzungstoffe (5) sowie die Erfassung von Grund- und Begleiterkrankungen erfolgen. Ausgeschlossen werden müssen andere Ursachen wie plasmatische Gerinnungsstörungen wie Hämophilie A/B, vWS, FXIII-Mangel etc. Besteht danach der Verdacht auf eine Thrombozytopathie, wird ein dreistufiges Vorgehen empfohlen (10). Zuvor sollen Blutbild, Thrombozytenkonzentration, mittleres Thrombozytenvolumen (MPV), Quantifizierung der immaturen Plättchenfraktion (IPF), Thrombozytengrößenverteilungskurve und mikroskopische Beurteilung im Blutausschrieb durchgeführt werden, um Erkrankungen wie May-Hegglin-Syndrom, ITP, TTP, HUS, myelodysplastisches Syndrom, Fanconi Anämie und Pseudothrombozytopenie auszuschließen (42). Anschließend werden spezialisierte Analysen wie Aggregometrie, Durchflusszytometrie, Immunfluoreszenzmikroskopie und Molekulargenetik empfohlen (131), die von Schritt eins zu drei spezifischer werden. Im ersten Schritt wird die Granulafreisetzung sowie ein Screening mittels Lichttransmissionsaggregometrie und Durchflusszytometrie empfohlen, die im zweiten Schritt erweitert werden. Zusätzlich werden im zweiten Schritt der Granulainhalt sowie weitere Verfahren wie die Transmissionselektronenmikroskopie eingesetzt. Im dritten Schritt kommen molekulargenetische Verfahren und biochemische Analysen zum Einsatz (10). Die Funktionsweise dieser sowie einiger weiterer diagnostischer Verfahren soll im Folgenden vorgestellt werden.

Die Thrombozytenaggregometrie nach Born ist aktuell Goldstandard der Thrombozytenfunktionsdiagnostik (52, 132). Das Prinzip der Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) beruht auf der kontinuierlichen Registrierung der zunehmenden Thrombozytenaggregation nach Zugabe von Agonisten zu thrombozytenreichem Plasma („platelet-rich plasma“ (PRP)), was zu einer zunehmenden Lichttransmission führt, die photometrisch gemessen wird (42, 132). Alternativ ist die Impedanzaggregometrie im Vollblut möglich, bei der die Impedanzerhöhung nach Zugabe von Agonisten durch Anlagerung von aggregierten Thrombozyten an die Elektroden gemessen wird (42).

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist die Quantifizierung von markierten Oberflächenrezeptoren und die Beurteilung der Speichergranula vor und nach Aktivierung der Thrombozyten möglich (42). Die Durchflusszytometrie wurde auch in dieser Arbeit verwendet; ihr Funktionsprinzip wird in Kapitel 3.2.6 *Durchflusszytometrie - Allgemeines Versuchsprinzip* näher beschrieben.

Mit der Immunfluoreszenzmikroskopie können charakteristische Fehlverteilungen von Thrombozytenproteinen im Blutausschlag nachgewiesen werden, was sich diagnostisch für einige hereditäre Thrombozytopathien eignet (42, 133).

In der Molekulargenetik werden mit Hilfe des „Next Generation Sequencing“ (NGS) durch Gruppierung von Kandidatengenen (NGS Multi-Gen-Panel) mehrere Gene mit bekannter Funktion in den Thrombozyten simultan untersucht (42, 134).

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Verschlusszeiten ist mit dem Thrombozytenfunktionsanalysator „Platelet Function Analyser“ (PFA) möglich, bei dem *in vitro* eine Simulation der Thrombozytenaktivierung an einer Kollagenmembran mit ADP oder Epinephrin erfolgt und die Zeit bis zum Verschluss einer Membranöffnung durch Gerinselbildung gemessen wird (135).

Weitere spezialisierte Methoden sind die Thrombozyten-abhängige Thrombinbildung mit Hilfe des „Calibrated Automated Thrombography“ (CAT), die Beurteilung der ATP-Freisetzung der Thrombozyten mit Hilfe des Chronologs, die Testung des prokoagulanten Zustandes mit Hilfe des Annexin-V-Assays sowie eine Reihe weiterer Funktionstest (13, 42), die jedoch nur in wenigen Laboren durchgeführt werden. Zur Diagnostik eines Mangels an δ -Granula dient außerdem die Elektronenmikroskopie „whole mount“, mit der die δ -Granula spezifisch identifiziert und quantifiziert werden können (136, 137).

Damit ist die Diagnostik von verschiedenen hereditären, vorwiegend syndromalen Thrombozytopathien (wie beispielsweise der Thrombasthenie Morbus Glanzmann-Naegeli, dem Bernard-Soulier-Syndrom, dem "Gray-Platelet-Syndrom" oder dem Hermansky-Pudlak-Syndrom) gut etabliert und in Routinelaboren vorwiegend mittels LTA und gezieltem Panel-basiertem NGS fest verankert (9). Dennoch ist die Diagnostik von hereditären, nicht-syndromalen Thrombozytopathien (z.B. isolierte Thrombozytendefekte der Speichergranula oder der Signaltransduktion) immer noch eine Herausforderung (12, 14) und nur in wenigen, spezialisierten Zentren möglich. Die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Kerstin Jurk im Centrum für Thrombose und Hämostase (CTH) der Universitätsmedizin Mainz konnte zusammen mit der CTH-NGS-Plattform „Advanced Diagnostics“ verschiedene hereditäre Thrombozytopathien sowie neue Dysfunktionen der Thrombozytenfunktion und -konzentration inklusive milder bis moderater Blutungsneigungen, die nicht durch die LTA detektiert werden konnten, feststellen. Auch wurde vor Kurzem ein erster Patient mit hereditärer Thrombozytopathie und einem milden vWS Typ 1 diagnostiziert.

Die spezialisierten Thrombozyten-Phänotypisierungen und Funktionstests (10, 13) sind essentiell für die Diagnostik hereditärer, nicht-syndromaler Thrombozytopathien. In dieser Arbeit wurden Patient:innen mit „milder Blutungsneigung unklarer Genese“, bei denen andere Ursachen der Blutungsneigung ausgeschlossen wurden, und Patient:innen mit „mildem vWS Typ 1“, deren Diagnose die Blutungsneigung nicht ausreichend erklärt, mit einigen gezielten, durchflusszytometrischen Funktionstests auf Thrombozytopathien hin untersucht. Die Identifikation dieser Thrombozytopathien dient einem besseren Verständnis der Bedeutung dieser Erkrankungen im klinischen Alltag und ihrer Diagnostik. Des Weiteren wurde die Prävalenz dieser Thrombozytopathien in der hämostaseologischen Ambulanz des CTH und der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz im Zeitraum September 2018 bis November 2018 erhoben.

2.2.5 Therapie

Die Therapie von hämorrhagischen Diathesen richtet sich nach der Ursache: Liegen erworbene Störungen vor, erfolgt die Behandlung der Grunderkrankung, und potentiell beeinflussende Medikamente werden, wenn möglich, reduziert oder abgesetzt (72). Bei hereditären Störungen erfolgt eine symptomatische Behandlung bestehend aus sorgfältiger Blutstillung, bei schweren Verlaufsformen je nach Ausmaß der Erkrankung und Blutung ggf. aus einer Substitutionstherapie mit entsprechenden Präparaten (beispielsweise Antifibrinolytika (v.a. Tranexamsäure), Fibrinogen-, Thrombozyten- oder

Gerinnungsfaktorkonzentraten) (70, 72, 106, 138-140). Des Weiteren sollten Vorkehrungen für hämostaseologische Belastungssituationen wie Traumata und chirurgische Eingriffe - je nach Ausmaß der Invasivität der geplanten Intervention - getroffen werden.

Da viele Thrombozytopathien mit einer milden Symptomatik einhergehen, sind bei ihrer Therapie insbesondere eine medizinische Verlaufsbeobachtung und ggf. prophylaktische Maßnahmen bei hämostaseologischen Belastungssituationen wie Operationen oder Geburten von Bedeutung (107). Mukokutane Blutungen können häufig mit lokalen Maßnahmen wie Tamponaden oder Kauterisierung behandelt werden (107); bei hohem Blutungsrisiko und/oder -verlust kann eine Substitution mit Thrombozytenkonzentraten erfolgen (72, 139). Weiterhin ist bei Bedarf die Gabe von Desmopressin, Tranexamsäure, rekombinantem FVIIa (rFVIIa) oder TPO-Agonisten möglich (4, 106); für eine langfristige Erhöhung der Thrombozytenzahl sind bei bestimmten Thrombozytopathien und/oder -penien eine Stammzelltransplantation, Splenektomie oder eine genetische Therapie zu erwägen. Bei Frauen mit Menorrhagie ist ggf. weiterhin eine hormonelle Therapie möglich. (106).

Die Therapie des vWS ist ebenfalls abhängig von der Schwere der Erkrankung und besteht bei Bedarf aus der Gabe des den vWF aus den Endothelzellen freisetzenden Desmopressins oder der Gabe von vWF/FVIII-Konzentraten (80, 141). Bei Frauen mit Menorrhagie kann Tranexamsäure oder ggf. eine hormonelle Therapie zum Einsatz kommen; auch bei postpartaler Hämorrhagie ist Tranexamsäure zu erwägen (115). Weiterhin werden neue genetische (Gentherapie mit dem „dual-vector adenoassoziierten Virus“ oder transkriptionelles „Silencing“ mutierter Allele), protein- (Erhöhung des FVIII-Spiegels) und antikörperbasierte (Beeinflussung des vWF-Abbaus oder Erhöhung des endogenen vWF-Spiegels) Ansätze für die Therapie des vWS diskutiert (142).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Geräte

Gerätebezeichnung	Typ	Hersteller
Automatischer Hämatologie-Analysator	Sysmex® KX-21N	Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt
Durchflusszytometer	BD FACS Canto™ II	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Kolbenhub-Einkanalpipetten	Eppendorf Reseach® plus, variabel 0,1 – 2,5 µl variabel 0,5 – 10 µl variabel 2 – 20 µl variabel 10 – 100 µl variabel 20 – 200 µl variabel 100 – 1000 µl	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling
Magnetrührer	neoMag D-6010	neoLab® Migge, Heidelberg
pH/ORP-Meter	HI 2211	Hanna Instruments Deutschland GmbH, Vöhringen
Präzisionswaage	CPA 1003P	Sartorius AG, Göttingen
	R180D	Sartorius AG, Göttingen
Schüttler	Orbital Shaker DOS-10L	neoLab® Migge, Heidelberg
Vortexmischer	neo-Vortex D-6012	neoLab® Migge, Heidelberg
Wasserbad mit Einsätzen	ED-AP (042) (5A max 60°C), Einsatz: 046	Julabo GmbH, Seelbach
Zentrifuge	Allegra X-30R (Rotor: SX4400)	Beckmann Coulter™ GmbH, Krefeld

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Typ	Hersteller
Blutentnahmeröhrchen	S-Monovette® 10 ml 9NC (Antikoagulanz: 0,106 M Citrat)	Sarstedt AG&Co. KG, Nümbrecht
Kanüle mit Schlauch zur Blutentnahme	Safety-Multifly®-Set 21G 200 mm mit Adapter 0,8x19 mm	Sarstedt AG&Co. KG, Nümbrecht
Magnetrührstäbchen	MR 50	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Mehrfachdispenser mit Spitzen	VWR Stepper mit Adapter für 12,5 ml Dispenser-Spitzen	VWR International GmbH, Darmstadt
Pipettenspitzen	TipOne 10/20 µl XL Graduated Tip	StarLab GmbH, Hamburg
	TipOne 200 µl Yellow Tip	StarLab GmbH, Hamburg
	TipOne 1250 µl XL Graduated Tip	StarLab GmbH, Hamburg
Polypropylen-Röhrchen mit konischem Boden	Cellstar® Tubes 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

	Cellstar® Tubes 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Polystyrol-Röhrchen	5 ml	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Reaktionsgefäße	Safe Seal Gefäß (1,5 ml)	Sarstedt AG&Co. KG, Nümbrecht
	Safe Seal Gefäß (2 ml)	Sarstedt AG&Co. KG, Nümbrecht
Transferpipetten	Einmal-Pasteurpipetten mit integriertem Saugball 3,5 ml	Sarstedt AG&Co. KG, Nümbrecht

3.1.3 Reagenzien

Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Reagenzien

Bezeichnung	(Stamm-) Lösung	Bezugsquelle
Adenosindiphosphat	5 mM gelöst in 0,9% (w/v) NaCl	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim (jetzt Merck KGaA, Darmstadt)
Convulxin	100 µg/ml gelöst in HBSS, pH 7,4	Enzo Life Science GmbH, Lörrach
Epinephrinhydrotantrat	1,82 mg/ml	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim (jetzt Merck KGaA, Darmstadt)
Fibrinogen Alexa 488	1 mg/ml gelöst in HBSS, pH 7,4	Life Technologies GmbH, Ober- Olm
Formaldehyd 1% (v/v)	Formaldehyd 37% (v/v) verdünnt in PBS, pH 7,4	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Glycin-Prolin-Arginin-Prolin (GPRP)	125 mM gelöst in 0,9% (w/v) NaCl	Bachem Distribution Services GmbH, Weil am Rhein
Mepacrine (Quinacrin dihydrochlorid)	10 mM in PBS, pH 7,4	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim (jetzt Merck KGaA, Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl)-Lösung, isotonisch 0,9%	9 mg NaCl in 1 ml (molare Konzentration: 0,154 mmol Na ⁺ , 0,154 mmol Cl ⁻)	B. Braun, Melsungen AG, Melsungen
Natriumhydroxid (NaOH)	2 N	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim (jetzt Merck KGaA, Darmstadt)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	1:10 gelöst in ddH ₂ O, pH 7,4 (10x konzentrierte Lösung enthält: 2,7 mM KCl, 140 mM NaCl, 10 mM Phosphat)	AppiliChem GmbH, Darmstadt
Ristocetin Sulfat	15 mg/ml gelöst in 0,9% NaCl	Loxo GmbH, Dossenheim
Salzlösung nach Hanks (HBSS)	HBSS W/O Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Phenolrot, 10x	Life Technologies GmbH, Ober- Olm
Salzsäure (HCl)	2 M	Carl Roth GmbH&Co. KG, Karlsruhe
Thrombin (aus bovinem Plasma)	100 U/ml gelöst in 0,9% (w/v) NaCl	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim (jetzt Merck KGaA, Darmstadt)

3.1.4 Antikörper

Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Antikörper

Antikörper gegen	Klon	Isotyp	Spezies	Konju- gation	Bezugsquelle
CD29	K20	IgG2a	Maus	FITC	Beckman Coulter, Krefeld
CD36	FA6.152	IgG1	Maus	FITC	Beckman Coulter, Krefeld
CD36: sc-21772	185-1G2	IgG2a κ	Maus	FITC	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

CD41/CD61	P2	IgG1 κ	Maus	FITC	Beckman Coulter, Krefeld
CD42a	Beb-1	IgG1	Maus	FITC	Becton, Dickinson Biosciences, Heidelberg
CD42b	SZ2	IgG1	Maus	FITC	Beckman Coulter, Krefeld
CD62P	AK-4	IgG1 κ	Maus	FITC	Becton, Dickinson Biosciences, Heidelberg
CD63	H5C6	IgG1 κ	Maus	FITC	Becton, Dickinson Biosciences, Heidelberg
CD107a (LAMP-1)	H4A3	IgG1 κ	Maus	PE	Becton, Dickinson Biosciences, Heidelberg
GPVI eFlour® 660	HY101	IgG1 κ	Maus	APC	Thermo Fisher Scientific, USA
vWF (F8VWF)	polyklonal	IgG	Schaf	FITC	BioRad Laboratories Inc, Herkules, USA

3.1.5 Software-Programme

Tabelle 13: In dieser Arbeit verwendete Software-Programme

Software	Hersteller
BD FACS DIVA Software© Becton, Version 6.1.3.	Becton, Dickinson Biosciences, Heidelberg
EndNote™, Version X9.1 und 20.2.1	Thomson Reuters (jetzt Clarivate Analytics), USA
GraphPad Prism, Version 7.04, 8.10, 9.3.1	GraphPad Software, Inc., USA
Micorsoft® Office 2019 für Windows: Word, Excel, PowerPoint	Microsoft Corporation, USA
SAP Logon 730	Systeme, Anwendungen und Produkte in der Datenverarbeitung (SAP), Walldorf
Sysmex Software, Version 1KXNH 00-10	Sysmex Europe GmbH, Nordenstedt

3.2 Methoden

3.2.1 Studiendesign

3.2.1.1 Studienpopulation, -art, Zeitraum

Diese Arbeit wurde mit Patient:innen der hämostaseologischen Ambulanz des Centrums für Thrombose und Hämostase (CTH) und der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.; des Weiteren wurden gesunden Kontrollproband:innen eingeschlossen. Sie wurde als Längsschnittstudie durchgeführt. Ein systematisches Screening der Patient:innen mit hämorrhagischer Diathese unklarer Genese oder mit vWS Typ 1 fand im Zeitraum September bis November 2018. Die sich anschließenden laboranalytischen Messungen der Patient:innen begannen im November 2018 und erfolgten einschließlich der Mehrfachanalysen zur Validierung sowie dem Einschluss einiger weiterer Patient:innen bis

September 2019. Die Kontrollproband:innen wurden im Zeitraum Februar bis Spetember 2019 rekrutiert und untersucht. Währenddessen und anschließend fanden die Auswertungen statt.

3.2.1.2 Genehmigung

Die Datenerhebung dieser Arbeit erfolgte als reguläre Diagnostik der Patient:innen aus der hämostaseologischen Ambulanz des CTH und der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz. Die gesunden Kontrollproband:innen wurden über das Ethikvotum der Ethik-Kommission / Landesärztekammer Rheinland-Pfalz (837.302.12; 25.07.12; 2018-13290_1; 27.07.2018) eingeschlossen.

3.2.1.3 Datenschutz, Dokumentation, Datenspeicherung

In diesem Projekt wurden die Datenschutzrichtlinien der Universitätsmedizin Mainz eingehalten und die ärztliche Schweigepflicht geachtet. Die Teilnahme für Patient:innen und Kontrollproband:innen war freiwillig, die Einwilligung erfolgte nach Aufklärung. Mit der Einwilligung stimmten die Patient:innen und Kontrollproband:innen zu, dass persönliche Daten über Alter, Geschlecht, Krankheitsgeschichte (insbesondere Blutungsereignisse), aktuelle Medikation, Familienanamnese und Komorbiditäten gespeichert und in anonymisierter Form publiziert werden dürfen. Die Speicherung und Auswertung der Daten erfolgte auf zugriffskontrollierten Servern des CTH der Universitätsmedizin Mainz.

3.2.1.4 Fallzahlplanung

Die Fallzahlplanung erfolgte in Absprache mit Mitarbeiter:innen des Instituts für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) der Universitätsmedizin Mainz mit Hilfe des unverbundenen, zweiseitigen T-Tests für die durchflusszytometrische Analyse der thrombozytären Granulainhaltsstoffe ATP/ADP quantifiziert durch das Mepacrine-Fluoreszenzsignal. Sie wurde anhand etablierter Methoden der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Jurk des CTH der Universitätsmedizin Mainz mit dem durchflusszytometrischen Mepacrine-Fluoreszenzsignal durchgeführt, da δ -SPD zu den häufigsten hereditären Thrombozytopathien mit milder bis moderater Blutungsneigung gehören (12). Der Mittelwert des Mepacrine-Fluoreszenzsignals wurde bei gesunden Kontrollproband:innen bei 52,5 mit einer Standardabweichung ± 12 (relative Einheiten) und bei Patient:innen mit nicht-syndromaler δ -SPD (quantitativ oder qualitativ) bei $< 40,4$ angenommen. Bei einer Power von

80% und einem Signifikanzniveau α von 5% wurde eine Fallzahl von 14 Personen pro Gruppe errechnet.

In die Studie eingeschlossen wurden 34 Patient:innen in der Gruppe „Patient:innen mit hämorrhagischer Diathese unklarer Genese“, 20 Patient:innen in der Gruppe „Patient:innen mit diagnostiziertem vWS Typ 1“ und 18 gesunde Kontrollproband:innen.

3.2.1.5 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte in Kooperation mit dem IMBEI der Universitätsmedizin Mainz. Alle in der Studie erhobenen Daten wurden zu Beginn in Microsoft Excel- und Word-Dokumenten erfasst. Die Auswertung und Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism. Dargestellt wurden die Ergebnisse in Tabellen, Box-Plots und Liniendiagrammen. Bei der statistischen Auswertung wurde beachtet, ob die Daten normalverteilt sind oder nicht. Für die Prüfung der Normalverteilung wurde der Shapiro-Wilk-Test angewendet. Die Analyse von normalverteilten Daten wurde mit Hilfe des unverbundenen, zweiseitigen T-Tests („unpaired T-Test“) durchgeführt. Lag keine Normalverteilung vor, wurde der Mann-Whitney-Test verwendet.

Die statistischen Auswertungen erfolgten deskriptiv, explorativ und confirmatorisch. Es wurde zu einem Signifikanzniveau von lokal 5% getestet. Auf Adjustierung für multiples Testen wurde verzichtet. Häufigkeiten wurden mit dem 95%-Konfidenzintervall nach Wilson/Brown angegeben. Bei kleiner Gruppengröße wurde auf die Angabe des Konfidenzintervalls verzichtet.

3.2.1.6 Patient:innenrekrutierung

Die Patient:innenrekrutierung fand in der hämostaseologischen Ambulanz des CTH und der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz im Zeitraum September 2018 bis September 2019 statt. Innerhalb der regulären Diagnostik erfolgte bei den Patient:innen eine standardisierte Abklärung der hämorrhagischen Diathese mittels anamnestischer sowie laboranalytischer Methoden inklusive Erhebung der vWF-Parameter und globalen Thrombozytenfunktionstestungen. Das Laborscreening, welches im Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt wurde, beinhaltete die Erfassung des Blutbildes, der Globalgerinnung mittels Quick, INR, aPTT und Fibrinogen (abgeleitet sowie nach Clauss), dem unspezifischen Entzündungsparameter CRP, den vWF-Parametern vWF-Antigen, vWF-

Aktivität, Kollagenbindungstest und vWF-Multimeranalyse, PFA-100 Kollagen/ADP, PFA-100 Kollagen/Epinephrin, LTA nach Born in PRP (mit den Agonisten Arachidonsäure, ADP, Epinephrin, Kollagen und Ristocetin), FVIII-Aktivität, dem Fibrinolyseparameter Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (PAI) und dem FXIII. Weitere Einzelfaktoren oder Parameter wurden ggf. bei Auffälligkeiten der Globalgerinnung bestimmt. Für die Validierung der Diagnostik wurden die Blutuntersuchungen mehrfach im Abstand von wenigen Wochen wiederholt. Auf den Ausschluss einer möglichen Beeinflussung durch bestimmte Medikamente, Nahrungs-/Genussmittel und Nahrungsergänzungstoffe (5) wurden die Patient:innen hingewiesen.

In einigen Fällen konnte trotz Wiederholung der Untersuchungen keine eindeutige Ursache der hämorrhagischen Diathese gefunden werden. Sind die Parameter PFA-100 Kollagen/ADP, PFA-100 Kollagen/Epinephrin und/oder die LTA nach Born mindestens zweimal pathologisch verändert, besteht Hinweis auf eine Funktionsstörung der Thrombozyten (15). Da die standardisierten globalen Laboruntersuchungen die milden Thrombozytenfunktionsstörungen jedoch nicht zuverlässig detektieren, liegt möglicherweise bei anamnestischer Blutungsneigung auch bei Normwerten eine Thrombozytopathie vor. Auch bei Patient:innen, bei denen ein mildes vWS Typ 1 diagnostiziert wurde, erklärt dies die anamnestische Blutungsneigung oft nicht ausreichend (120). Daher wurden im Rahmen dieses Projekts Patient:innen mit anamnestischer Blutungsneigung unabhängig vom Ergebnis des durchgeführten ISTH-BAT, unabhängig von der Thrombozytenkonzentration und unabhängig von den Laborergebnissen der globalen Thrombozytenfunktionstests eingeschlossen.

3.2.1.6.1 Einschlusskriterien

Eingeschlossen wurden Patient:innen, die mindestens 18 Jahre alt waren, eine anamnestische Blutungsneigung in der Eigen- und ggf. Familienanamnese aufwiesen und bei denen eine „hämorrhagischen Diathese unklarer Genese“ oder ein „vWS Typ 1“ diagnostiziert wurde. Der Einschluss erfolgte nach Einholung einer informierten Einwilligung innerhalb der regulären Diagnostik der hämostaseologischen Ambulanz des CTH und der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz.

3.2.1.6.2 Ausschlusskriterien

Ausgeschlossen wurden Patient:innen, die unter 18 Jahre alt waren, bei denen ein vWS Typ 2 oder 3, eine syndromale Thrombozytopathie oder ein relevanter Gerinnungsfaktormangel (108) diagnostiziert wurde oder die an einer erworbenen Thrombozytopathie bedingt durch die Einnahme von bestimmten Medikamenten (z.B. Antikoagulanzen, Antifibrinolytika, β -Lactam-

Antibiotika, Chemotherapeutika, NSAIDs ≤ 10 Tagen), Nahrungs- und Genussmitteln, Nahrungsergänzungsmitteln, systemischen Erkrankungen (z.B. Urämie, Lebererkrankungen, myeloproliferative Erkrankungen) oder aktiven Tumorerkrankungen litten. Auch Patient:innen mit kürzlich zurückliegenden Operationen, akuten oder kürzlich zurückliegenden Infektionen und bestehender Schwangerschaft wurden ausgeschlossen (5, 15).

3.2.1.7 Kontrollproband:innenrekrutierung

In diese Studie wurden 18 gesunde Kontrollproband:innen im Zeitraum Februar bis September 2019 eingeschlossen. Die Aufklärung und Einwilligung erfolgte vor Durchführung des ISTH-BAT und der Blutentnahme. Die Kontrollproband:innen wurden verhältnismäßig nach Alter (± 10 Jahre) und Geschlecht den Patient:innen zugeordnet.

3.2.1.7.1 Einschlusskriterien

Kontrollproband:innen wurden eingeschlossen, wenn sie mindestens 18 Jahre alt waren, schriftlich eingewilligt haben (Ethikantrag mit der Studien-Nr. 837.302.12; 25.07.12; FF109/2015) und eine passende Alters- (± 10 Jahre) und Geschlechtszuordnung zu den Patient:innen stattfinden konnte.

3.2.1.7.2 Ausschlusskriterien

Es wurden keine Kontrollproband:innen eingeschlossen, die jünger als 18 Jahre alt waren und eine anamnestische Blutungsneigung äußerten bzw. ein pathologisches Ergebnis des ISTH-BAT aufwiesen. Auch wurden sie ausgeschlossen, wenn die Einnahme von die Thrombozytenfunktion beeinflussenden Medikamenten innerhalb der letzten 10 Tage (z.B. NSAIDs, β -Lactam-Antibiotika), bestimmten Nahrungs-, Genuss- und Nahrungsergänzungsmitteln erfolgt ist oder sie an systemischen Erkrankungen (z.B. Urämie, Lebererkrankungen, myeloproliferative Erkrankungen) oder aktiven Tumorerkrankungen litten. Auch bei kürzlich zurückliegenden Operationen, akuten oder kürzlich zurückliegenden Infektionen oder Schwangerschaft erfolgte kein Einschluss.

3.2.2 Erfassung der Blutungseigenanamnese mit Hilfe des ISTH-BAT

Um eine einheitliche anamnestische Erfassung der hämorrhagischen Diathese in der Eigenanamnese zu ermöglichen, erfolgte dies im Rahmen dieses Projektes mit Hilfe des

standardisierten ISTH-BAT. Er wurde sowohl mit den Patient:innen als auch mit den Kontrollproband:innen durchgeführt. In dem Fragenbogen werden 14 Abschnitte mit folgenden Symptomen kategorisiert (122, 143): Epistaxis, kutane Hämorrhagien, Blutungen aus kleinen Wunden, Blutungen in der Mundhöhle, gastrointestinale Blutungen, Hämaturie, Blutungen nach Zahnextraktionen, Blutungen nach Operationen oder größeren Verletzungen, Menorrhagie, postpartale Hämorrhagien, Muskelhämatome, Hämarthros, ZNS-Blutungen, andere Blutungen (wie beispielsweise Nabelblutungen, Blutungen bei Blutentnahmen, Ovulationsblutungen). Jeder Abschnitt wurde anschließend mit Hilfe eines Auswertungsbogens mit einem Punktwert von 0-4 bewertet, bei dem das Alter der Erstmanifestation, die Häufigkeit, das Ausmaß, der Zeitpunkt der Blutung sowie die benötigte Medikation eine Rolle spielten. Aus den Punkten ergibt sich in der Summe der sog. „bleeding score“, wobei ein pathologisches Ergebnis für Männer ab einem Punktwert von >3, für Frauen ab >5 von 56 möglichen Punkten definiert ist (122, 144).

Der ISTH-BAT wurde zunächst für Patient:innen mit vWS validiert (130, 145) und stellt einen Konsensus von Blutungsanamnesefragebögen dar (122). Seine Eignung für Patient:innen mit hereditären Thrombozytopathien und -penien stand zunächst nicht im Fokus der Untersuchungen (143), jedoch zeigen aktuelle Studien (146), dass er sich auch als gutes diagnostisches Screeninginstrument für Thrombozytopathien eignet. Kürzlich wurde seine Differenzierungsfähigkeit zwischen Patient:innen mit Thrombozytopathie und gesunden Kontrollproband:innen vom Scientific Sub-Committee (SSC) „Platelet Physiology“ der ISTH validiert (147); weiterhin wurde gezeigt, dass ein hoher „bleeding score“ unabhängig von der Diagnose auf ein hohes Risiko für nachfolgende Blutungsereignisse hindeutet (148). Die Genauigkeit bei Unterscheidung zwischen einem vWS Typ 1 und einer Thrombozytopathie ist gering (147).

3.2.3 Familienanamnese, Medikation, Komorbiditäten

Neben der Eigenanamnese wurde die Familienanamnese der Patient:innen und Kontrollproband:innen erhoben. Dabei ging es in erster Linie um familiär aufgetretene Blutungsereignisse und -neigungen sowie um bereits diagnostizierte hämorrhagische Diathesen. Des Weiteren wurden die aktuelle sowie kürzlich zurückliegende Medikationen und Komorbiditäten erfragt. Dabei wurde noch einmal besonders auf die unter Kapitel 3.2.1.6.2 *Ausschlusskriterien* genannten Aspekte geachtet.

3.2.4 Venöse Blutentnahme

Die venöse Blutentnahme erfolgte nach Aufklärung und Einwilligung der Patient:innen und Kontrollproband:innen nach standardisierten Methoden (149, 150). Sie wurde unmittelbar vor Beginn der Versuche und i.d.R. von derselben Person durchgeführt. Für die Blutentnahme wurden 10 ml Monovetten mit dem Antikoagulant Citrat verwendet; das vorgeschriebene Citrat-Vollblutverhältnis wurde eingehalten. Punktiert wurde je nach anatomischen Gegebenheiten i.d.R. in der Ellenbeuge (Vena mediana cubiti, Vena basilica, Vena cephalica). Dabei wurde darauf geachtet, dass die Venenstauung möglichst kurz stattfand, um eine lokale Hämokonzentration und Aktivierung der Gerinnung und Fibrinolyse zu verhindern. Auch wurde das Blut langsam entnommen, um eine Aktivierung der Thrombozyten zu vermeiden. Der anschließende direkte Transport der Blutprobe fand unter körperwarmen Bedingungen statt; es wurde auf minimale Bewegung der Probe geachtet.

3.2.5 Automatischer Hämatologie-Analysator

Im Anschluss an die Blutentnahme wurde mit Hilfe des automatischen Hämatologie-Analysators ein kleines Blutbild erstellt. Dies umfasst die Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenkonzentration, die Hämoglobinkonzentration, den Hämatokrit und die Erythrozytenindizes MCH, MCHC und MCV. Des Weiteren wurde ein Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenhistogramm erstellt. In Rahmen dieses Projekts wurde das Thrombozytenhistogramm genauer betrachtet, welches die Thrombozytenverteilungsbreite, das mittlere Thrombozytenvolumen (MPV) und den Anteil großer Thrombozyten beinhaltet (151).

Allgemeines Messprinzip des automatischen Hämatologie-Analysators ist das Aliquotieren und Versetzen der Blutproben mit verschiedenen Reagenzien, um zellspezifische Eigenschaften zu analysieren. Die Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenkonzentrationen sowie deren Volumenverteilungsbreiten werden über das elektrische Widerstandsmessprinzip erhoben, bei dem die Änderung der Leitfähigkeit der Verdünnungsflüssigkeit durch die Blutzellen zur Zählung und Größenbestimmung verwendet wird. Daraus lassen sich anschließend die Erythrozytenindizes berechnen und der Hämatokrit mittels kumulativer Impulshöhensummierung ermitteln. Für die Analyse der Leukozytenkonzentration werden zuvor die Erythrozyten lysiert; ebenso bei der Hämoglobin-Messmethode, bei der es nach Oxidation von Eisen (Fe^{2+}) zu Fe^{3+} zur Bildung eines stabilen Methämoglobin-Komplexes kommt, welcher photometrisch messbar ist (151).

3.2.6 Durchflusszytometrie - Allgemeines Versuchsprinzip

Die Durchflusszytometrie („fluorescence activated cell sorting“ (FACS)) ist ein Verfahren, welches das Zählen sowie die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen und Partikeln in einer Suspension auf Einzelzellebene ermöglicht. Dies geschieht mit Hilfe der Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen, wodurch Oberflächen- und intrazelluläre Moleküle durch Aussendung charakteristischer Lichtsignale detektiert werden können (152).

Für die Analyse werden die Zellen einzeln an einem Detektionssystem in einer Messkammer (sog. Flusszelle, „flow cell“) mit gebündelten Laserstrahlen geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Dabei ist es wichtig, dass die Zellen einzeln den Laserstrahl passieren, wobei man sich des Prinzips der hydrodynamischen Fokussierung bedient: Während die Probenflüssigkeit von einer Kapillare angesaugt und zur Messkammer geleitet wird, wird sie von einer schneller fließenden Trägerflüssigkeit umgeben, in der eine laminare Strömung erzeugt wird (sog. Hüllstrom). Dies bewirkt eine Zunahme der Fließgeschwindigkeit der Zellen in der Mitte der Probe. Zusätzlich wird der Querschnitt der Messküvette verkleinert, was zu einer weiteren Beschleunigung und Ordnung der Zellen führt. Dies erlaubt dann das einzelne Passieren der Zellen vor dem Laserstrahl.

Während des Passierens des Laserstrahls erzeugen die Zellen ein für jeden Zelltyp charakteristisches Streulicht („light scatter“), welches von einem Detektor ausgewertet wird. Analysiert wird das Vorwärts- („forward scatter channel“ (FSC)) und das Seitwärtsstreulicht („side scatter channel“ (SSC)), die zusammen Zellen mit gleichen Eigenschaften gruppieren und somit spezifische Zellgruppen identifizieren können. Mit Hilfe des FSC ist es möglich, die Größe der einzelnen Zellen zu bestimmen. Es wird im Winkel von etwa 20° zur Achse des Laserstrahls detektiert, wohingegen das SSC im Winkel von etwa 90° gestreut wird. Das SSC gibt Informationen über die inneren Strukturen und Granularität der Zellen. Die Lichtstreuungen werden über einen Detektor aufgenommen und die Intensität des erzeugten Signals wird grafisch aufgetragen. Damit kann eine Aussage über die Eigenschaft jeder einzelnen analysierten Zelle getroffen werden; durch die Analyse >1000 Zellen/Sekunde sind dann repräsentative Informationen über Zellpopulationen möglich.

Um die Zellen weiter zu differenzieren und zu charakterisieren, werden fluorchrommarkierte Antikörper oder andere Substanzen verwendet, die an spezifischen Oberflächen- oder intrazellulären Strukturen der Zellen binden. In dieser Arbeit wurde das Fluorchrom Fluorescein isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) sowie Allophycocyanin (APC) verwendet. Die Elektronen der Fluorochrome werden durch den monochromatischen Laser

angeregt, indem sie das Licht einer für jedes Fluorochrom spezifischen Wellenlänge absorbieren. Dadurch gelangen sie auf ein höheres Energieniveau, fallen jedoch innerhalb weniger Nanosekunden aus diesem instabilen Zustand auf ihr Ursprungsenergieniveau zurück und emittieren dabei Energie in Form von Licht einer größeren Wellenlänge. Dies kann von speziellen Photodetektoren (Photomultiplier) gemessen und umgewandelt werden. Bsp. liegt das Absorptionsmaximum von FITC, dem in dieser Arbeit am häufigsten verwendeten Fluorochrom, bei 490 nm, wohingegen das Emissionsmaximum 525 nm beträgt (152).

Die gemessenen Signale werden anschließend grafisch dargestellt. Für diese Arbeit eignete sich die Darstellung im Einzelzelldiagramm („dot-plot“).

3.2.7 Durchflusszytometrische Quantifizierung der Rezeptor-Antigenbindungsstellen (ABS) der Hauptglykoproteine auf der Thrombozytenoberfläche

Die Rezeptor-ABS der Hauptglykoproteine auf der Thrombozytenoberfläche GPIIb/IIIa (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$), GPIb α , GPIX (GPIb/V/IX), GPVI, GPIIa (Integrin β_1) und CD36 wurden in dieser Arbeit durchflusszytometrisch im Citrat-Vollblut quantifiziert. Ihre physiologischen Agonisten sowie die laborintern bestimmte Anzahl an Rezeptor-ABS pro Thrombozyt sind in Tabelle 14 aufgeführt; weiterhin ist die im Literaturvergleich (153, 154) angenommene Anzahl an Rezeptor-ABS gezeigt. Es wurde je 50 μ l Vollblut in verschiedene Polystyrol-Röhrchen pipettiert und mit je 50 μ l phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), pH 7,4, verdünnt. Dazu wurden je 5 μ l einer der folgenden Antikörper gegeben:

Tabelle 14: Hauptglykoproteine der Thrombozyten mit verwendeten Antikörpern, physiologischen Agonisten, der laborintern bestimmten sowie im Literaturvergleich angenommenen Anzahl an Rezeptor-ABS pro Thrombozyt

Hauptglykoproteine der Thrombozyten	Antikörper (Klon)	Physiologischer Agonist (Beispiel)	Laborintern bestimmte Anzahl an Rezeptor-ABS pro Thrombozyt Mittelwert (MW), Median (MD), (Min.-Max.wert)	Im Literaturvergleich angenommene Anzahl an Rezeptor-ABS pro Thrombozyt (153, 154)
GPIIb/IIIa (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$)	CD41/CD61 (P2)	Fibrinogen, vWF	MW: 66540 MD: 66702 (52988 – 77300)	83300 bzw. 80000 - 100000
GPIb α	CD42b (SZ2)	vWF	MW: 16064 MD: 15149 (13217 - 25249)	18900 bzw. 20000 - 30000
GPIX (GPIb/V/IX)	CD42a (Beb-1)	Thrombospondin-1, vWF	MW: 23302 MD: 22928 (17381 - 29462)	32400 bzw. 20000 - 30000

GPVI	GPVI eFluor® 660 (HY101)	Kollagen	MW: 23526 MD: 28174 (13021 - 30495)	9600 bzw. 1000 - 2000
GPIIa (Integrin β_1)	CD29 (K20)	Kollagen	MW: 7820 MD: 7816 (5895 - 11127)	4600 bzw. 2000 - 4000
CD36	CD36 (FA6.152) CD36 (185-1G2)	Thrombospon- din-1	MW: 32933 MD: 33089 (20813 - 54907)	16700 bzw. 10000 - 25000

Die Proben inkubierten 20 min bei 120 rpm auf dem Schüttler; anschließend wurde mit je 2 ml PBS verdünnt. Von jeder Probe wurden 500 μ l in neue Polystyrol-Röhrchen transferiert und wieder mit 2 ml PBS verdünnt. Anschließend wurden die Proben im Durchflusszytometer bei mittlerer Flussrate und einer Spannung von 600 gemessen. Die Messung war innerhalb der ersten 1,5 Stunden nach Blutentnahme abgeschlossen.

3.2.8 Durchflusszytometrische Erhebung des Aktivierungsstatus und der Agonisten-induzierten Aktivierungsfähigkeit der Thrombozyten *in vitro*

Für die durchflusszytometrische Analyse des Aktivierungsstatus der Thrombozyten *in vitro* wurde die CD62P-, CD63- und LAMP-1-Oberflächen-Expression, die vWF-Bindung sowie die Fähigkeit, extern zugesetztes Fibrinogen ohne Zusatz von Agonisten zu binden, erhoben. Die Agonistentitration fand zur Beurteilung der Fähigkeit, externes Fibrinogen und den vWF zu binden, statt und wurde für Fibrinogen mit den Agonisten ADP, Convulxin, Epinephrin und Thrombin und für den vWF mit Ristocetin durchgeführt. Des Weiteren wurde die Agonisten-induzierte Granulasekretion durch Induktion der CD62P-, CD63- und LAMP-1-Oberflächenexpression durch die Agonisten Convulxin und Thrombin sowie die Aufnahme und Freisetzung von Mepacrine in die bzw. aus den δ -Granula, induziert durch Convulxin und Thrombin, erhoben. Die Funktionstests erfolgten in thrombozytenreichem Plasma („platelet-rich plasma“ (PRP)).

3.2.8.1 Gewinnung von thrombozytenreichem Plasma

Die Gewinnung von PRP erfolgt aus Citrat-Vollblut. Dafür wurde das Citrat-Vollblut bei 200 xg mit niedriger Bremse (Stufe 2) für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Zentrifugation nutzt das Prinzip der Massenträgheit, um Zellen aus Suspensionen anhand ihrer Größe, Dichte und Form durch unterschiedliche Sedimentationsgeschwindigkeiten zu separieren. PRP stellt nach der Zentrifugation des Citrat-Vollblutes die oberste Phase dar, welche mit einer Transferpipette entnommen und in ein Polystyrol-Röhrchen überführt wurde. Dabei wurde

darauf geachtet, einen Sicherheitsabstand zu den sich anschließenden Leukozyten- und Erythrozytenphasen einzuhalten, um eine Kontamination zu vermeiden. Nach dem Transfer wurde die Thrombozytenkonzentration in PRP im automatischen Hämatologie-Analysator bestimmt. Um für die spätere Messung im Durchflusszytometer eine adäquat niedrige Konzentration zu ermöglichen, wurde das gewonnene PRP um den Faktor 1:7 mit PBS, pH 7,4, verdünnt.

3.2.8.2 Thrombozytenaktivierungsmarker

Je nach Funktionstest wurden verschiedene Aktivierungsmarker vor oder nach der Agonisten-induzierten Aktivierung der Thrombozyten zum verdünnten PRP gegeben. Die Aktivierungsmarker dienen dem durchflusszytometrischen Nachweis der spezifischen Struktur, an die sie binden.

3.2.8.2.1 Mepacrine

Mepacrine ist ein Antibiotikum, welches historisch zur Malariaprophylaxe und -therapie eingesetzt wurde, heute jedoch nicht mehr als Arzneimittel zugelassen ist. Es hat eine hohe Affinität für Adeninnukleotide und akkumuliert aufgrund des hohen Gehalts an ADP spezifisch in den δ -Granula der Thrombozyten (155). Nach Aktivierung der Thrombozyten und Freisetzung der Inhaltsstoffe der δ -Granula nimmt auch die intrazelluläre Mepacrine-Konzentration wieder ab. Da Mepacrine autofluoreszierend ist, lässt es sich durchflusszytometrisch im FITC-Kanal darstellen (42, 43, 156). Mepacrine wurde im Verhältnis 1:20 zum verdünnten PRP gegeben, nachdem es zuvor um den Faktor 1:100 in PBS, pH 7,4, vorverdünnt wurde. Um die Aufnahme in die δ -Granula zu ermöglichen, inkubierte es vor Aktivierung der Thrombozyten 5-10 min im verdünnten PRP.

3.2.8.2.2 Fibrinogen

Fibrinogen ermöglicht über den aktivierten GPIIb/IIIa-Komplex eine Quervernetzung der Thrombozyten und ist damit essentiell für die Bildung eines Thrombozytenaggregats während der primären Hämostase (25). Durch den Zusatz von mit dem Fluorochrom Alexa 488 konjugiertem Fibrinogen, welches dadurch durchflusszytometrisch nachweisbar ist, kann seine Bindungsfähigkeit bzw. der Aktivierungszustand des GPIIb/IIIa-Komplexes gezielt

nachgewiesen werden. Fibrinogen wurde direkt vor Aktivierung der Thrombozyten im Verhältnis 1:10 zum verdünnten PRP hinzugegeben.

3.2.8.2.3 vWF

Der vWF ist ebenfalls essentiell an der Aktivierung der Thrombozyten während der Hämostase beteiligt (49). Die Bindung des vWF an die Thrombozyten wurde in dieser Arbeit nach Aktivierung der Thrombozyten mit Ristocetin (s.u.) und anschließender Fixierung bestimmt. Dafür wurde der Antikörper gegen den vWF 1:100 in PBS, pH 7,4, vorverdünnt.

3.2.8.2.4 CD62P, CD63, LAMP-1

CD62P, CD63 und LAMP-1 sind in der thrombozytären Granulamembran lokalisierte Proteine, die erst nach Aktivierung und Sekretion der Granula auf die Thrombozytenoberfläche gelangen, wo sie über spezifische Antikörper nachweisbar sind. CD62P (P-Selektin) ist ein Adhäsionsmolekül, das die Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten vermittelt (157) und auf der Membran der α -Granula nachweisbar ist. (38). CD63 (Granulophysin) ist auf der Membran der δ -Granula (41) und der Lysosomen (48) lokalisiert und wird als Modulator der Signaltransduktion von Oberflächenproteinen diskutiert (37). Über LAMP-1, deren Funktion bisher unbekannt ist, erfolgt der Nachweis der Exozytose der Lysosomen (46).

3.2.8.3 Agonisten

Für die Thrombozytenfunktionstests mit den verschiedenen Aktivierungsmarkern wurden unterschiedliche Agonisten verwendet (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Aktivierungsmarker mit verwendeten Agonisten

Agonist // Aktivierungsmarker	CD62P	CD63	Fibrinogen	LAMP-1	Mepacrine	vWF
ADP			x			
Convulxin	x	x	x	x	x	
Epinephrin			x			
Ristocetin						x
Thrombin	x	x	x	x	x	

3.2.8.3.1 ADP

ADP ist ein physiologischer Agonist der Thrombozyten und wirkt über den P2Y₁- und P2Y₁₂-Rezeptor. Es wird in den δ -Granula gespeichert und spielt vor allem eine wichtige Rolle beim Rückkopplungsmechanismus der Verstärkung der Thrombozytenaktivierung (56).

3.2.8.3.2 Convulxin

Convulxin ist ein starker, physiologisch nicht im menschlichen Blut vorkommender Aktivator der Thrombozyten. Das heterodimäre Protein zählt zur Familie der C-Typ Lektine und wurde aus dem Gift der tropischen Klapperschlange *Crotalus durissus terrificus* isoliert (158, 159). Die meisten Proteine dieser Familie aus Schlangengiften wirken inhibitorisch auf die Thrombozytenaktivierung; Convulxin jedoch führt über eine hochaffine Bindung an den Kollagenrezeptor GPVI zur Thrombozytenaktivierung (158). Da Kollagen jedoch noch an weiteren Rezeptoren bindet, gibt es Unterschiede im zeitlichen Verlauf und der Ausprägung der Wirkung der Signaltransduktion. Damit eignet sich Convulxin aber für eine spezifische Testung dieses Rezeptors (159).

3.2.8.3.3 Epinephrin

Epinephrin ist die synthetische Form von Adrenalin und wirkt wie Adrenalin an den α_2 -adrenergen Rezeptoren der Thrombozyten. Darüber fördert es die Thrombozytenaktivierung sowie eine Verstärkung der Wirkung durch andere Agonisten (64).

3.2.8.3.4 Ristocetin

Ristocetin ist ein Antibiotikum der Vancomycin-Gruppe, das heutzutage nicht mehr verwendet wird. Es erhöht die Affinität des vWF zum GPIIb/IIIa, das eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Thrombozyten spielt. Daher wird Ristocetin bei Tests eingesetzt, welche die An- oder Abwesenheit des vWF überprüfen (160).

3.2.8.3.5 Thrombin

Thrombin ist einer der stärksten Agonisten der Thrombozytenaktivierung und durch seine Aufgabe, Fibrinogen zu Fibrin zu spalten, essentiell für die Bildung eines stabilen Thrombus. An den Thrombozyten wirkt Thrombin vor allem über die Rezeptoren PAR1 und PAR4 (68).

Bei Verwendung von Thrombin bei den in dieser Arbeit durchgeführten Thrombozytenfunktionstests wurde vor der Aktivierung der Thrombozyten GPRP, bestehend aus der Aminosäuresequenz Glycin-Prolin-Arginin-Prolin, im Verhältnis 1:100 zum verdünnten PRP hinzugegeben. GPRP bindet an Fibrinogen und verhindert dessen Fibrinpolymerisation (161), die ansonsten im Kontakt mit Thrombin ausgelöst werden und die Beurteilung der Bindungsfähigkeit der Thrombozyten von Fibrinogen unmöglich machen würde.

3.2.8.4 Agonistentitration

Die Aktivierung der Thrombozyten wurde mit aufsteigenden Konzentrationen der Agonisten durchgeführt. Dafür wurden die in Tabelle 16 beschriebenen Konzentrationen der Agonisten in Polystyrol-Röhrchen vorgelegt.

Tabelle 16: Verwendete Konzentrationen der Agonistentitration je Polystyrol-Röhrchen

Agonist // Polystyrol-Röhrchen	I	II	III	IV	V
ADP [μ M]	0	0,125	0,25	0,75	-
Convulxin [ng/ml]	0	1,25	2,5	5	20
Epinephrin [μ M]	0	1	5	10	20
Ristocetin [mg/ml]	0	0,4	0,6	0,8	1
Thrombin [U/ml]	0	0,025	0,05	0,1	0,2

Die Aktivierung erfolgte durch druckvolles Pipettieren von je 100 μ l sich in PRP befindlichen, mit PBS verdünnten und je nach Funktionstests ggf. bereits mit den Aktivierungsmarkern Mepacrine oder Fibrinogen versetzten Thrombozyten zu den in verschiedenen Konzentrationen vorgelegten Agonisten. Um keine weitere Aktivierung wie beispielsweise durch Scherkräfte zu provozieren, wurden die Proben in den folgenden 36 min nicht bewegt.

Nach 6 min wurde die Aktivierung mit je 100 μ l 1%-haltigem Formaldehyd abgestoppt und 30 min bei Raumtemperatur zur Fixierung inkubiert. Beachtet wurde, dass bis zum Beginn der Fixierung der Thrombozyten nicht mehr als 1,5 Stunden nach Blutentnahme vergingen. Nach 30 min Inkubation wurde die Fixierung mit 1 ml PBS gestoppt, und die Proben wurden bei 800 xg mit maximaler Bremse (Stufe 9) 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dadurch sanken die Thrombozyten auf den Boden der Probe und der Überstand konnte anschließend mit einer Transferpipette abpipettiert werden. Das Restvolumen in den Polystyrol-Röhrchen betrug anschließend etwa 150 μ l.

Zu den Proben der Funktionstests mit den Aktivierungsmarkern Mepacrine und Fibrinogen wurde erneut je 500 µl PBS hinzugegeben. Diese Proben waren nun fertig für die Messung im Durchflusszytometer.

Zu den anderen Proben wurden jeweils 5 µl von entsprechenden Antikörpern zum Nachweis der Aktivierungsmarker CD62P, CD63, LAMP-1 und vWF gegeben. Der Antikörper gegen den vWF wurde zuvor im Verhältnis 1:100 in PBS, pH 7,4, vorverdünnt. Die Proben inkubierten bei Raumtemperatur für 60 min bei 120 rpm auf dem Schüttler. Danach wurden je 500 µl PBS hinzugegeben und anschließend durchflusszytometrisch gemessen.

3.2.8.5 Durchflusszytometrische Analyse

Die Proben wurden nacheinander im Durchflusszytometer gemessen, wobei sie vor jeder Messung mit Hilfe des Vortexmischers resuspendiert wurden. Pro Probe wurden 10 000 Thrombozyten (10 000 events) bei mittlerer Geschwindigkeit gemessen. Ein Event ist dabei definiert als das Signal, das eine Zelle beim Passieren des Lichtstrahls erzeugt.

Es wurden folgende Spannungen verwendet: bei den Funktionstests mit dem Aktivierungsmarker Mepacrine wurde eine Spannung von 750 im FITC-Kanal, für Fibrinogen eine Spannung von 600 im FITC-Kanal, für CD62P, CD63 und vWF eine Spannung von 640 im FITC-Kanal und für LAMP-1 eine Spannung von 620 im PE-Kanal verwendet.

Mit Hilfe der BD FACS Diva Software wurden die Signale in einem Einzelzelldiagramm („dot-plot“) grafisch dargestellt. Daraus wurde ein bestimmtes Areal abgegrenzt, in dem sich möglichst viele Thrombozyten als Einzelzellen befanden. Von den ermittelten Werten wurde der Mittelwert in einem Excel-Dokument grafisch dargestellt, um die Veränderungen während der Thrombozytenaktivierung in Abhängigkeit von den verschiedenen Konzentrationen der Agonisten zu beurteilen.

4 Ergebnisse

4.1 Deskriptive Statistik

In die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 54 Patient:innen mit Verdacht auf hereditäre nicht-syndromale Thrombozytopathien eingeschlossen; 34 in der Gruppe „Patient:innen mit hämorrhagischer Diathese unklarer Genese“ und 20 in der Gruppe „Patient:innen mit diagnostiziertem vWS Typ 1“. Für die Auswertung wurden diese Gruppen jeweils nach Bestätigung oder Nicht-Bestätigung einer Thrombozytenfunktionsstörung („platelet function disorder“, PFD) weiter unterteilt. Die Gruppe „nicht-bestätigte PFD ohne vWS Typ 1“ (**nbPFD -VWS1**) umfasste 29 Patient:innen, die Gruppe „nicht-bestätigte PFD mit vWS Typ 1“ (**nbPFD +VWS1**) 16 Patient:innen, die Gruppe „bestätigte PFD ohne vWS Typ 1“ (**PFD -VWS1**) 5 Patient:innen und die Gruppe „bestätigte PFD mit vWS Typ 1“ (**PFD +VWS1**) 4 Patient:innen. Weiterhin wurden 18 erwachsene Kontrollproband:innen (**Kontrollen**) eingeschlossen. Die Auswertung erfolgte zunächst in diesen fünf Gruppen; zusätzlich sind die Analysen der 9 Patient:innen mit bestätigter PFD mit und ohne vWS Typ 1 im Vergleich zu den Kontrollproband:innen ausführlicher dargestellt. 9 von 54 Patient:innen mit bestätigter phänotypischer PFD entspricht einer Häufigkeit von 16,67%. Bestätigte PFD dieser Arbeit sind eine Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung (**ADP-ind. PFD**) (1 Patientin), eine Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung (**Epin.-ind. PFD**) (2 Patientinnen), eine „**Gi-like**“ PFD (1 Patient, diese Darstellung findet sich in den Kapiteln der Patient:innen mit Störung der ADP- bzw. Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung) und δ -Storage-Pool-Erkrankungen (**δ -SPD**) (5 Patient:innen).

4.1.1 Patient:innen- und Kontrollproband:innencharakteristika

Die Charakteristika der Patient:innen und Kontrollproband:innen sind in Tabelle 17 aufgeführt. Das Alter der Patient:innen der Gruppe nbPFD -VWS1 lag zum Untersuchungszeitpunkt im Mittel bei 41,83 Jahren (Altersspanne 19 bis 69 Jahre), das der Gruppe nbPFD +VWS1 bei 47,44 Jahren (Altersspanne 18 bis 75 Jahre) und das der Gruppe PFD -VWS1 ähnlich bei 43,20 Jahren (Altersspanne 19 bis 75 Jahre). Zu beachten ist bei allen drei Gruppen die sehr große Breite der Altersspanne. Das mittlere Alter der Gruppe PFD +VWS1 lag mit 31,5 Jahren (Altersspanne 20 bis 50 Jahre) im Vergleich zu den anderen Gruppen etwas niedriger. Aufgrund der verhältnismäßigen Zuordnung von Alter und Geschlecht lag das mittlere Alter der Kontrollproband:innen zum Untersuchungszeitpunkt mit 44,22 Jahren (Altersspanne 24 bis 69 Jahre) ähnlich.

Bei der Verteilung der Geschlechter ist hervorzuheben, dass insgesamt deutlich mehr Frauen als Männer rekrutiert worden sind (z.B. Verhältnis Frauen:Männer: nbPFD -VWS1: 86,2%:13,8%, nbPFD +VWS1: 100%:0%, Kontrollen: 72,2%:27,8%). Dieser geschlechtsspezifische Unterschied war weniger deutlich ausgeprägt, aber ebenso vorhanden bei den bestätigten PFD (Verhältnis Frauen:Männer: PFD -VWS1: 60%:40% und PFD +VWS1: 75%:25%).

In der Familienanamnese bezüglich Blutungsereignissen war in erster Linie ein Unterschied zwischen Patient:innen mit und ohne vWS Typ 1 festzustellen: Patient:innen der Gruppe nbPFD +VWS1 hatten deutlich häufiger eine positive Familienanamnese bezüglich Blutungsereignissen (Verhältnis positiv:negativ: 87,5%:12,5%) als in der Gruppe nbPFD -VWS1 (37,9%:62,1%). Bei Patient:innen mit bestätigter PFD ist dieser Unterschied nicht mehr so deutlich; das Verhältnis zwischen positiver und negativer Familienanamnese bezüglich Blutungsereignissen war etwa ausgewogen (PFD -VWS1: 40%:60%, PFD +VWS1: 50%:50%).

Komorbiditäten der Krankheitsklassen Autoimmunerkrankungen, hämatologische Erkrankungen, kardiovaskuläre Erkrankungen, stattgehabte Thrombosen, neurologische Erkrankungen sowie einige weitere häufig vorkommende Erkrankungen der untersuchten Patient:innen lassen sich ebenso der Tabelle 17 entnehmen; weiterhin vorliegende Komorbiditäten anderer Krankheitsklassen wurden nicht aufgeführt. Bei keiner der Patient:innen lag eine der unter Kapitel 3.2.1.6.2 *Ausschlusskriterien* genannten Erkrankungen wie beispielsweise bestimmte systemische Erkrankungen (wie Urämie, Lebererkrankungen, myeloproliferative Erkrankungen) oder eine aktive Tumorerkrankung vor. Im Rahmen dieser Arbeit sind insbesondere die Thrombozytopenien unter den hämatologischen Erkrankungen hervorzuheben, die vereinzelt in allen Patient:innengruppen vorkamen. In den Gruppen ohne vWS Typ 1 (nbPFD -VWS1 und PFD -VWS1) waren jeweils 2 Patient:innen betroffen, in den Gruppen mit vWS Typ 1 (nbPFD +VWS1 und PFD +VWS1) jeweils eine Patient:in. Weiterhin häufig feststellbare Erkrankungen der Patient:innen über die Gruppen verteilt waren arterielle Hypertonien, Varikosis, Migräne, Schilddrüsenerkrankungen (insbesondere Hypothyreosen) sowie Asthma bronchiale.

Auch die Medikation der aufgeführten Arzneimittelklassen der Patient:innen sind in der Tabelle 17 dargestellt; weiterhin eingenommene Medikamente anderer Arzneimittelklassen wurden nicht aufgeführt. Es erfolgte keine Einnahme von die Thrombozytenfunktion beeinträchtigenden Medikamenten wie beispielsweise Antikoagulanzen, Antifibrinolytika, β -Lactam-Antibiotika, Chemotherapeutika oder NSAIDs ≤ 10 Tagen (siehe Kapitel 3.2.1.6.2 *Ausschlusskriterien*). Häufig eingenommene Medikamente der untersuchten Patient:innen

sind verschiedene Antihypertensiva, Kontrazeptiva, Opioide, Schilddrüsenhormone (L-Thyroxin) und Protonenpumpeninhibitoren.

Tabelle 17: Patient:innen- und Kontrollproband:innencharakteristika. Angabe der Mittelwerte sowie Min.- und Max.werte bzw. Angabe als absolute und relative Häufigkeiten je Gruppe

	Kontrollen (n=18)	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Alter zum Untersuchungszeitpunkt [Jahre]	44,22 (24,00 - 69,00)	41,83 (19,00 - 78,00)	47,44 (18,00 - 75,00)	43,20 (19,00 - 75,00)	31,50 (20,00 - 50,00)
Geschlecht					
Frauen	13 (72,2%)	25 (86,2%)	16 (100%)	3 (60%)	3 (75%)
Männer	5 (27,8%)	4 (13,8%)	0 (0%)	2 (40%)	1 (25%)
Fam. Blutungsereignisse	unbekannt				
positiv		11 (37,9%)	14 (87,5%)	2 (40%)	2 (50%)
negativ		18 (62,1%)	2 (12,5%)	3 (60%)	2 (50%)
Komorbiditäten	unbekannt				
<u>Autoimmun- erkrankungen</u>					
Raynaud-Syndrom		1 (3,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Multiple Sklerose		1 (3,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Hashimoto-Thyreoiditis		2 (6,9%)	2 (12,5%)	0 (0%)	0 (0%)
Morbus Basedow		1 (3,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<u>Hämatologische Erkrankungen</u>					
Thrombozytopenie		2 (6,9%)	1 (6,3%)	2 (40%)	1 (25%)
Leichte Dys- fibrinogenämie		0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)	0 (0%)
Leichter FXIII-Mangel		1 (3,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Leichter Anti-thrombin- Mangel		0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)	0 (0%)
Faktor-V-Leiden- Mutation		1 (3,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Thalassämie		0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)	0 (0%)
<u>Kardiovaskuläre Erkrankungen</u>					
Arterielle Hypertonie		8 (27,6%)	3 (18,8%)	1 (20%)	0 (0%)
Hypotonie		1 (3,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Varikosis		4 (13,8%)	0 (0%)	2 (40%)	0 (0%)
Ösophagusvarizen		1 (3,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Milzarterien- aneurysma		0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)	0 (0%)
<u>Thrombosen:</u>					
Analvenenthrombose		1 (3,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Pfortaderthrombose		1 (3,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<u>Neurologische Erkrankungen</u>					
Migräne		3 (10,3%)	2 (12,5%)	0 (0%)	0 (0%)
Epilepsie		0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)

<u>Weitere häufige Erkrankungen</u>					
Hypothyreose		5 (17,2%)	4 (25%)	2 (40%)	0 (0%)
Hyperthyreose		0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)	0 (0%)
Asthma bronchiale		2 (6,9%)	1 (6,3%)	1 (20%)	0 (0%)
Medikation	unbekannt				
<u>Antihypertensiva:</u>					
ACE-Hemmer		3 (10,3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Sartane		7 (24,1%)	3 (18,8%)	0 (0%)	0 (0%)
Betablocker		6 (20,7%)	3 (18,8%)	0 (0%)	0 (0%)
Calciumkanalblocker		2 (6,9%)	2 (12,5%)	0 (0%)	0 (0%)
<u>Antidepressiva:</u>					
Selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI)		2 (6,9%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Selektive Serotonin- und Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (SSNRI)		1 (3,5%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (50%)
Trizyklische Antidepressiva		1 (3,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Melatonin-Rezeptor-Agonisten		0 (0%)	1 (6,3%)	0 (0%)	0 (0%)
<u>Kontrazeptiva:</u>					
Östrogen-Gestagen-Kombinationen		5 (17,2%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Gestagen-Monopräparate		1 (3,5%)	3 (18,8%)	0 (0%)	0 (0%)
<u>Opioide</u>		4 (13,8%)	1 (6,3%)	0 (0%)	0 (0%)
<u>Antikonvulsiva</u>		0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)
<u>Immunsuppressiva</u>		1 (3,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<u>Weitere häufige Medikamente</u>					
L-Thyroxin		5 (17,2%)	6 (37,5%)	2 (40%)	0 (0%)
Protonenpumpen-Inhibitoren (PPI)		6 (20,7%)	2 (12,5%)	0 (0%)	0 (0%)
Statine		2 (6,9%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Abkürzungen: nb: nicht bestätigt, PFD: Thrombozytenfunktionsstörung („platelet function disorder“), -/+VWS1: ohne/mit von Willebrand-Syndrom Typ 1

4.1.2 Blutzellparameter

Tabelle 18 zeigt die überwiegend normwertigen Blutparameter des kleinen Blutbildes des automatischen Hämatologie-Analysators Leukozyten-, Erythrozyten- und Hämoglobinkonzentration, Hämatokrit, Thrombozytenkonzentration und MPV der Patient:innen und Kontrollproband:innen. Eine Ausnahme stellt die Thrombozytenkonzentration dar; eine Thrombozytopenie (Thrombozytenkonzentration $<150 \times 10^3/\mu\text{l}$) konnte bei einzelnen Patient:innen aller Gruppen festgestellt werden (siehe

oben). Eine Thrombozytose (Thrombozytenkonzentration $>360 \times 10^3/\mu\text{l}$) lag bei keiner der Patient:innen vor.

Tabelle 18: Kleines Blutbild der Patient:innen und Kontrollproband:innen des automatischen Hämatologie-Analysators. Angabe der Mittelwerte sowie Minimal- und Maximalwerte je Gruppe

	Kontrollen (n=18)	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Leukozyten- konzentration [x 10 ³ /μl]	5,42 (3,70 - 7,60)	5,26 (2,60 - 10,50)	5,54 (3,70 - 8,10)	6,02 (3,80 - 7,70)	4,73 (3,00 - 7,10)
Erythrozyten- konzentration [x 10 ⁶ /μl]	4,32 (3,89 - 4,80)	4,26 (3,45 - 5,19)	4,05 (3,31 - 4,48)	4,64 (4,25 - 5,03)	4,38 (4,17 - 4,63)
Hämoglobin- konzentration [g/dl]	13,00 (12,10 - 14,70)	12,65 (10,10 - 14,70)	11,81 (10,70 - 13,70)	13,58 (12,90 - 15,00)	12,95 (11,70 - 14,00)
Hämatokrit [%]	37,52 (34,70 - 42,00)	37,28 (30,00 - 43,20)	35,33 (32,10 - 40,90)	40,36 (38,90 - 43,50)	37,83 (35,80 - 39,20)
Thrombozyten- konzentration [x 10 ³ /μl]	229,80 (160,00 - 307,00)	211,90 (58,00 - 307,00)	228,40 (114,00 - 366,00)	196,60 (36,00 - 340,00)	189,30 (105,00 - 244,00)
MPV [fl]	8,29 (7,30 - 9,90)	8,70 (7,20 - 10,10)	8,42 (7,30 - 10,60)	8,76 (7,80 - 10,30)	8,10 (7,70 - 8,30)

In Tabelle 19 ist das Blutgerinnungsscreening der Patient:innen der hämostaseologischen Ambulanz des CTH und der III. Medizinischen Klinik aus dem Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz dargestellt. Hervorzuheben ist, dass die Werte der Globalgerinnung in allen Gruppen mehrheitlich normwertig sind (beispielsweise liegen alle Quick-Werte im Referenzbereich zwischen 70-130% und alle aPTT-Zeiten im Referenzbereich zwischen 25-37s). Bei den vWF-Parametern der Patient:innen mit vWS Typ 1 (nbPFD +VWS1 und PFD +VWS1) lassen sich niedrigere Werte als bei den Patient:innen ohne vWS Typ 1 (nbPFD -VWS1 und PFD -VWS1) feststellen, jedoch liegen auch diese mehrheitlich im Referenzbereich (beispielsweise finden sich bei der vWF-Aktivität in den Gruppen nbPFD +VWS1 und PFD +VWS1 Mittelwerte von 85,94 und 56,50%; diese liegen niedriger als die Mittelwerte der Gruppen nbPFD -VWS1 und PFD -VWS1 mit 101,10 und 133,80%).

Weiterhin beinhaltet Tabelle 19 die Ergebnisse des Thrombozytenfunktionsanalysators- ("Platelet Function Analyser", PFA) 100 und der Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) nach Born in PRP. Hier wurde dargestellt, ob PFA-100 und LTA nach Born normwertig, 1x auffällig, gleich oder mehr als 2x auffällig oder aufgrund einer zu geringen Thrombozytenkonzentration oder fehlerhafter Präanalytik nicht bestimmt worden sind. Als auffällig werden hier Werte

bezeichnet, die Abweichungen von den in Kapitel 2.2.4 *Diagnostik* genannten Referenzwerten zeigen. Konkrete Messwerte von zwei Untersuchungen der Patient:innen mit bestätigter PFD finden sich im Kapitel 4.1.3. *Ausgewählte Charakteristika von Patient:innen mit bestätigter PFD*. Die Tabelle 19 verdeutlicht, dass trotz des Vorliegens einer PFD der PFA-100 normwertige Ergebnisse aufzeigen kann: 60% der Patient:innen der Gruppe PFD -VWS1 hatten bei Stimulation der Thrombozyten mit dem Agonisten Kollagen/ADP normwertige, 0% gleich oder mehr als 2x auffällige Ergebnisse; bei Stimulation mit dem Agonisten Kollagen/Epinephrin zeigten sich in dieser Gruppe zu 60% gleich oder mehr als 2x auffällige Ergebnisse. Bei den Patient:innen der Gruppe PFD +VWS1 fanden sich hingegen im PFA-100 bei Stimulation mit beiden Agonisten zu 75% gleich oder mehr als 2x auffällige Ergebnisse. Die Ergebnisse des PFA-100 der Patient:innen mit nicht-bestätigten PFD (nbPFD -VWS1 und nbPFD +VWS1) zeigten keinen richtungsweisenden Befund; jedoch war der PFA-100 bei Patient:innen der Gruppe nbPFD +VWS1 häufig gleich oder mehr als 2x auffällig: 62,5% bei Stimulation mit Kollagen/ADP und 75% bei Stimulation mit Kollagen/Epinephrin.

Bei den Patient:innen mit nicht-bestätigter PFD stellte sich die LTA nach Born mehrheitlich normwertig dar. Auch bei den Patient:innen mit bestätigten PFD (PFD -VWS1 und PFD +VWS1) war die LTA nach Born überwiegend normwertig; eine Ausnahme bildet die Zugabe von Epinephrin (PFD -VWS1: 100% $\geq 2x$ auffällige Ergebnisse, PFD +VWS1: 50% $\geq 2x$ und 25% 1 auffälliges Ergebnis) und teilweise bei Zugabe von ADP (PFD -VWS1: 40% $\geq 2x$ auffällige und 20% 1 auffälliges Ergebnis). Eine konkrete Auswertung der LTA nach Born bei Aktivierung der Thrombozyten mit dem Agonisten Ristocetin war aufgrund fehlender Angaben von Referenzwerten des Zentrallabors der Universitätsmedizin Mainz nicht möglich; beim Vergleich der Gruppen untereinander waren die Mediane der erhobenen Prozentwerte am niedrigsten bei Patient:innen mit bestätigter PFD ohne vWS Typ 1 (Ristocetin 0,6 mg/ml: 2,0% und Ristocetin 1,2 mg/ml: 79,6%), gefolgt von bei Patient:innen mit bestätigter PFD mit vWS Typ 1 (Ristocetin 0,6 mg/ml: 4,1% und Ristocetin 1,2 mg/ml: 83,1%) und etwas höher bei Patient:innen mit nicht-bestätigter PFD (nbPFD -VWS1: Ristocetin 0,6 mg/ml: 5,8% und Ristocetin 1,2 mg/ml: 92,4%, nbPFD +VWS1: Ristocetin 0,6 mg/ml: 5,0% und Ristocetin 1,2 mg/ml: 89,2%).

Tabelle 19: Blutgerinnungsscreening der Patient:innen der hämostaseologischen Ambulanz des CTH und der III. Medizinischen Klinik aus dem Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz. Angabe der Mittelwerte sowie Minimal- und Maximalwerte bzw. Angabe als absolute und relative Häufigkeiten je Gruppe

		nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
CRP [mg/l]		1,96 (0,20 - 11,00)	3,33 (0,20 - 11,00)	4,00 (1,40 - 5,50)	3,63 (0,43 - 6,30)
Quick [%]		107,20 (80,00 - 133,00)	111,40 (85,00 - 130,00)	101,00 (92,00 - 111,00)	108,80 (96,00 - 120,00)
INR		0,97 (0,90 - 1,10)	0,96 (0,90 - 1,10)	1,02 (1,00 - 1,10)	0,95 (0,90 - 1,00)
APTT [s]		30,52 (26,50 - 37,70)	31,24 (26,90 - 37,90)	30,04 (25,40 - 36,20)	31,70 (28,90 - 35,80)
Fibrinogen (abgeleitet) [mg/d]		287,88 (205,00 - 411,00)	295,40 (204,00 - 507,00)	289,50 (222,00 - 335,00)	275,80 (260,00 - 291,00)
Fibrinogen (nach Clauss) [mg/dl]		276,60 (175,00 - 453,00)	281,30 (173,00 - 352,00)	312,00 (150,00 - 364,00)	280,00 (265,00 - 295,00)
FVIII:C [%]		124,80 (75,40 - 222,00)	118,70 (75,60 - 239,00)	150,70 (94,60 - 230,00)	88,08 (75,40 - 113,00)
vWF:AG [%]		111,90 (59,00 - 247,00)	98,06 (54,00 - 198,00)	153,20 (93,00 - 220,00)	62,25 (40,00 - 74,00)
vWF-Aktivität [%]		101,10 (55,00 - 268,00)	85,94 (54,00 - 167,00)	133,80 (86,00 - 192,00)	56,50 (34,00 - 71,00)
FXIII [%]		112,70 (75,00 - 150,00)	128,60 (106,00 - 141,00)	108,60 (72,00 - 184,00)	80,00 (80,00 - 80,00)
Kollagenbindungstest [%]		109,30 (52,80 - 242,70)	107,40 (68,70 - 197,50)	152,40 (82,00 - 235,90)	53,53 (42,20 - 68,00)
PFA-100 Kollagen/ ADP	normwertig	14 (48,3%)	5 (31,3%)	3 (60%)	0 (0%)
	1x auffällig ¹	5 (17,2%)	1 (6,3%)	1 (20%)	0 (0%)
	≥2x auffällig ¹	9 (31,0%)	10 (62,5%)	0 (0%)	3 (75%)
	nicht bestimmt ²	1 (3,4%)	0 (0%)	1 (20%)	1 (25%)
PFA-100 Kollagen/ Epinephrin	normwertig	5 (17,2%)	3 (18,8%)	0 (%)	0 (0%)
	1x auffällig ¹	12 (41,4%)	1 (6,3%)	1 (20%)	0 (0%)
	≥2x auffällig ¹	10 (34,5%)	12 (75%)	3 (60%)	3 (75%)
	nicht bestimmt ²	2 (6,9%)	0 (0%)	1 (20%)	1 (25%)
LTA nach Born – Ara- chidonsäure 0,5 mg/ml	normwertig	27 (93,1%)	16 (100%)	4 (80%)	3 (75%)
	1x auffällig ¹	1 (3,4%)	0 (0%)	1 (20%)	0 (0%)
	≥2x auffällig ¹	1 (3,4%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)
LTA nach Born - ADP 10 µM	normwertig	27 (93,1%)	16 (100%)	2 (40%)	3 (75%)
	1x auffällig ¹	2 (6,9%)	0 (0%)	1 (20%)	1 (25%)
	≥2x auffällig ¹	0 (0%)	0 (0%)	2 (40%)	0 (0%)

LTA nach Born - Epinephrin 10 µM	normwertig	21 (72,4%)	11 (68,8%)	0 (0%)	1 (25%)
	1x auffällig ¹	1 (3,4%)	4 (25%)	0 (0%)	1 (25%)
	≥2x auffällig ¹	7 (24,1%)	1 (6,3%)	5 (100%)	2 (50%)
LTA nach Born - Kollagen 10 µg/ml	normwertig	27 (93,1%)	14 (87,5%)	4 (80%)	3 (75%)
	1x auffällig ¹	1 (3,4%)	2 (12,5%)	2 (20%)	0 (0%)
	≥2x auffällig ¹	1 (3,4%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (25%)
LTA nach Born - Ristocetin 0,6 mg/ml [%]	Minimum	2,9	1,8	1,2	0,90
	25% Perzentile	3,7	3,0	1,6	1,2
	Median	5,8	5,0	2,0	4,1
	75% Perzentile	8,3	7,5	4,5	7,1
	Maximum	16,5	9,3	5,6	7,4
LTA nach Born - Ristocetin 1,2 mg/ml [%]	Minimum	82,7	64,7	46,7	69,2
	25% Perzentile	89,1	83,9	61,4	71,8
	Median	92,4	89,2	79,6	83,1
	75% Perzentile	93,9	91,8	92,7	91,7
	Maximum	98,9	95,7	93,5	93,4

¹ Als auffällig werden hier Werte des PFA-100 und der LTA nach Born in PRP bezeichnet, die Abweichungen von den in Kapitel 2.2.4 *Diagnostik* genannten Referenzwerten zeigen

² Nicht bestimmt aufgrund einer zu geringen Thrombozytenkonzentration oder fehlerhafter Präanalytik

4.1.3 Ausgewählte Charakteristika von Patient:innen mit bestätigter PFD

In dieser Arbeit wurde bei 9 der insgesamt 54 eingeschlossenen Patient:innen eine PFD bestätigt, bei 4 dieser Patient:innen (Patient:in 6-9, siehe Tabelle 20) wurde zusätzlich ein vWS Typ 1 diagnostiziert. Tabelle 20 zeigt ausgewählte Charakteristika dieser 9 Patient:innen. Die Altersverteilung wies eine große Spannweite von 19 bis 75 Jahren auf. Die Geschlechterverteilung lag bei doppelt so vielen Frauen wie Männern; zu beachten ist jedoch, dass in die Studie insgesamt auch deutlich mehr Frauen als Männer eingeschlossen wurden. Die Thrombozytenkonzentration war mehrheitlich normwertig, jedoch lag bei zwei Patienten (Patient 1 und 6) eine leichte und bei einer Patientin (Patientin 2) eine ausgeprägte Thrombozytopenie vor. Das MPV der Patient:innen war normwertig, es hatte eine Verteilungsbreite zwischen 7,7 und 10,3fl. Der ISTH-BAT „bleeding score“ war mit Ausnahme einer Patientin (Patientin 4) bei allen Patient:innen erhöht, bei einigen deutlich erhöht (siehe Kapitel 4.2.1 *Erfassung der Blutungseigenanamnese mit Hilfe des ISTH-BAT*). Diagnostizierte PFD waren eine Patientin mit einer Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung (Patientin 9), zwei mit einer Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung (Patientin 4 und 5), ein Patient mit einer “Gi-like” PFD (Patient 3) und fünf mit einer δ-SPD (Patient:innen 1, 2, 6, 7, und 8).

Tabelle 20: Ausgewählte Charakteristika von Patient:innen mit bestätigter PFD

Patient:in	Alter [Jahre]	Geschlecht	VWS1	Thrombozytenkonzentration [$\times 10^3/\mu\text{l}$]	MPV [fl]	ISTH-BAT „bleeding score“	PFD
1	50	männlich	-	116	10,3	10	δ -SPD
2	19	weiblich	-	36	7,8	10	δ -SPD
3	20	männlich	-	215	8,3	8	“Gi-like” PFD
4	75	weiblich	-	340	7,8	5	Epinephrin-ind. PFD
5	52	weiblich	-	276	9,6	11	Epinephrin-ind. PFD
6	31	männlich	+	105	7,7	6	δ -SPD
7	50	weiblich	+	244	8,3	8	δ -SPD
8	25	weiblich	+	188	8,3	15	δ -SPD
9	20	weiblich	+	220	8,1	6	ADP-ind. PFD

Tabelle 21 zeigt die Ergebnisse von Untersuchungen des PFA-100 (Kollagen/ADP und Kollagen/Epinephrin) und der LTA nach Born in PRP (mit den Agonisten Arachidonsäure, ADP, Epinephrin, Kollagen und Ristocetin) aus dem Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz der Patient:innen mit bestätigter PFD. Da nur jeweils zwei von zum Teil mehr erfolgten Untersuchungen der Patient:innen in der Tabelle aufgeführt sind, können die Angaben vereinzelt von der in Tabelle 19 erfolgten Einteilung in normwertig bis gleich oder mehr als 2x auffällig abweichen. Bei einer zu geringen Thrombozytenkonzentration (Patient:innen 2, 6 und teilweise 1) konnte der PFA-100 nicht erhoben werden. Außerdem wurde die LTA nach Born aufgrund fehlerhafter Präanalytik bei den Patientinnen 2 und 9 nur einmal erhoben. Die Tabelle verdeutlicht, dass, wie oben beschrieben, trotz des Vorliegens einer PFD sowohl normwertige Ergebnisse im PFA-100 (beispielsweise bei den Patient:innen 1, 3 und 4 im PFA-100 Kollagen/ADP) und/oder in der LTA nach Born (beispielsweise bei der Patientin 7) als auch auffällige Ergebnisse im PFA-100 (beispielsweise bei den Patient:innen 8 und 9 sowohl bei Stimulation mit Kollagen/ADP als auch bei Kollagen/Epinephrin) und/oder der LTA nach Born (beispielsweise bei den Patient:innen 2 und 6 bei allen Agonisten) feststellbar waren. Hervorzuheben ist, dass die Ergebnisse des PFA-100 Kollagen/Epinephrin bei allen Patient:innen (wenn bestimmbar) auffällige Ergebnisse aufzeigten. Auch die LTA nach Born bei Verwendung des Agonisten Epinephrin zeigte sich, mit Ausnahme der Patientin 7, auffällig.

Tabelle 21: Ergebnisse von jeweils zwei beispielhaften Untersuchungen des PFA-100 und der LTA nach Born in PRP aus dem Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz der Patient:innen mit bestätigter PFD

Patient:in	PFA-100 Kollagen/ADP [s]	PFA-100 Kollagen/Epinephrin [s]	LTA nach Born - Arachidonsäure 0,5 mg/ml [%]	LTA nach Born - ADP 10 µM [%]	LTA nach Born - Epinephrin 10 µM [%]	LTA nach Born - Kollagen 10 µg/ml [%]	LTA nach Born - Ristocetin 0,6 mg/ml [%]	LTA nach Born - Ristocetin 1,2 mg/ml [%]
1	98	176 ¹	72	47,2 ¹	3,2 ¹	64,5	3,1	46,2
	nicht bestimmt	nicht bestimmt	68,7	49,3 ¹	7,8 ¹	73,2	1,0	82,1
2	nicht bestimmt	nicht bestimmt	2,8 ¹	26,4 ¹	4,9 ¹	1,2 ¹	1,9	46,7
	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt
3	92	237 ¹	88,1	40,7 ¹	6,1 ¹	79,3	3,9	93,3
	103	>300 ¹	64,4	46,4 ¹	55,4 ¹	68,2	4,4	68,7
4	103	170 ¹	77,6	79,7	24,7 ¹	88,9	5,6	79,6
	84	165 ¹	83,3	80,4	26,1 ¹	81,7	6,2	83,6
5	122 ¹	196 ¹	82,4	89,5	8,3 ¹	86,6	6,6	89,5
	112	257 ¹	76,1	83,5	24,5 ¹	74,3	5,8	88,9
6	nicht bestimmt	nicht bestimmt	58,3 ¹	55,4 ¹	11,1 ¹	3,8 ¹	4	59,9
	nicht bestimmt	nicht bestimmt	8,6 ¹	68,8	13,5 ¹	13,3 ¹	2,0	79,5
7	130 ¹	194 ¹	71,7	80,9	81,8	62,1	0,9	69,2
	121	293 ¹	92,8	83,6	83,7	94,3	5,4	81,8
8	166 ¹	300 ¹	93,3	89,7	36 ¹	85,9	6,2	93,4
	144 ¹	227 ¹	90,7	76,0	14,2 ¹	88,1	3,7	89,2
9	155 ¹	209 ¹	82,8	73,4	23,6 ¹	78,8	7,4	86,7
	211 ¹	238 ¹	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt	nicht bestimmt

¹ Auffällige Ergebnisse mit Abweichungen von den in Kapitel 2.2.4 *Diagnostik* genannten Referenzwerten

4.1.4 Prävalenzerhebung von Patient:innen mit vermutlich hereditären, nicht-syndromalen Thrombozytopathien der hämostaseologischen Ambulanz des CTH und der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz im Zeitraum September bis November 2018

Ein systematisches Screening der Patient:innen mit hämorrhagischer Diathese der hämostaseologischen Ambulanz des CTH und der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz erfolgte im Zeitraum September bis November 2018. In diesem Zeitraum wurden 37 der insgesamt 54 in die Studie eingeschlossenen Patient:innen rekrutiert und 158 Patient:innen aufgrund der in Tabelle 22 aufgeführten Kriterien ausgeschlossen. Bei 11 der 37 Patient:innen war zusätzlich ein vWS Typ 1 in domo oder extern diagnostiziert. Die

laboranalytischen Messungen der Patient:innen begannen im November 2018 und erfolgten einschließlich der Mehrfachanalysen zur Validierung bis September 2019. Zur Erlangung einer ausreichenden Fallzahl von 14 Personen pro Gruppe (siehe Kapitel 3.2.1.4 *Fallzahlplanung*) und aufgrund weiterer Anfragen der hämostaseologischen Ambulanz des CTH und der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz erfolgte nach dem festgelegten Screeningzeitraum von drei Monaten (September bis November 2018) der Einschluss von 17 weiteren Patient:innen, sodass insgesamt 54 Patient:innen untersucht wurden. Von den 17 weiterhin eingeschlossenen Patient:innen war bei 9 ein vWS Typ 1 in domo oder extern diagnostiziert. Bei 9 der insgesamt 54 eingeschlossenen Patient:innen wurde phänotypisch eine PFD bestätigt, was einer Häufigkeit von 16,67% entspricht.

Da jedoch nur im Zeitraum September bis November 2018 ein systematisches Screening der Patient:innen mit hämorrhagischer Diathese der hämostaseologischen Ambulanz des CTH und der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz stattfand, erfolgte die Prävalenzerhebung ausschließlich mit den in diesem Zeitraum rekrutierten 37 Patient:innen. In diesem Zeitraum konnten 5 PFD bestätigt werden: eine Patientin mit einer Störung der ADP- und eine mit einer Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung, ein Patient mit einer „Gi-like“ PFD und zwei Patient:innen mit einer δ -SPD. Bei zwei der Patient:innen ist zusätzlich ein vWS Typ 1 diagnostiziert (die Patientin mit der Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung und eine mit δ -SPD). Folglich ergibt sich eine Prävalenz von vermutlich hereditären, nicht-syndromalen Thrombozytopathien bei Patient:innen mit hämorrhagischer Diathese unklarer Genese oder mit vWS Typ 1 der hämostaseologischen Ambulanz des CTH und der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz im Zeitraum September bis November 2018 von 13,5% (mit einem Konfidenzintervall von 5,9-28,0%) (siehe Tabelle 23).

Tabelle 22: Ausschlusskriterien durch das systematische Screening der ambulanten Patient:innen mit hämorrhagischer Diathese der hämostaseologischen Ambulanz des CTH und der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz im Zeitraum September bis November 2018. Angabe als absolute Häufigkeiten

Ausschlusskriterien	Anzahl ausgeschlossener Patient:innen
<18 Jahre	0
Schwangerschaft	11
Medikamentös induzierte Blutungsneigungen (z.B. Einnahme von Antikoagulanzen, Antifibrinolytika, Chemotherapeutika)	21
Systemische Erkrankungen (z.B. Urämie, Lebererkrankungen, myeloproliferative Erkrankungen, aktive Tumorerkrankungen)	10
vWS Typ 2 oder 3	19
Erworbenes vWS	9
Andere diagnostizierte hämorrhagische Diathesen (z.B. Hämophilie, diagnostizierte syndromale Thrombozytopathien, relevante Gerinnungsfaktormängel)	61
Kürzlich zurückliegende Operation	1
Eventuell möglicher Einschluss, aber keine weitere Untersuchung gewünscht/ nicht erreichbar	26
	Gesamt: 158

Tabelle 23: Prävalenzerhebung von vermutlich hereditären, nicht-syndromalen Thrombozytopathien bei Patient:innen mit hämorrhagischer Diathese unklarer Genese oder mit vWS Typ 1 der hämostaseologischen Ambulanz des CTH und der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz im Zeitraum September bis November 2018. Angabe als absolute bzw. relative Häufigkeiten

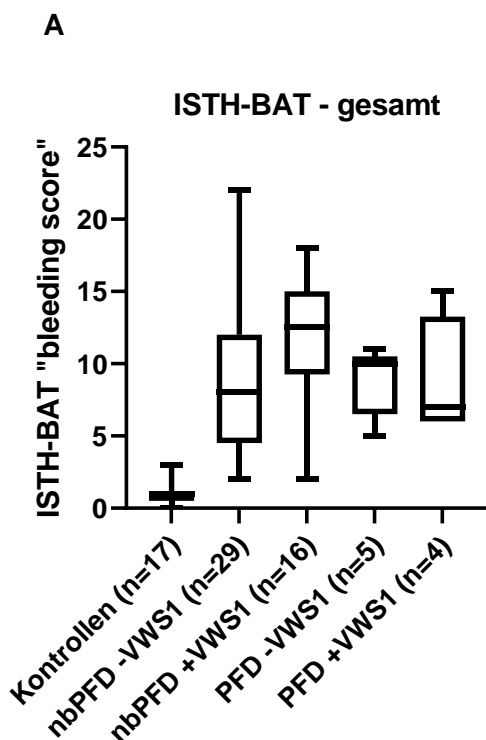
	Anzahl Patient:innen	davon bestätigte PFD	Prävalenz [%] (95%-Konfidenzintervall nach Wilson/Brown [%])
-VWS1	26	3	
+VWS1	11	2	
gesamt	37	5	13,5 (5,9-28,0)

4.2 Explorative Analyse

4.2.1 Erfassung der Blutungseigenanamnese mit Hilfe des ISTH-BAT

Die Erfassung der Blutungseigenanamnese wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des ISTH-BAT durchgeführt. In Abbildung 1 ist der sog. „bleeding score“ aller Patient:innen und Kontrollproband:innen und getrennt nach Geschlechtern dargestellt; Tabelle 24 verdeutlicht dies mit Angabe der Mittelwerte sowie Minimal- und Maximalwerten je Gruppe. Bei den Kontrollproband:innen konnte der ISTH-BAT aus organisatorischen Gründen nur bei 17 der 18 Personen erhoben werden; anamnestisch war auch bei der weiteren Kontrollprobandin

keine Blutungsneigung vorhanden, weshalb bei den weiteren Untersuchungen nicht von einer Verzerrung auszugehen ist. *Statistisch auffällig (siehe Tabelle 25) war der deutliche Unterschied im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen: Der Mittelwert des „bleeding score“ aller Kontrollproband:innen lag bei 1, wohingegen er bei den Patient:innen zwischen 8,35 (nbPFD -VWS1) und 11,63 (nbPFD +VWS1) erhoben wurde. Die Patient:innen der Gruppen mit bestätigter PFD hatten einen Mittelwert von 8,80 (PFD -VWS1) und 8,75 (PFD +VWS1). Auffällig war auch die große Spannweite des „bleeding score“ bei den Patient:innen insgesamt von 2 (Normalwert) bis 22 (deutliche Blutungsneigung). Patient:innen mit bestätigter PFD hatten mit Ausnahme einer Patientin (mit einem grenzwertigen „bleeding score“ von 5) alle einen pathologisch erhöhten „bleeding score“ (ab einem Punktwert von >3 für Männer und >5 für Frauen (144)). Eine sichere Unterscheidung zwischen Patient:innen mit vWS Typ 1 und/oder PFD war anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht möglich. Bei Betrachtung der ISTH-BAT getrennt nach Geschlechtern war festzustellen, dass Patienten mit PFD tendenziell einen etwas höheren „bleeding score“ hatten als Patienten mit nicht-bestätigter PFD: Der Mittelwert des „bleeding score“ der Männer in den Gruppen PFD -VWS1 und PFD +VWS1 lag bei 9 und 6 im Vergleich zur Gruppe nbPFD -VWS1, in der er bei 4,25 lag (die Gruppe nbPFD +VWS1 beinhaltet keine Patienten). Bei den Patientinnen war diese Tendenz nicht festzustellen.



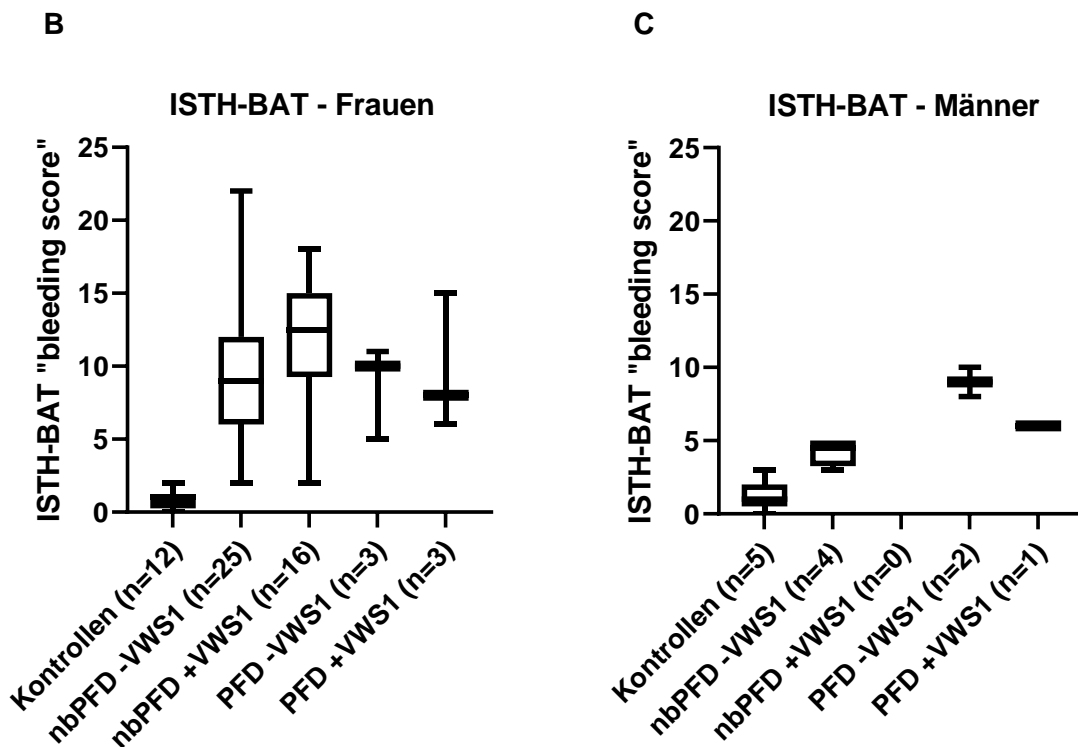


Abbildung 1: ISTH-BAT „bleeding score“ aller Kontrollproband:innen und Patient:innen (A) und getrennt nach Geschlechtern: Frauen (B) und Männer (C). Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe

Tabelle 24: ISTH-BAT „bleeding score“ aller Kontrollproband:innen und Patient:innen und getrennt nach Geschlechtern. Angabe der Mittelwerte (MW) (Normalverteilung) und Mediane (MD) (keine Normalverteilung) (**Zutreffendes hervorgehoben**) sowie Minimal- und Maximalwert je Gruppe

ISTH-BAT - gesamt				
Kontrollen (n=17)	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
MW: 1,00 MD: 1,00 (0,00 - 3,00)	MW: 8,35 MD: 8,00 (2,00 - 22,00)	MW: 11,63 MD: 12,50 (2,00 - 18,00)	MW: 8,80 MD: 10,00 (5,00 - 11,00)	MW: 8,75 MD: 7,00 (6,00 - 15,00)
ISTH-BAT - Frauen				
Kontrollen (n=12)	nbPFD -VWS1 (n=25)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=3)	PFD +VWS1 (n=3)
MW: 0,92 MD: 1,00 (0,00 - 2,00)	MW: 9,00 MD: 9,00 (2,00 - 22,00)	MW: 11,63 MD: 12,50 (2,00 - 18,00)	MW: 8,67 MD: 10,00 (5,00 - 11,00)	MW: 9,67 MD: 8,00 (6,00 - 15,00)
ISTH-BAT - Männer				
Kontrollen (n=5)	nbPFD -VWS1 (n=4)	nbPFD +VWS1 (n=0)	PFD -VWS1 (n=2)	PFD +VWS1 (n=1)
MW: 1,20 MD: 1,00 (0,00 - 3,00)	MW: 4,25 MD: 4,50 (3,00 - 5,00)	-	MW: 9,00 MD: 9,00 (8,00 - 10,00)	MW: 6,00 MD: 6,00 (6,00 - 6,00)

Tabelle 25: p-Werte des ISTH-BAT „bleeding score“ im Vergleich zwischen allen Kontrollproband:innen und Patient:innen und getrennt nach Geschlechtern. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig

ISTH-BAT - gesamt				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=17)	<0,0001* Mann-Whitney- Test	<0,0001* Mann-Whitney- Test	<0,0001* Mann-Whitney- Test	0,0003* Mann-Whitney- Test
ISTH-BAT - Frauen				
	nbPFD -VWS1 (n=25)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=3)	PFD +VWS1 (n=3)
Kontrollen (n=12)	<0,0001* Mann-Whitney- Test	<0,0001* Mann-Whitney- Test	0,0044* Mann-Whitney- Test	0,0044* Mann-Whitney- Test
ISTH-BAT - Männer				
	nbPFD -VWS1 (n=4)	nbPFD +VWS1 (n=0)	PFD -VWS1 (n=2)	PFD +VWS1 (n=1)
Kontrollen (n=5)	0,0032* Unpaired T-Test	-	n zu klein	n zu klein

Die Ergebnisse der einzelnen Abschnitte des ISTH-BAT Epistaxis, kutane Hämorrhagien, Blutungen aus kleinen Wunden, Blutungen in der Mundhöhle, gastrointestinale Blutungen, Hämaturie, Blutungen nach Zahnextraktionen, Blutungen nach Operationen oder größeren Verletzungen, Menorrhagie, postpartale Hämorrhagien, Muskelhämatome, Hämarthros, ZNS-Blutungen und andere Blutungen (wie beispielsweise Nabelblutungen, Blutungen bei Blutentnahmen oder Ovulationsblutungen) aller Kontrollproband:innen und Patient:innen, aus denen sich der „bleeding score“ zusammensetzt, zeigt Tabelle 26. Jeder Abschnitt wurde mit einem Punktwert zwischen 0-4 bewertet. Festzustellen ist, dass die untersuchten Patient:innen vor allem an Blutungen nach Operationen oder größeren Verletzungen (Angabe der Mittelwerte: nbPFD -VWS1: 1,24, nbPFD +VWS1: 2,44, PFD -VWS1: 2,80, PFD +VWS1: 2,50), Menorrhagie (nbPFD -VWS1: 1,38, nbPFD +VWS1: 2,69, PFD -VWS1: 1,00, PFD +VWS1: 1,50) und kutanen Hämorrhagien (nbPFD -VWS1: 1,48, nbPFD +VWS1: 2,06, PFD -VWS1: 0,60, PFD +VWS1: 1,00) litten. Patient:innen der Gruppen mit vWS Typ 1 hatten zudem vermehrt Blutungen nach Zahnextraktionen (nbPFD +VWS1: 2,19 und PFD +VWS1: 2,00). Patient:innen der Gruppe PFD -VWS1 litten im Mittel etwas stärker als die anderen Gruppen an Epistaxis (1,20) und Blutungen aus kleinen Wunden (1,00). Die Kontrollproband:innen gaben am häufigsten Blutungen in der Mundhöhle (0,47) an; festzustellen ist dabei, dass sich diese Angaben nur leicht von denen der Patient:innen unterscheiden (nbPFD -VWS1: 0,55, nbPFD +VWS1: 0,50, PFD -VWS1: 0,80, PFD +VWS1: 0,50). Weitere von den Kontrollproband:innen erwähnte, aber seltener als bei den

Patient:innen vorkommende Blutungssymptome waren kutane Hämorrhagien (0,29) und Blutungen nach Operationen oder größeren Verletzungen (0,18).

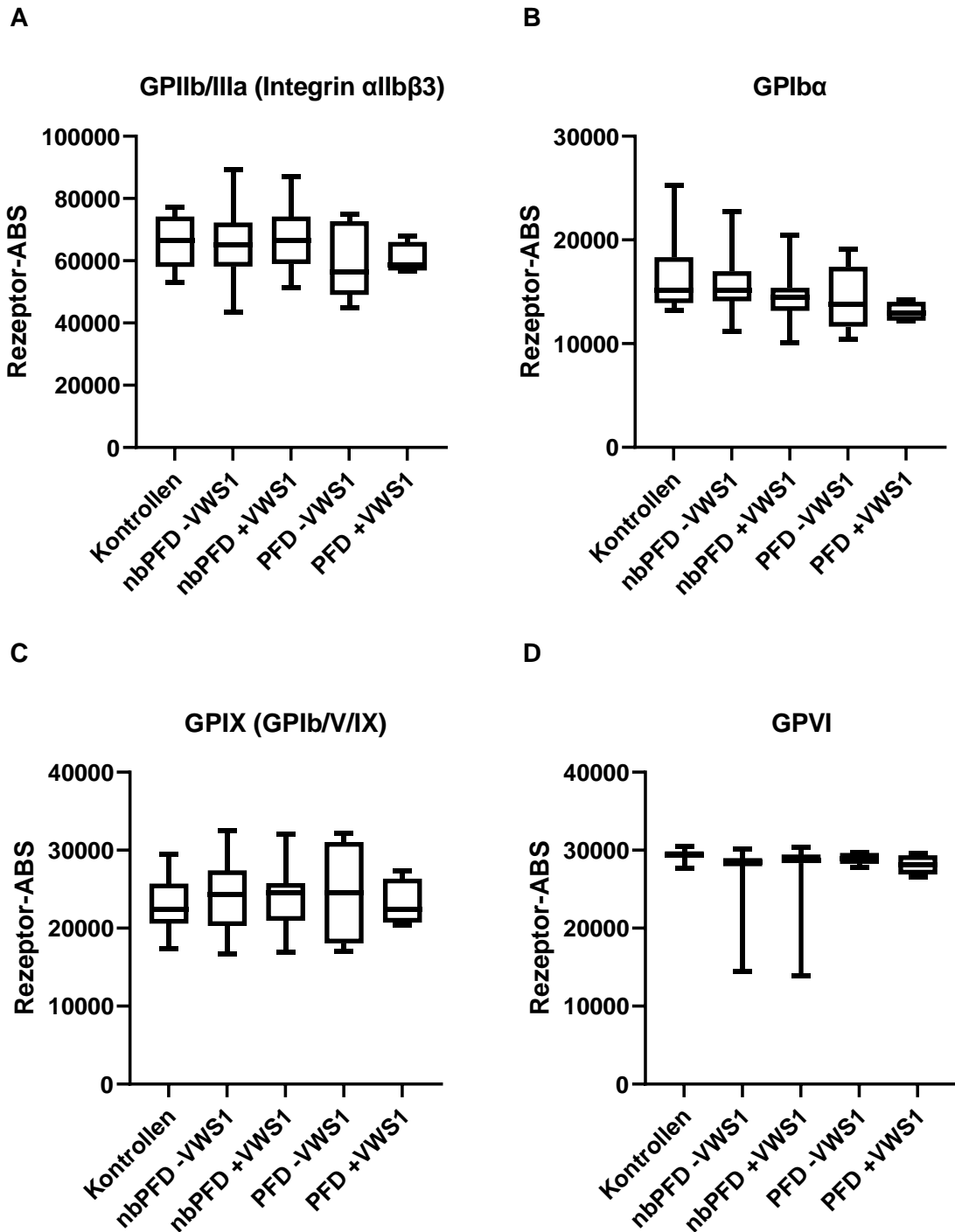
Tabelle 26: Abschnitte des ISTH-BAT aller Kontrollproband:innen und Patient:innen. Angabe der Mittelwerte sowie Minimal- und Maximalwert je Gruppe

	Kontrollen (n=17)	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Epistaxis	0,00 (0,00 - 0,00)	0,93 (0,00 - 4,00)	0,56 (0,00 - 1,00)	1,20 (0,00 - 4,00)	0,25 (0,00 - 1,00)
Kutane Hämorrhagie	0,29 (0,00 - 1,00)	1,48 (0,00 - 3,00)	1,06 (0,00 - 2,00)	0,60 (0,00 - 1,00)	1,00 (1,00 - 1,00)
Blutungen aus kleinen Wunden	0,00 (0,00 - 0,00)	0,59 (0,00 - 3,00)	0,81 (0,00 - 3,00)	1,00 (0,00 - 2,00)	0,50 (0,00 - 1,00)
Blutungen in der Mundhöhle	0,47 (0,00 - 1,00)	0,55 (0,00 - 2,00)	0,50 (0,00 - 2,00)	0,80 (0,00 - 2,00)	0,50 (0,00 - 1,00)
Gastrointestinale Blutungen	0,00 (0,00 - 0,00)	0,17 (0,00 - 2,00)	0,06 (0,00 - 1,00)	0,20 (0,00 - 1,00)	0,00 (0,00 - 0,00)
Hämaturie	0,00 (0,00 - 0,00)	0,10 (0,00 - 2,00)	0,00 (0,00 - 0,00)	0,00 (0,00 - 0,00)	0,00 (0,00 - 0,00)
Blutungen nach Zahnextraktionen	0,00 (0,00 - 0,00)	0,93 (0,00 - 3,00)	2,19 (0,00 - 4,00)	0,40 (0,00 - 2,00)	2,00 (0,00 - 4,00)
Blutungen nach Operationen oder größeren Verletzungen	0,18 (0,00 - 3,00)	1,24 (0,00 - 4,00)	2,44 (0,00 - 4,00)	2,80 (0,00 - 4,00)	2,50 (0,00 - 4,00)
Menorrhagie	0,00 (0,00 - 0,00)	1,38 (0,00 - 4,00)	2,69 (0,00 - 4,00)	1,00 (0,00 - 3,00)	1,50 (0,00 - 4,00)
Postpartale Hämorrhagien	0,00 (0,00 - 0,00)	0,14 (0,00 - 3,00)	0,69 (0,00 - 3,00)	0,00 (0,00 - 0,00)	0,00 (0,00 - 0,00)
Muskelhämatome	0,00 (0,00 - 0,00)	0,07 (0,00 - 2,00)	0,00 (0,00 - 0,00)	0,00 (0,00 - 0,00)	0,00 (0,00 - 0,00)
Hämarthros	0,00 (0,00 - 0,00)	0,28 (0,00 - 3,00)	0,00 (0,00 - 0,00)	0,20 (0,00 - 1,00)	0,00 (0,00 - 0,00)
ZNS-Blutung	0,00 (0,00 - 0,00)	0,14 (0,00 - 4,00)	0,06 (0,00 - 1,00)	0,00 (0,00 - 0,00)	0,00 (0,00 - 0,00)
Andere Blutungen	0,06 (0,00 - 1,00)	0,45 (0,00 - 2,00)	0,75 (0,00 - 1,00)	0,60 (0,00 - 1,00)	0,75 (0,00 - 1,00)

4.2.2 Durchflusszytometrische Quantifizierung der Rezeptor-ABS der Hauptglykoproteine auf der Thrombozytenoberfläche *ex vivo*

Abbildung 2 und Tabelle 27 zeigen die Quantifizierung der Rezeptor-ABS der Hauptglykoproteine GPIIb/IIIa (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$), GPIIb, GPIX (GPIIb/V/IX), GPVI, GPIIa (Integrin β_1) und CD36 auf der Thrombozytenoberfläche *ex vivo* im Vergleich zwischen Patient:innen und Kontrollproband:innen. Die laborintern bestimmte sowie im Literaturvergleich angenommene Anzahl an Rezeptor-ABS pro Thrombozyt findet sich in Kapitel 3.2.7 *Durchflusszytometrische Quantifizierung der Rezeptor-Antigenbindungsstellen (ABS) der Hauptglykoproteine auf der Thrombozytenoberfläche*. Aus Tabelle 28 wird ersichtlich, dass es

überwiegend keine statistischen Auffälligkeiten in der Häufigkeit der Rezeptor-ABS auf der Thrombozytenoberfläche zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen gab. Ausnahmen davon waren folgende: GPIIb wurde statistisch auffällig geringer bei Patient:innen der Gruppe PFD +VWS1 im Vergleich zu den Kontrollproband:innen exprimiert ($p=0,0145$ im Mann-Whitney-Test); gleiches gilt für das GPVI ($p=0,0195$ im Unpaired T-Test). Weiterhin wurden das GPVI und CD36 (FA6.152) statistisch auffällig geringer bei Patient:innen der Gruppe nbPFD -VWS1 im Vergleich zu den Kontrollproband:innen exprimiert (GPVI: $p=0,0003$ im Mann-Whitney-Test, CD36 (FA6.152): $p=0,0070$ im Mann-Whitney-Test).



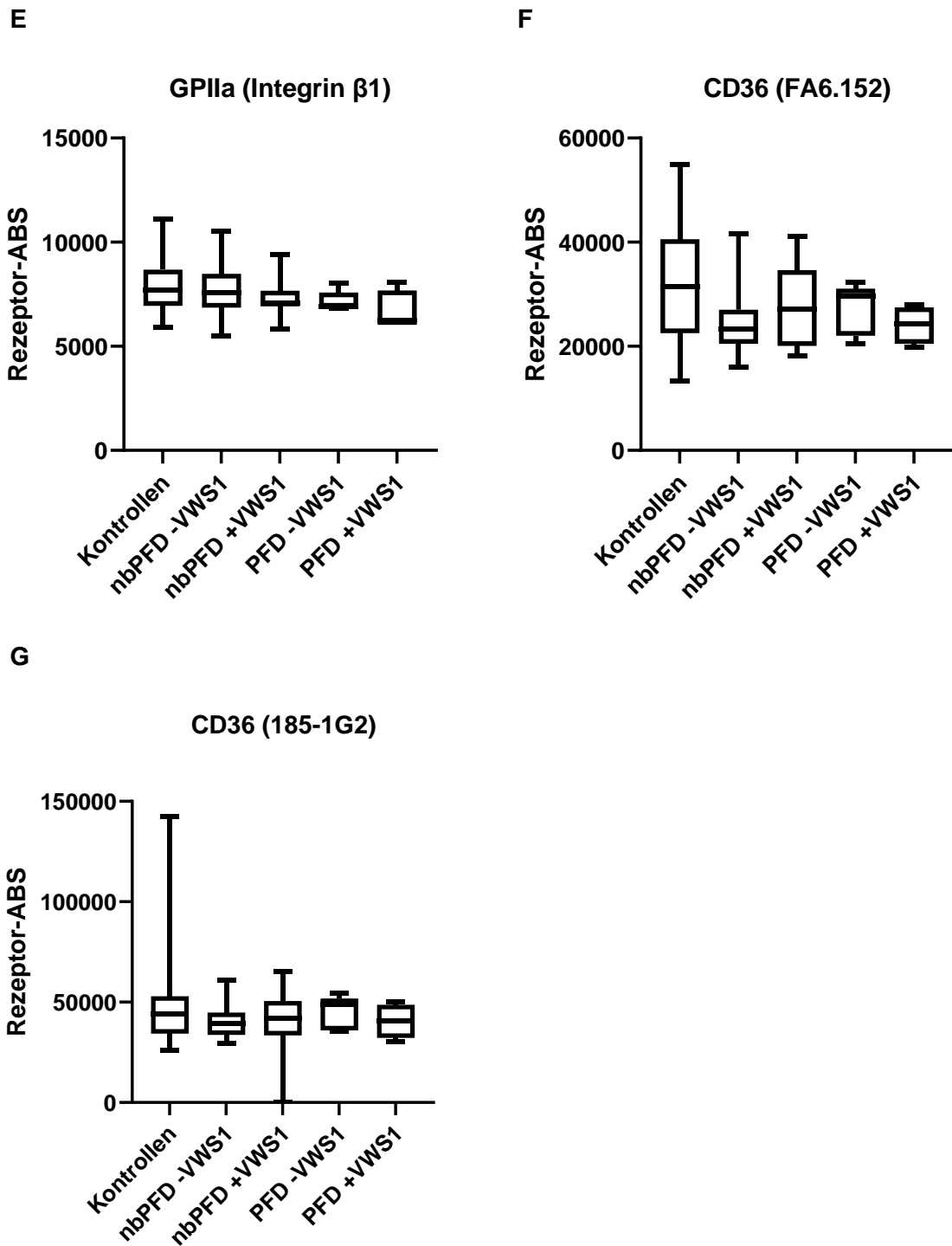


Abbildung 2: Quantifizierung der Rezeptor-ABS der Hauptglykoproteine GPIIb/IIIa (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) (A), GPIIb α (B), GPIX (GPIIb/V/IX) (C), GPVI (D), GPIIa (Integrin β_1) (E) und CD36 (F und G) auf der Thrombozytenoberfläche der Kontrollproband:innen und Patient:innen. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe

Tabelle 27: Quantifizierung der Rezeptor-ABS der Hauptglykoproteine auf der Thrombozytenoberfläche der Kontrollproband:innen und Patient:innen. Angabe der Mittelwerte (MW) (Normalverteilung) und Mediane (MD) (keine Normalverteilung) (**Zutreffendes hervorgehoben**) sowie Minimal- und Maximalwert je Gruppe

Hauptglykoproteine	Kontrollen (n=18)	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
GPIIb/IIIa (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$)	MW: 66104 MD: 66435 (52988 - 77300)	MW: 65250 MD: 65010 (43370 - 89233)	MW: 66730 MD: 66435 (51296 - 87007)	MW: 59987 MD: 56550 (44795 - 74984)	MW: 60580 MD: 58821 (56817 - 67860)
GPIbα	MW: 16081 MD: 15118 (13217 - 25249)	MW: 15741 MD: 15149 (11159 - 22755)	MW: 14510 MD: 14464 (10100 - 20449)	MW: 14389 MD: 13840 (10474 - 19139)	MW: 13045 MD: 12905 (12157 - 14214)
GPIX (GPIb/V/IX)	MW: 22997 MD: 22374 (17381 - 29462)	MW: 24467 MD: 24284 (16641 - 32543)	MW: 23991 MD: 24531 (16888 - 32050)	MW: 24555 MD: 24531 (17011 - 32173)	MW: 23144 MD: 22374 (20463 - 27366)
GPVI	MW: 29287 MD: 29334 (27638 - 30495)	MW: 27608 MD: 28441 (14422 - 30183)	MW: 28014 MD: 28642 (13886 - 30361)	MW: 28950 MD: 28933 (27816 - 29692)	MW: 28140 MD: 28196 (26611 - 29558)
GPIIa (Integrin β_1)	MW: 7834 MD: 7683 (5895 - 11127)	MW: 7665 MD: 7551 (5498 - 10531)	MW: 7257 MD: 7087 (5829 - 9405)	MW: 7153 MD: 6888 (6822 - 8014)	MW: 6657 MD: 6259 (6027 - 8081)
CD36 (FA6.152)	MW: 33052 MD: 31527 (13392 - 54907)	MW: 24410 MD: 23324 (16015 - 41683)	MW: 27408 MD: 27091 (18191 - 41180)	MW: 27175 MD: 29630 (20423 - 32308)	MW: 24092 MD: 24329 (19753 - 27956)
CD36 (185- 1G2)	MW: 48453 MD: 44343 (25934 - 142549)	MW: 40206 MD: 39355 (29380 - 60756)	MW: 40817 MD: 41803 (0,000 - 65108)	MW: 44905 MD: 48786 (35365 - 54589)	MW: 40534 MD: 40715 (30468 - 50237)

Tabelle 28: p-Werte der Quantifizierung der Rezeptor-ABS der Hauptglykoproteine auf der Thrombozytenoberfläche im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig

GPIIb/IIIa (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$)				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,7747 Unpaired T-Test	0,8467 Unpaired T-Test	0,2132 Unpaired T-Test	0,2338 Unpaired T-Test
GPIba				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,9009 Mann-Whitney- Test	0,1368 Mann-Whitney- Test	0,3630 Mann-Whitney- Test	0,0145* Mann-Whitney- Test
GPIX (GPIb/V/IX)				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,2375 Unpaired T-Test	0,4428 Unpaired T-Test	0,4849 Unpaired T-Test	0,9406 Unpaired T-Test
GPVI				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,0003* Mann-Whitney- Test	0,0892 Mann-Whitney- Test	0,3630 Unpaired T-Test	0,0195* Unpaired T-Test
GPIIa (Integrin β_1)				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,6673 Unpaired T-Test	0,1449 Unpaired T-Test	0,1663 Mann-Whitney- Test	0,0959 Unpaired T-Test
CD36 (FA6.152)				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,0070* Mann-Whitney- Test	0,1187 Unpaired T-Test	0,3046 Unpaired T-Test	0,1630 Unpaired T-Test
CD36 (185-1G2)				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,2511 Mann-Whitney- Test	0,5914 Mann-Whitney- Test	0,8006 Mann-Whitney- Test	0,5381 Mann-Whitney- Test

4.2.3 Durchflusszytometrische Erhebung der vWF-Bindung an den thrombozytären Rezeptor GPIIb *in vitro* (Agonistentitration)

Für die durchflusszytometrische Erhebung der vWF-Bindung an den thrombozytären Rezeptor GPIIb *in vitro* wurde die basale sowie die Agonisten-induzierte vWF-Bindung erhoben.

Verwendet wurde der Agonist Ristocetin, welcher die Affinität des vWF zum GPIIb/IIIa erhöht und daher geeignet ist, die An- oder Abwesenheit des vWF zu prüfen. Hier dargestellt wurden die Patient:innen getrennt nach dem Vorliegen oder Nicht-Vorliegen eines vWS Typ 1 (+VWS1 und -VWS1). Eine Person der Gruppe -VWS1 wurde aufgrund eines technischen Fehlers aus der Auswertung herausgenommen.

4.2.3.1 Basale vWF-Bindung

Die Basalwerte der vWF-Bindung ohne Zugabe von Agonisten verdeutlicht Abbildung 3. In allen Gruppen zeigte sich eine niedrige mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), da sich die Thrombozyten in diesem Zustand in Ruhe befinden. Bei Patient:innen der Gruppen -VWS1 und +VWS1 war eine statistisch auffällige Erniedrigung im Vergleich zu den Kontrollproband:innen festzustellen (-VWS1: $p=0,0141$ im Mann-Whitney-Test, +VWS1: $p=0,0016$ im Mann-Whitney-Test, siehe Tabelle 29).

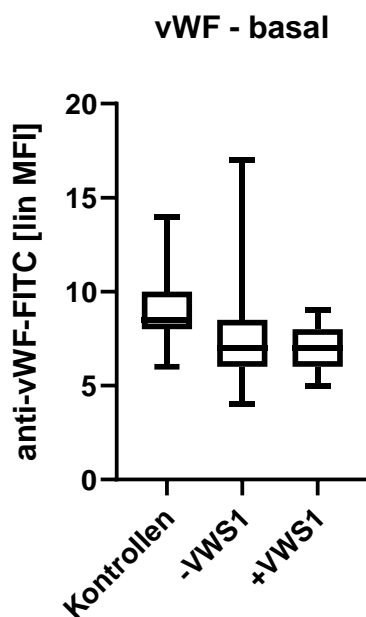


Abbildung 3: Basalwerte der vWF-Bindung. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe

Tabelle 29: p -Werte der Basalwerte der vWF-Bindung im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig

	vWF - basal	
	-VWS1 (n=33)	+VWS1 (n=20)
Kontrollen (n=18)	0,0141* Mann-Whitney-Test	0,0016* Mann-Whitney-Test

4.2.3.2 Agonisten-induzierte vWF-Bindung

4.2.3.2.1 Ristocetin-induzierte vWF-Bindung

Die Aktivierung der Thrombozyten mit dem Agonisten Ristocetin erfolgte in aufsteigenden Konzentrationen (0,4, 0,6, 0,8 und 1 mg/ml). Es war eine konzentrationsabhängige Steigerung der vWF-Bindung an den thrombozytären Rezeptor GPIIb/IIIa sowohl bei den Kontrollproband:innen als auch bei allen Patient:innen festzustellen, was sich in einer Zunahme der Fluoreszenzintensität äußerte. In Abbildung 4 ist die Aktivierung mit 1 mg/ml Ristocetin abgebildet: Es war weiterhin eine statistisch auffällige Erniedrigung der vWF-Bindung bei Patient:innen der Gruppe +VWS1 im Vergleich zu den Kontrollproband:innen vorhanden ($p=0,0402$ im unpaired T-Test, siehe Tabelle 30); nicht mehr statistisch auffällig war diese Erniedrigung bei den Patient:innen der Gruppe -VWS1.

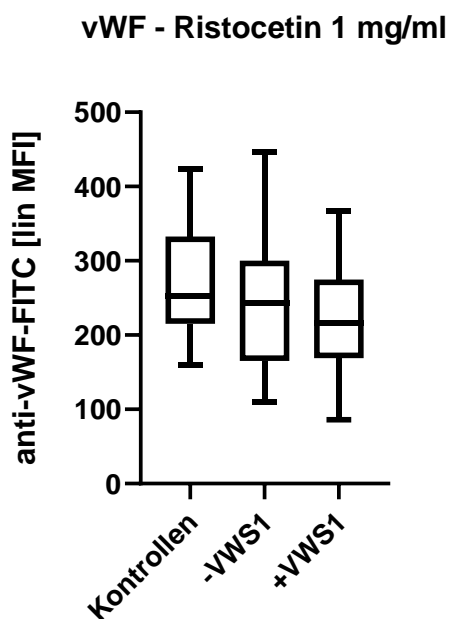


Abbildung 4: Ristocetin-induzierte Fibrinogenbindung nach Zugabe von 1,0 mg/ml Ristocetin. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe

Tabelle 30: *p*-Werte der Ristocetin-induzierten vWF-Bindung nach Zugabe von 1,0 mg/ml Ristocetin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig

vWF - Ristocetin 1 mg/ml		
	-VWS1 (n=33)	+VWS1 (n=20)
Kontrollen (n=18)	0,1839 Unpaired T-Test	0,0402* Unpaired T-Test

4.2.4 Durchflusszytometrische Erhebung der Aktivierung des thrombozytären Rezeptors GPIIb/IIIa (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) quantifiziert durch die Fähigkeit der Fibrinogenbindung *ex vivo* und *in vitro* (Agonistentitration)

Für die durchflusszytometrische Analyse des Aktivierungsstatus des thrombozytären Rezeptors GPIIb/IIIa (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) *ex vivo* und *in vitro* wurde die Fähigkeit, extern zugesetztes Fibrinogen ohne und mit Zugabe der Agonisten ADP, Epinephrin, Convulxin und Thrombin zu binden, erhoben. Eine Person der Gruppe nbPFD +VWS1 wurde bei der Thrombin-induzierten Fibrinogenbindung der Konzentration 0,2 U/ml aufgrund eines technischen Fehlers aus der Auswertung herausgenommen.

4.2.4.1 Basale Fibrinogenbindung

Die Fähigkeit, extern zugesetztes Fibrinogen ohne Zugabe von Agonisten zu binden, ist in Abbildung 5 dargestellt und dient der Beurteilung des basalen Aktivierungszustandes des Rezeptors GPIIb/IIIa. Aus Tabelle 31 ist ersichtlich, dass es keine statistischen Auffälligkeiten der Basalwerte der Fibrinogenbindung im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen gab.

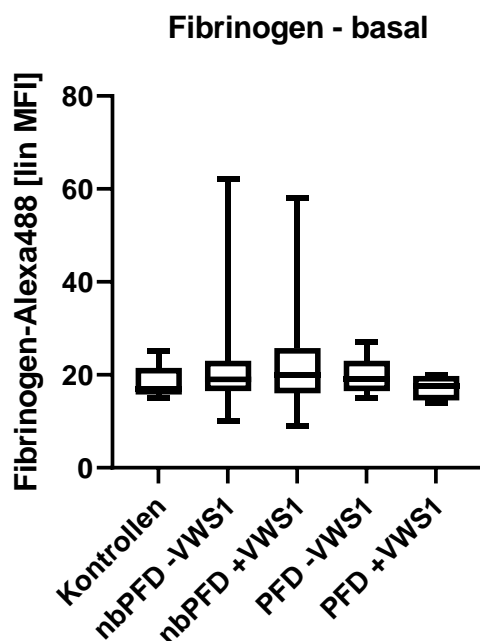


Abbildung 5: Basalwerte der Fibrinogenbindung von extern zugesetztem Fibrinogen. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe

Tabelle 31: p-Werte der Basalwerte der Fibrinogenbindung von extern zugesetztem Fibrinogen im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig

	Fibrinogen - basal			
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,3073 Mann-Whitney- Test	0,2526 Mann-Whitney- Test	0,6216 Mann-Whitney- Test	0,5779 Mann-Whitney- Test

4.2.4.2 Agonisten-induzierte Fibrinogenbindung

4.2.4.2.1 ADP-induzierte Fibrinogenbindung

Nach Aktivierung der Thrombozyten mit dem Agonisten ADP in aufsteigenden Konzentrationen (0,125, 0,25 und 0,75 μM) nahm die Fibrinogenbindung am Rezeptor GPIIb/IIIa sowohl bei den Kontrollproband:innen als auch bei den Patient:innen deutlich zu, wie Abbildung 6 für die Aktivierung mit 0,75 μM ADP veranschaulicht. Eine statistische Auffälligkeit im Vergleich zwischen den Kontrollproband:innen und den Patient:innengruppen zeigte sich nicht (siehe Tabelle 32). Die Darstellung der vollständig durchgeführten Agonistentitration bei Patient:innen, bei denen eine Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung bzw. eine „Gi-like“ PFD festgestellt wurde, findet sich in Kapitel 4.2.6.1 *Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung*.

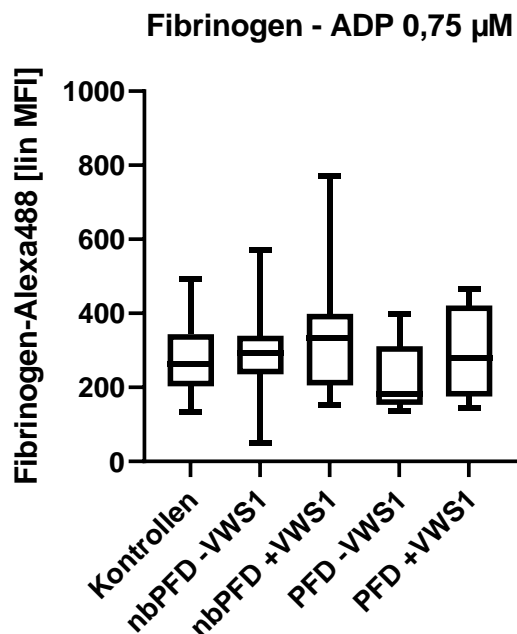


Abbildung 6: ADP-induzierte Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0,75 μM ADP. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe

Tabelle 32: p-Werte der ADP-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0,75 μM ADP im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig

Fibrinogen - ADP 0,75 μM				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,8350 Unpaired T-Test	0,7017 Mann-Whitney- Test	0,1964 Unpaired T-Test	0,9721 Unpaired T-Test

4.2.4.2.2 Epinephrin-induzierte Fibrinogenbindung

Auch nach Aktivierung der Thrombozyten mit Epinephrin in aufsteigenden Konzentrationen (1, 5, 10 und 20 μM) nahm die Fibrinogenbindungskapazität der Thrombozyten in allen Gruppen zu, wie Abbildung 7 für Aktivierung mit 20 μM Epinephrin zeigt. Am geringsten ausgeprägt war diese Zunahme in der Gruppe PFD -VWS1, was sich im Vergleich zu den Kontrollproband:innen auch statistisch auffällig darstellte ($p=0,0228$ im Mann-Whitney-Test, siehe Tabelle 33). Zu beachten ist, dass sich in dieser Gruppe alle Patient:innen befinden, bei denen eine Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung oder eine „Gi-like“ PFD festgestellt wurde. Die Darstellung der vollständig durchgeführten Agonistentitration dieser Patient:innen findet sich in Kapitel 4.2.6.2 *Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung*.

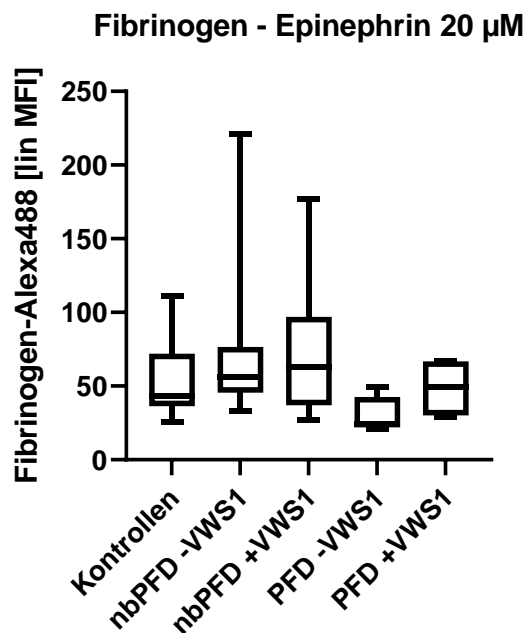


Abbildung 7: Epinephrin-induzierte Fibrinogenbindung nach Zugabe von 20 μM Epinephrin. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe

Tabelle 33: p-Werte der Epinephrin-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe von 20 μ M Epinephrin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig

Fibrinogen - Epinephrin 0,75 μ M				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,0663 Mann-Whitney- Test	0,2546 Mann-Whitney- Test	0,0228* Mann-Whitney- Test	0,6072 Mann-Whitney- Test

4.2.4.2.3 Convulxin-induzierte Fibrinogenbindung

Die thrombozytäre Aktivierung durch aufsteigende Konzentrationen von Convulxin (1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml) zeigte ebenfalls eine deutliche Zunahme der Fibrinogenbindung in allen Gruppen (siehe Abbildung 8 für die Konzentrationen 5 und 20 ng/ml). Eine statistische Auffälligkeit im Vergleich zu den Kontrollproband:innen stellte sich in keiner der Patient:innengruppen dar (siehe Tabelle 34); tendenziell war jedoch in den Gruppen der Patient:innen mit bestätigter PFD (PFD -VWS1 und PFD +VWS1) eine etwas geringere Zunahme der Fibrinogenbindungskapazität der Thrombozyten festzustellen.

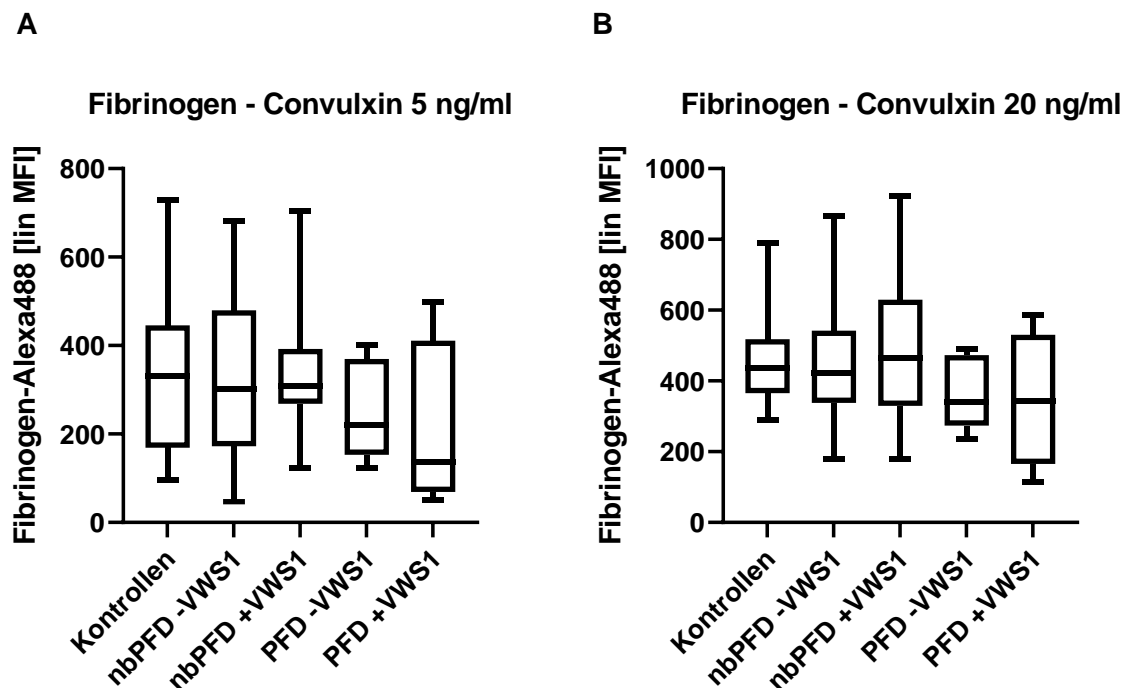


Abbildung 8: Convulxin-induzierte Fibrinogenbindung nach Zugabe von 5 (A) und 20 (B) ng/ml Convulxin. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe

Tabelle 34: p-Werte der Convulxin-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe von 5 und 20 ng/ml Convulxin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig

Fibrinogen - Convulxin 5 ng/ml				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,6487 Unpaired T-Test	0,9938 Unpaired T-Test	0,3016 Unpaired T-Test	0,1887 Unpaired T-Test
Fibrinogen - Convulxin 20 ng/ml				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,6938 Unpaired T-Test	0,7586 Unpaired T-Test	0,1569 Unpaired T-Test	0,1609 Unpaired T-Test

4.2.4.2.4 Thrombin-induzierte Fibrinogenbindung

Auch die Aktivierung der Thrombozyten durch den Agonisten Thrombin in aufsteigenden Konzentrationen (0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml) zeigte eine deutliche Zunahme der Fibrinogenbindung in allen Gruppen, wie Abbildung 9 für die Konzentrationen 0,1 und 0,2 U/ml veranschaulicht. Eine statistische Auffälligkeit im Vergleich zu den Kontrollproband:innen zeigte sich in keiner der Patient:innengruppen (siehe Tabelle 35).

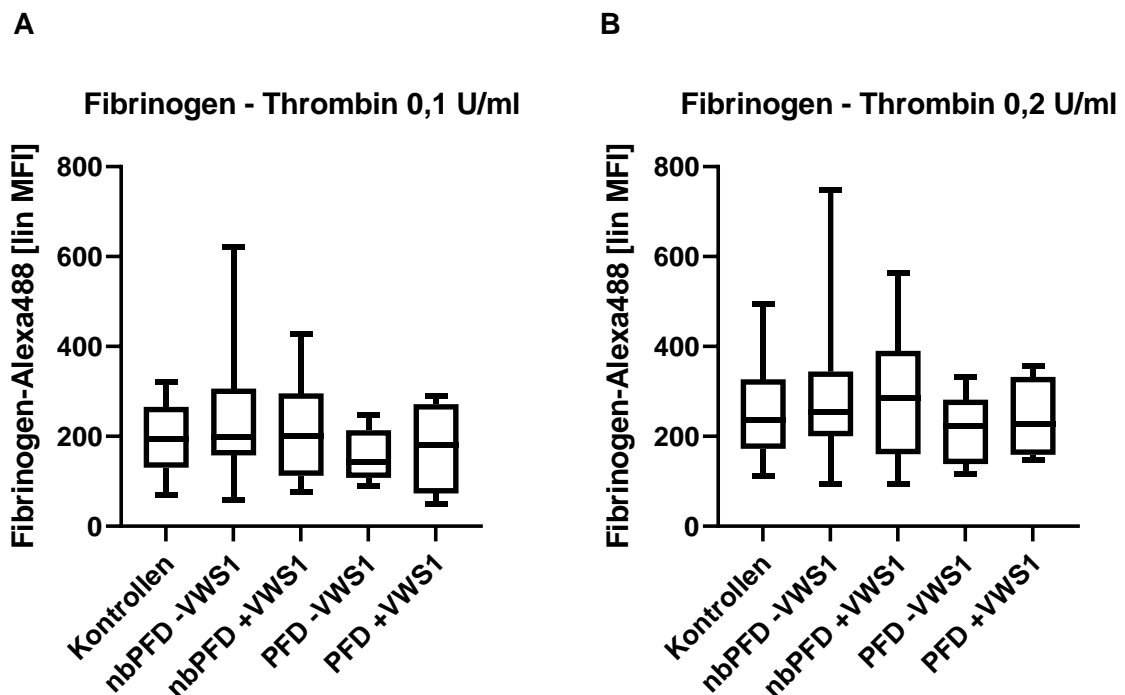


Abbildung 9: Thrombin-induzierte Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0,1 (A) und 0,2 (B) U/ml Thrombin. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe

Tabelle 35: p-Werte der Thrombin-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig

Fibrinogen - Thrombin 0,1 U/ml				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,4411 Mann-Whitney- Test	0,7144 Unpaired T-Test	0,3190 Unpaired T-Test	0,6598 Unpaired T-Test
Fibrinogen - Thrombin 0,2 U/ml				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=15)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,5189 Mann-Whitney- Test	0,3950 Unpaired T-Test	0,3891 Unpaired T-Test	0,7656 Unpaired T-Test

4.2.5 Durchflusszytometrische Erhebung der thrombozytären Granulasekretion *in vitro* durch Induktion der CD62P- (α -Granula), CD63- (δ -Granula und Lysosomen) und LAMP-1- (Lysosomen) Oberflächen-Expression (Agonistentitration)

Die durchflusszytometrische Erhebung der thrombozytären Granulasekretion *in vitro* wurde durch Induktion der CD62P-, CD63- und LAMP-1-Oberflächen-Expression durch Aktivierung der Thrombozyten mit den Agonisten Convulxin und Thrombin durchgeführt. CD62P ist ein Membranmarker zur Beurteilung der Exozytose der α -Granula, CD63 für die δ -Granula und Lysosomen und LAMP-1 für die Lysosomen. Eine Person der Gruppe nbPFD +VWS1 wurde wieder bei der Thrombin-induzierten CD62- und CD63-Oberflächen-Expression der Konzentration 0,2 U/ml aufgrund des technischen Fehlers aus der Auswertung herausgenommen. Weiterhin wurde die Granulasekretion durch Freisetzung von Mepacrine aus den δ -Granula erhoben; diese Darstellung findet sich in der konfirmatorischen Analyse in Kapitel 4.3.1 *Durchflusszytometrische Erhebung der thrombozytären Mepacrineaufnahme in die δ -Granula ex vivo und der δ -Granulasekretion durch Mepacrinefreisetzung in vitro (Agonistentitration)*.

4.2.5.1 Basale CD62P-Oberflächen-Expression

Durch die CD62P-Oberflächen-Expression lässt sich die Freisetzung der α -Granula beurteilen. Ohne Zugabe von Agonisten wurden tendenziell etwas geringere Basalwerte bei den Patient:innen im Vergleich zu den Kontrollproband:innen gemessen, wie Abbildung 10

veranschaulicht. Statistisch auffällig war dies in den Gruppen nbPFD -VWS1 ($p=0,0151$ im Mann-Whitney-Test) und nbPFD +VWS1 ($p=0,0055$ im unpaired T-Test) (siehe Tabelle 36).

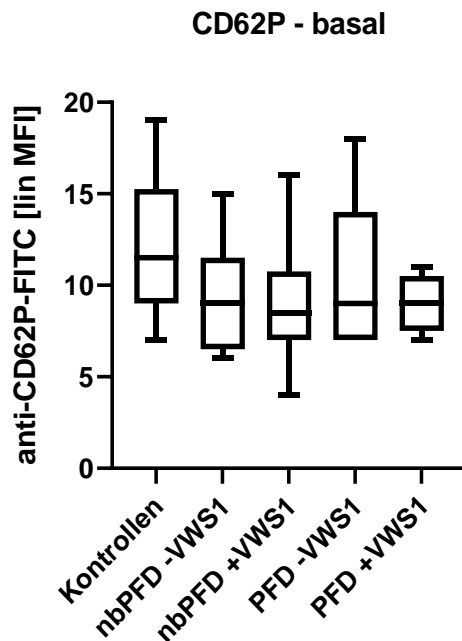


Abbildung 10: Basalwerte der CD62P-Oberflächen-Expression. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe

Tabelle 36: p-Werte der Basalwerte der CD62P-Oberflächen-Expression im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig

CD62P - basal				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,0151* Mann-Whitney- Test	0,0055* Unpaired T-Test	0,3327 Unpaired T-Test	0,1198 Unpaired T-Test

4.2.5.2 Agonisten-induzierte CD62P-Oberflächen-Expression

4.2.5.2.1 Convulxin-induzierte CD62P-Oberflächen-Expression

Die CD62P-Oberflächen-Expression nach Aktivierung mit Convulxin in aufsteigenden Konzentrationen (1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml) ist in Abbildung 11 für die Konzentrationen 5 und 20 ng/ml dargestellt. Nach Aktivierung mit 5 ng/ml Convulxin war eine insgesamt vermehrte, im Vergleich zu den Kontrollproband:innen jedoch tendenziell verminderte Expression bei Patient:innen mit bestätigter PFD (PFD -VWS1 und PFD +VWS1) festzustellen, jedoch nicht

statistisch auffällig. Diese Tendenz zeigte sich kaum mehr bei der Aktivierung mit 20 ng/ml; eine statistische Auffälligkeit war hier in keiner der Gruppen festzustellen (siehe Tabelle 37).

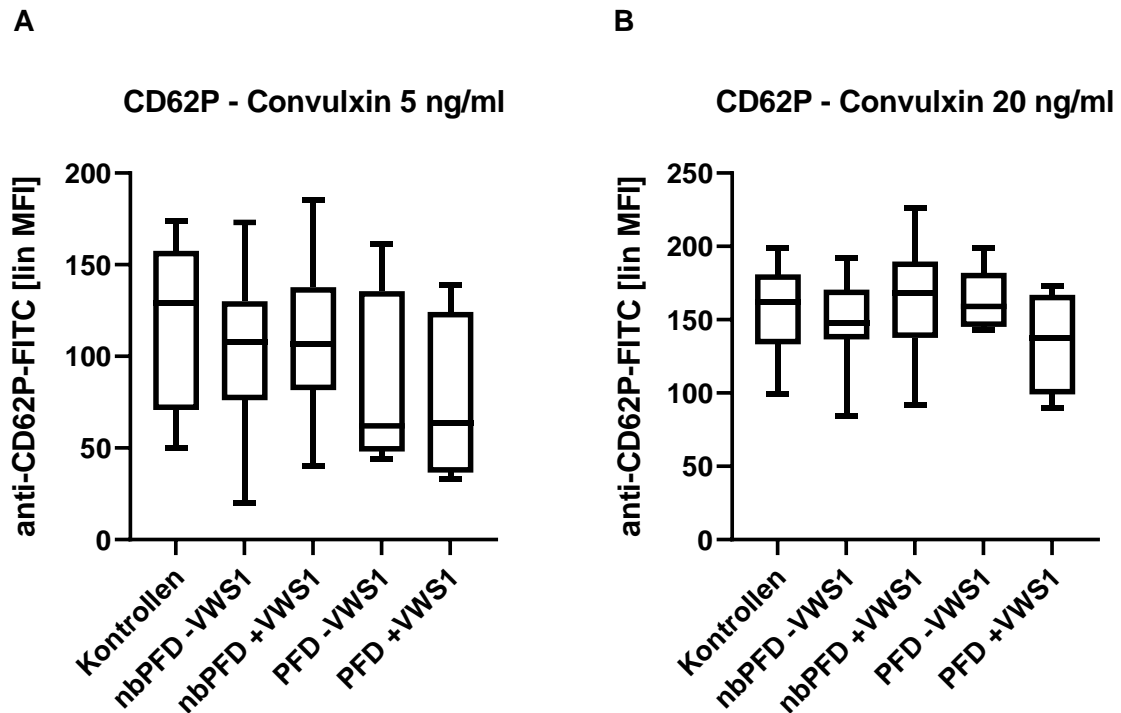


Abbildung 11: CD62P-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 5 (A) und 20 (B) ng/ml Convulxin. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe

Tabelle 37: p-Werte der CD62P-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 5 und 20 ng/ml Convulxin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig

CD62P - Convulxin 5 ng/ml				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,3095 Mann-Whitney- Test	0,7142 Mann-Whitney- Test	0,1467 Mann-Whitney- Test	0,1215 Mann-Whitney- Test
CD62P - Convulxin 20 ng/ml				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,6139 Unpaired T-Test	0,3745 Unpaired T-Test	0,6646 Unpaired T-Test	0,2547 Unpaired T-Test

4.2.5.2.2 Thrombin-induzierte CD62P-Oberflächen-Expression

Nach Aktivierung der Thrombozyten mit Thrombin in aufsteigenden Konzentrationen (0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml), siehe Abbildung 12 für die Konzentrationen 0,1 und 0,2 U/ml, zeigte

sich ebenfalls eine insgesamt vermehrte, jedoch bei den Patient:innen verminderte CD62P-Oberflächen-Expression im Vergleich zu den Kontrollproband:innen. Statistisch auffällig war diese bei beiden Thrombin-Konzentrationen in den Gruppen nbPFD -VWS1 (0,1 U/ml: $p=0,0314$ im Mann-Whitney-Test und 0,2 U/ml: $p=0,0213$ im unpaired T-Test), nbPFD +VWS1 (0,1 U/ml: $p=0,0107$ im Mann-Whitney-Test und 0,2 U/ml: $p=0,0472$ im unpaired T-Test) und bei 0,1 U/ml Thrombin in der Gruppe PFD -VWS1 ($p=0,0489$ im unpaired T-Test). In der Gruppe PFD +VWS1 ist diese Tendenz ebenfalls vorhanden, jedoch nicht statistisch auffällig (siehe Tabelle 38).

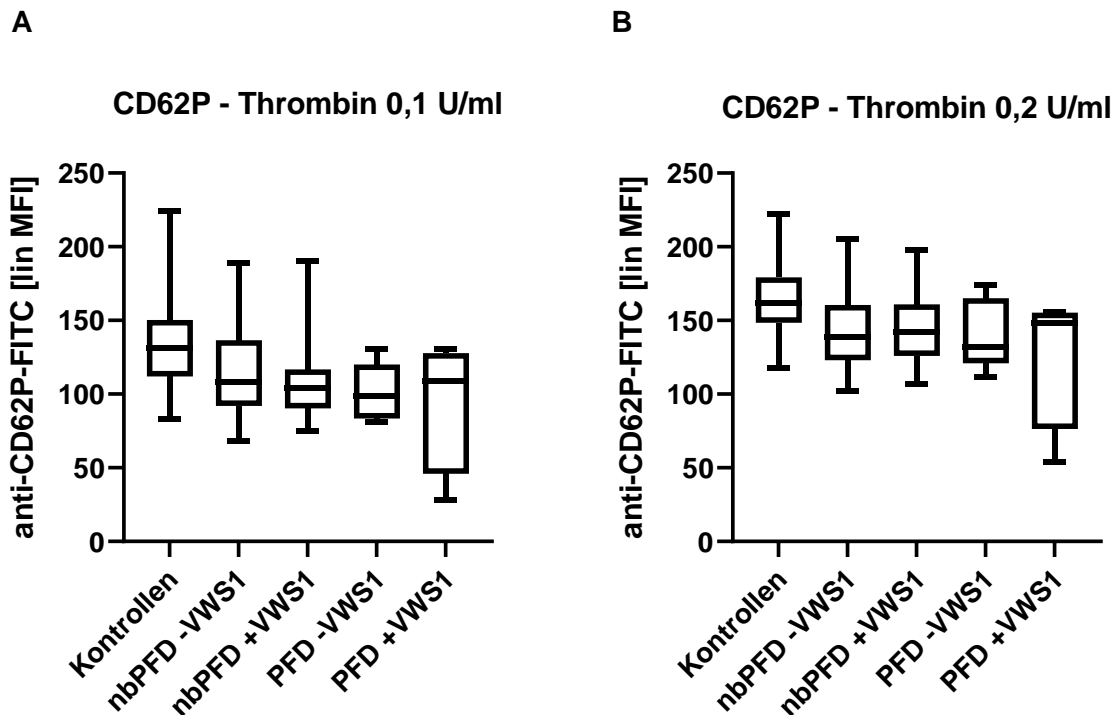


Abbildung 12: CD62P-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0,1 (A) und 0,2 (B) U/ml Thrombin. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe

Tabelle 38: p -Werte der CD62P-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig

CD62P - Thrombin 0,1 U/ml				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,0314* Mann-Whitney- Test	0,0107* Mann-Whitney- Test	0,0489* Unpaired T-Test	0,0554 Unpaired T-Test
CD62P - Thrombin 0,2 U/ml				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=15)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,0213* Unpaired T-Test	0,0472* Unpaired T-Test	0,1212 Unpaired T-Test	0,0956 Mann-Whitney- Test

4.2.5.3 Basale CD63-Oberflächen-Expression

Für die Beurteilung der Freisetzung der δ -Granula und der Lysosomen dient die Erhebung der CD63-Oberflächen-Expression. Abbildung 13 und Tabelle 39 verdeutlichen, dass es keine statistischen Auffälligkeiten der Basalwerte der CD63-Oberflächen-Expression ohne Zugabe von Agonisten im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen gab.

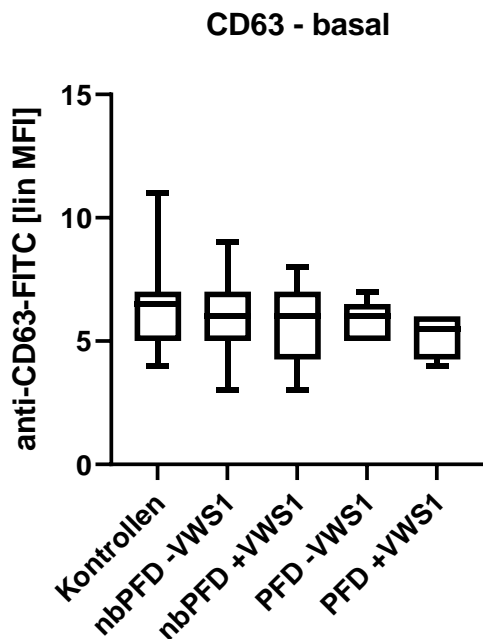


Abbildung 13: Basalwerte der CD63-Oberflächen-Expression. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe

Tabelle 39: p-Werte der Basalwerte der CD63-Oberflächen-Expression im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig

CD63 - basal				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,4601 Mann-Whitney- Test	0,6129 Mann-Whitney- Test	0,6512 Mann-Whitney- Test	0,2647 Mann-Whitney- Test

4.2.5.4 Agonisten-induzierte CD63-Oberflächen-Expression

4.2.5.4.1 Convulxin-induzierte CD63-Oberflächen-Expression

Abbildung 14 zeigt, dass der Agonist Convulxin eine Steigerung der CD63-Oberflächen-Expression nach Aktivierung der Thrombozyten in aufsteigenden Konzentrationen (1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml, hier dargestellt die Konzentrationen 5 und 20 ng/ml) sowohl bei den Kontrollproband:innen als auch bei den Patient:innen induzierte. Diese Steigerung war bei den Patient:innen fast aller Gruppen im Vergleich zu den Kontrollproband:innen bei beiden Konzentrationen statistisch auffällig geringer ausgeprägt (nbPDF -VWS1: 5 ng/ml: $p=0,0157$ im Mann-Whitney-Test und 20 ng/ml: $p=0,0193$ im unpaired T-Test, nbPDF +VWS1: 5 ng/ml: $p=0,0397$ im Mann-Whitney-Test und 20 ng/ml: $p=0,0099$ im unpaired T-Test, PDF +VWS1: 5 ng/ml: $p=0,0317$ im Mann-Whitney-Test und 20 ng/ml: $p=0,0237$ im unpaired T-Test, siehe Tabelle 40). Eine Ausnahme stellt die Gruppe PFD -VWS1 dar: Tendenziell war dort ebenfalls eine geringere CD63-Oberflächen-Expression ersichtlich, jedoch nicht statistisch auffällig (siehe Abbildung 14 und Tabelle 40). Die vollständige Darstellung der Agonistentitration der Patient:innen mit bestätigter δ -SPD erfolgt in Kapitel 4.2.6.3 *Patient:innen mit δ -SPD* und in der konfirmatorischen Analyse in Kapitel 4.3.2.1 *Patient:innen mit δ -SPD*.

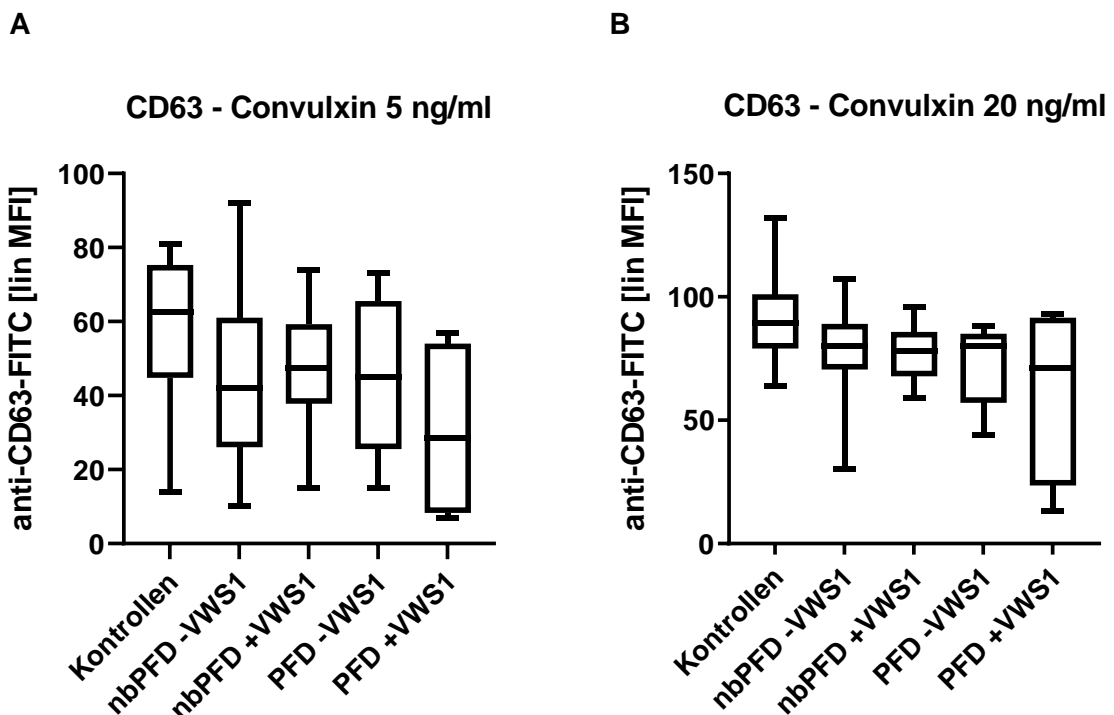


Abbildung 14: CD63-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 5 (A) und 20 (B) ng/ml Convulxin. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe

Tabelle 40: p-Werte der CD63-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 5 und 20 ng/ml Convulxin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig

CD63 - Convulxin 5 ng/ml				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,0157* Mann-Whitney- Test	0,0397* Mann-Whitney- Test	0,2202 Mann-Whitney- Test	0,0317* Mann-Whitney- Test
CD63 - Convulxin 20 ng/ml				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,0193* Unpaired T-Test	0,0099* Unpaired T-Test	0,0504 Unpaired T-Test	0,0237* Unpaired T-Test

4.2.5.4.2 Thrombin-induzierte CD63-Oberflächen-Expression

Auch bei der Thrombin-induzierten CD63-Oberflächen-Expression in aufsteigenden Konzentrationen (0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml) zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Kontrollproband:innen und den Patient:innen, wie die Abbildung 15 für die Konzentrationen 0,1 und 0,2 U/ml verdeutlicht. Bei der Aktivierung mit 0,2 U/ml Thrombin war eine statistisch auffällig verminderte Steigerung der Expression in allen vier Patient:innengruppen im Vergleich zu den Kontrollproband:innen festzustellen (nbPDF -VWS1: $p=0,0100$ im unpaired T-Test, nbPDF +VWS1: $p=0,0009$ im unpaired T-Test, PDF -VWS1: $p=0,0010$ im unpaired T-Test und PDF +VWS1: $p=0,0084$ im unpaired T-Test, siehe Tabelle 41). Bei der Aktivierung mit 0,1 U/ml Thrombin war diese Tendenz bereits in allen Gruppen vorhanden, statistisch auffällig jedoch nur in den Gruppen nbPFD +VWS1 ($p=0,0367$ im unpaired T-Test) und PFD -VWS1 ($p=0,0236$ im unpaired T-Test). Die Darstellung der Patient:innen mit bestätigter δ -SPD erfolgt, wie oben beschrieben, in Kapitel 4.2.6.3 *Patient:innen mit δ -SPD* und in der konfirmatorischen Analyse in Kapitel 4.3.2.1 *Patient:innen mit δ -SPD*.

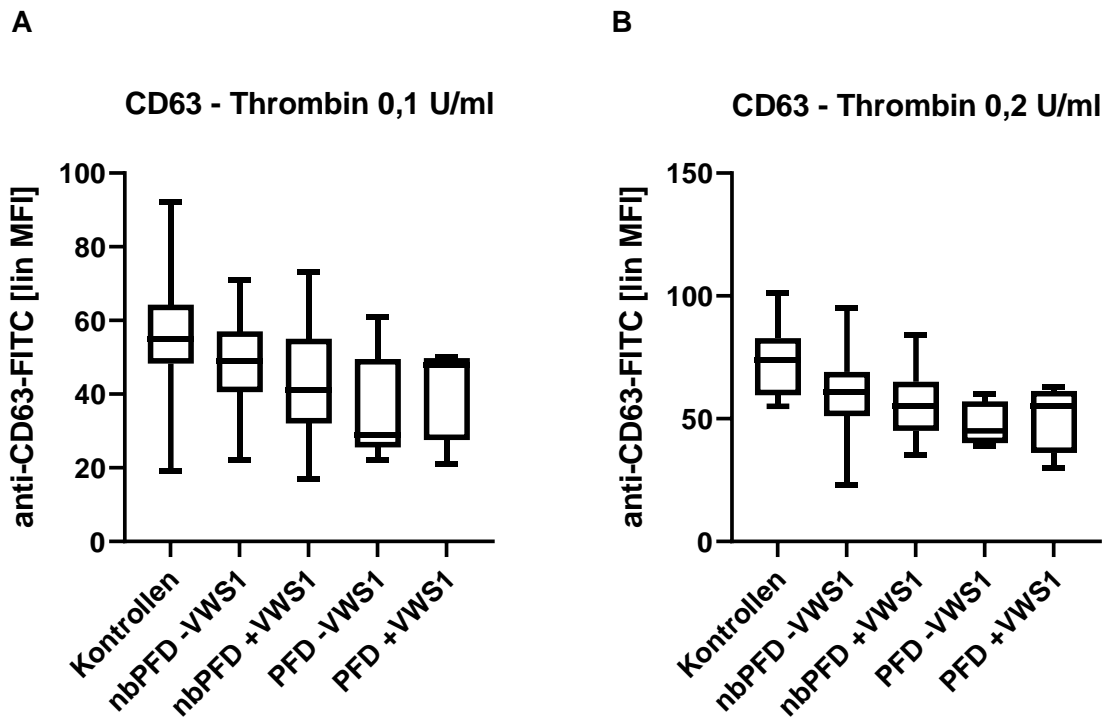


Abbildung 15: CD63-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0,1 (A) und 0,2 (B) U/ml Thrombin. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe

Tabelle 41: p-Werte der CD63-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig

CD63 - Thrombin 0,1 U/ml				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,0559 Unpaired T-Test	0,0367* Unpaired T-Test	0,0236* Unpaired T-Test	0,0692 Mann-Whitney- Test
CD63 - Thrombin 0,2 U/ml				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=15)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,0100* Unpaired T-Test	0,0009* Unpaired T-Test	0,0010* Unpaired T-Test	0,0084* Unpaired T-Test

4.2.5.5 Basale LAMP-1-Oberflächen-Expression

Über die LAMP-1-Oberflächen-Expression erfolgt die Beurteilung der lysosomalen Exozytose. Statistisch auffällige Erniedrigungen in der basalen LAMP-1-Oberflächen-Expression ohne Zugabe von Agonisten fanden sich im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und den

Patient:innengruppen nbPFD -VWS1 ($p=0,0005$ im Mann-Whitney-Test) und PFD +VWS1 ($p=0,0429$ im Mann-Whitney-Test) (siehe Abbildung 16 und Tabelle 42).

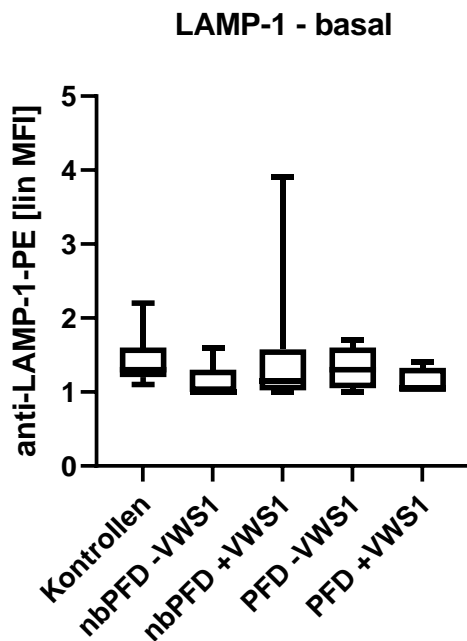


Abbildung 16: Basalwerte der LAMP-1-Oberflächen-Expression. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe

Tabelle 42: p-Werte der Basalwerte der LAMP-1-Oberflächen-Expression im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig

LAMP-1 - basal				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,0005* Mann-Whitney- Test	0,2036 Mann-Whitney- Test	0,6248 Mann-Whitney- Test	0,0429* Mann-Whitney- Test

4.2.5.6 Agonisten-induzierte LAMP-1-Oberflächen-Expression

4.2.5.6.1 Convulxin-induzierte LAMP-1-Oberflächen-Expression

Nach Induktion mit dem Agonisten Convulxin in aufsteigenden Konzentrationen (1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml) zeigte sich insgesamt eine vermehrte LAMP-1-Oberflächen-Expression. Im Vergleich zwischen den Kontrollproband:innen und den Patient:innen war diese bei den Patient:innen tendenziell vermindert ausgeprägt (siehe Abbildung 17 für die Konzentrationen 5 und 20 ng/ml). Statistisch auffällig ist die verminderte Expression bei 5 ng/ml Convulxin in

der Gruppe nbPFD -VWS1 ($p=0,053$ im unpaired T-Test) und bei 20 ng/ml Convulxin in den Gruppen nbPFD -VWS1 ($p<0,0001$ im unpaired T-Test), nbPFD +VWS1 ($p=0,0013$ im unpaired T-Test) und PFD +VWS1 ($p=0,0027$ im unpaired T-Test) (siehe Tabelle 43).

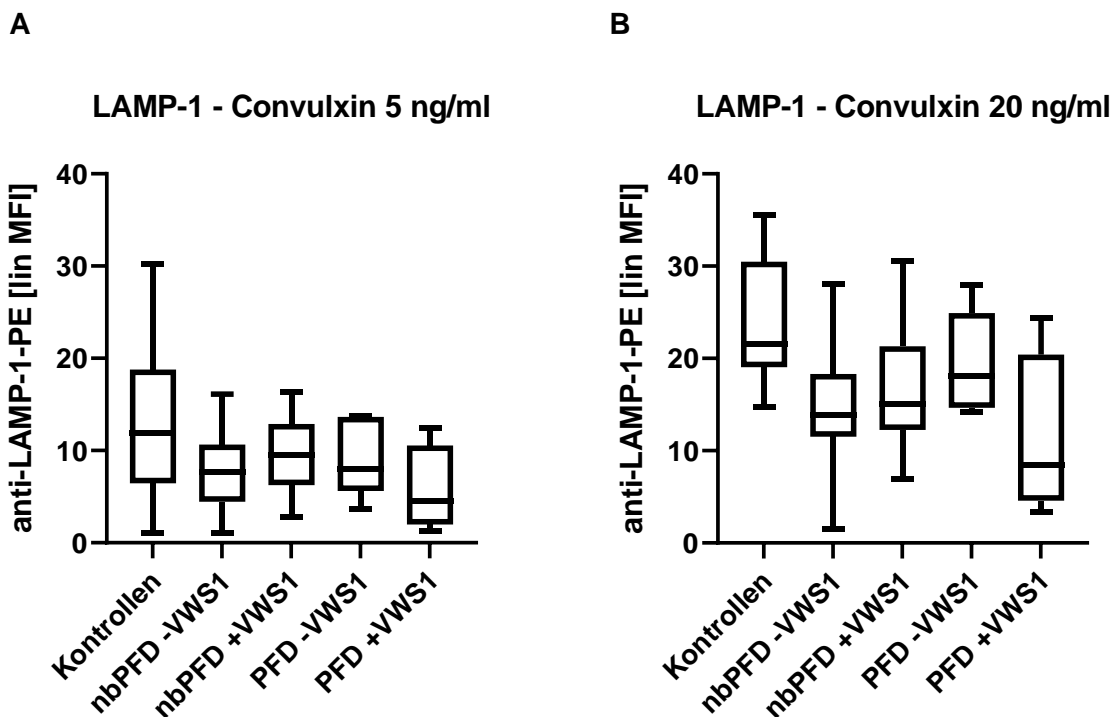


Abbildung 17: LAMP-1-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 5 (A) und 20 (B) ng/ml Convulxin. Box-Blot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe

Tabelle 43: p -Werte der LAMP-1-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 5 und 20 ng/ml Convulxin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig

LAMP-1 - Convulxin 5 ng/ml				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,0053* Unpaired T-Test	0,1337 Unpaired T-Test	0,3287 Unpaired T-Test	0,0892 Unpaired T-Test
LAMP-1 - Convulxin 20 ng/ml				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	<0,0001* Unpaired T-Test	0,0013* Unpaired T-Test	0,1536 Unpaired T-Test	0,0027* Unpaired T-Test

4.2.5.6.2 Thrombin-induzierte LAMP-1-Oberflächen-Expression

Abbildung 18 veranschaulicht die Thrombin-induzierte LAMP-1-Oberflächen-Expression nach Aktivierung der Thrombozyten in aufsteigenden Konzentrationen (0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml, hier dargestellt für die Konzentrationen 0,1 und 0,2 U/ml), wobei eine verminderte Steigerung im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen gemessen wurde. Statistisch auffällig war diese in den Gruppen nbPFD -VWS1 (0,1 U/ml: $p < 0,0001$ im unpaired T-Test und 0,2 U/ml: $p < 0,0001$ im unpaired T-Test), nbPFD +VWS1 (0,1 U/ml: $p = 0,0027$ im unpaired T-Test und 0,2 U/ml: $p = 0,0002$ im unpaired T-Test) und PFD -VWS1 (0,1 U/ml: $p = 0,0027$ im unpaired T-Test und 0,2 U/ml: $p = 0,0061$ im unpaired T-Test) (siehe Tabelle 44). In der Gruppe PFD +VWS1 zeigte sich diese Tendenz weniger ausgeprägt und nicht statistisch auffällig.

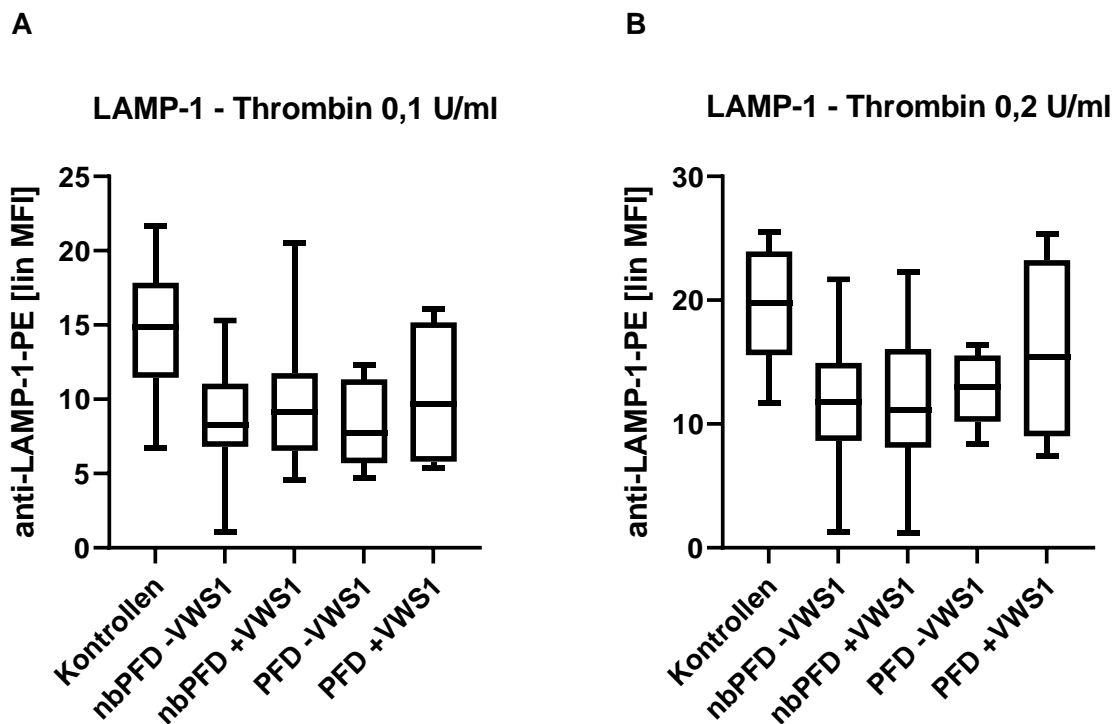


Abbildung 18: LAMP-1-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0,1 (A) und 0,2 (B) U/ml Thrombin. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe

*Tabelle 44: p-Werte der LAMP-1-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig*

LAMP-1 - Thrombin 0,1 U/ml				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	<0,0001* Unpaired T-Test	0,0027* Unpaired T-Test	0,0027* Unpaired T-Test	0,0552 Unpaired T-Test
LAMP-1 - Thrombin 0,2 U/ml				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	<0,0001* Unpaired T-Test	0,0002* Unpaired T-Test	0,0061* Unpaired T-Test	0,2293 Unpaired T-Test

4.2.6 Durchflusszytometrische Erhebungen der Patient:innen mit bestätigten PFD

Im Folgenden sind die durchflusszytometrischen Erhebungen der Patient:innen dargestellt, bei denen eine PFD bestätigt wurde, also Patient:innen der Gruppen PFD -VWS1 und PFD +VWS1. Die Darstellung erfolgt getrennt nach der jeweiligen PDF im Vergleich zu den Kontrollproband:innen.

4.2.6.1 Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung

In diesem Kapitel sind die Untersuchungsergebnisse der Patient:innen aufgeführt, bei denen eine PFD durch eine verminderte Fibrinogenbindung am thrombozytären Rezeptor GPIIb/IIIa (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) nach Aktivierung mit dem Agonisten ADP vorlag. Dies betraf eine Patientin mit und einen Patienten ohne vWS Typ 1, wobei zu beachten ist, dass beim Patienten ohne vWS Typ 1 nicht nur eine Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung, sondern eine „Gi-like“ PFD festgestellt wurde. Aufgrund der inhaltlichen Überschneidung - bis auf die bei diesem Patienten ebenfalls gestörte Epinephrin-induzierte Fibrinogenbindung - sind die Ergebnisse hier mit aufgeführt sowie weiterhin in Kapitel 4.2.6.2 *Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung*. Da beide der hier aufgeführten Gruppen (ADP-ind.PFD -VWS1 und ADP-ind.PFD +VWS1) jeweils nur eine Person umfassen, sind keine statistischen Analysen möglich. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden bei beiden Patient:innen wiederholt erhoben. Bei der Patientin mit vWS Typ 1 wurde weiterhin eine Lumi-Aggregometrie (simultane Thrombozyten-Aggregation und ATP-Freisetzung in

thrombozytenreichem Plasma) durchgeführt, die Ergebnisse sind jedoch nicht Teil der Untersuchungen dieser Arbeit und daher auch nicht dargestellt.

4.2.6.1.1 Basale und ADP-induzierte Fibrinogenbindung

Abbildung 19 zeigt die basale und die ADP-induzierte Fibrinogenbindung (0,75 μ M ADP) der Patient:innen und Kontrollproband:innen im Boxplot, Abbildung 20 die vollständige Agonistentitration mit ADP in aufsteigenden Konzentrationen (0, 0,125, 0,25 und 0,75 μ M) im Liniendiagramm (linear und logarithmisch). Der basale Aktivierungszustand des Rezeptors GPIIb/IIIa zeigte bei den Patient:innen eine leichte Erniedrigung im Vergleich zu den Kontrollproband:innen. Hervorzuheben ist, dass die ADP-induzierte Fibrinogenbindung bei den Kontrollproband:innen sowie bei den Patient:innen induzierbar war, jedoch von den Patient:innen keine Maximalwerte erreicht wurden. Ausgeprägter war dies in der Gruppe ADP-ind.PFD +VWS1.

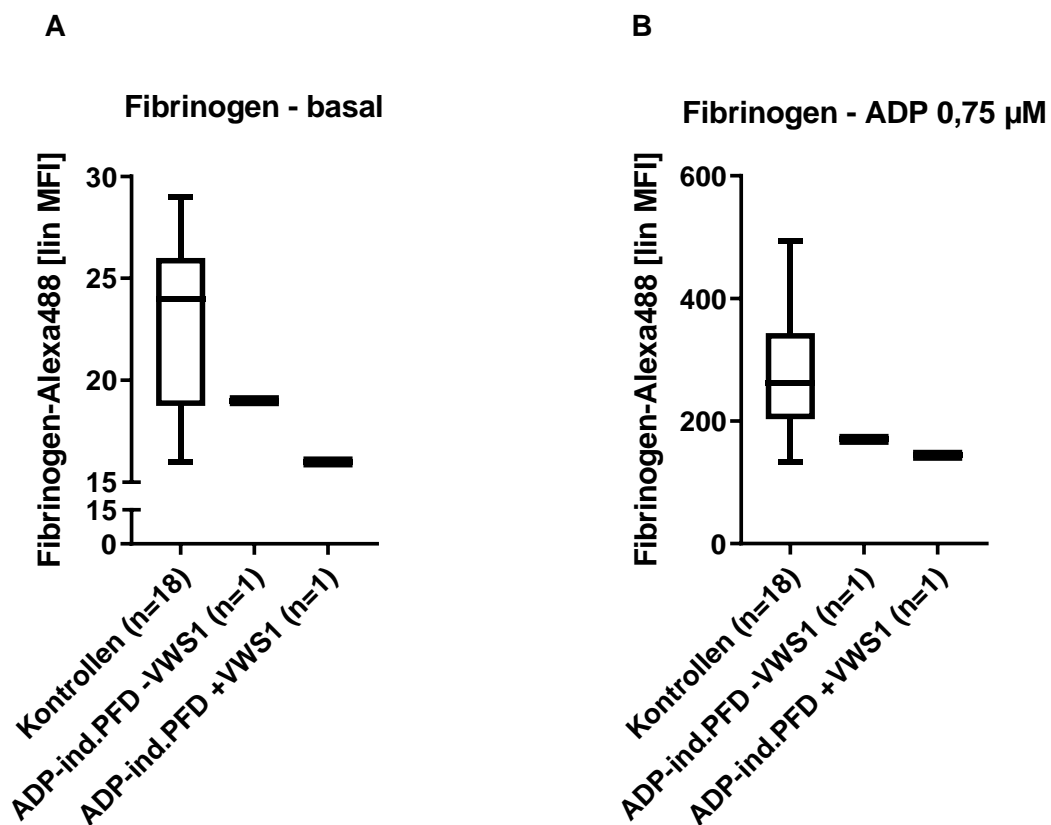


Abbildung 19: Basalwerte der Fibrinogenbindung von extern zugesetztem Fibrinogen (A) und ADP-induzierte Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0,75 μ M ADP (B) bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe

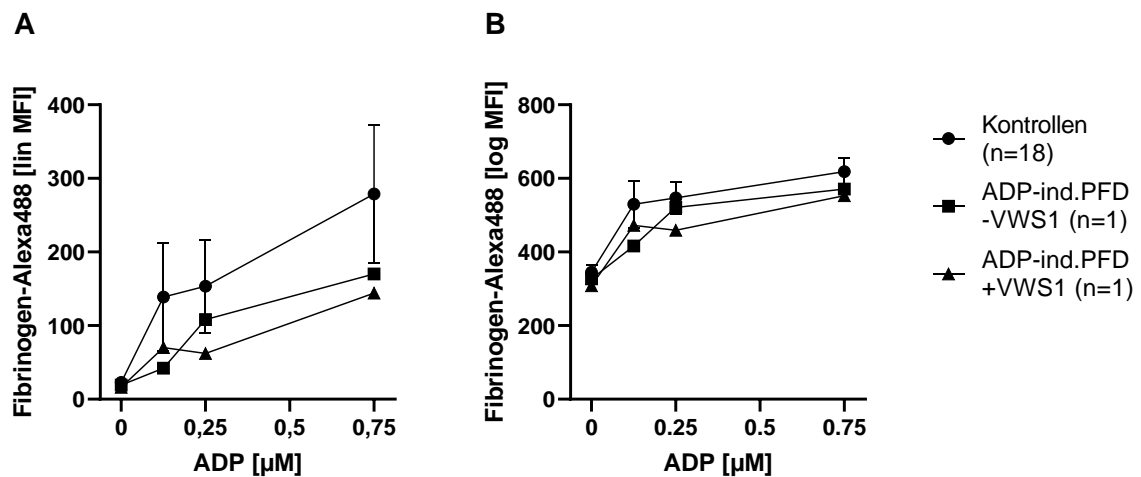


Abbildung 20: Agonistentitration der ADP-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0, 0,125, 0,25 und 0,75 μM ADP bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

4.2.6.1.2 Epinephrin-, Convulxin- und Thrombin-induzierte Fibrinogenbindung

Abbildung 21 bis Abbildung 23 zeigen die weiterhin durchgeführten Agonistentitrations zur Induktion der Fibrinogenbindung am Rezeptor GPIIb/IIIa mit den Agonisten Epinephrin, Convulxin und Thrombin. In der Abbildung 21 wurde der Patient mit „Gi-like“ PFD ausgenommen; diese Darstellung wird in Kapitel 4.2.6.2 *Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung* aufgeführt. In den übrigen Abbildungen ist er mitberücksichtigt. Bei den Patient:innen fanden sich überwiegend normwertig induzierbare Fibrinogenbindungen; die Patientin der Gruppe ADP-ind. PFD +VWS1 zeigte eine leicht erniedrigte Convulxin-induzierte Fibrinogenbindung (siehe Abbildung 22).

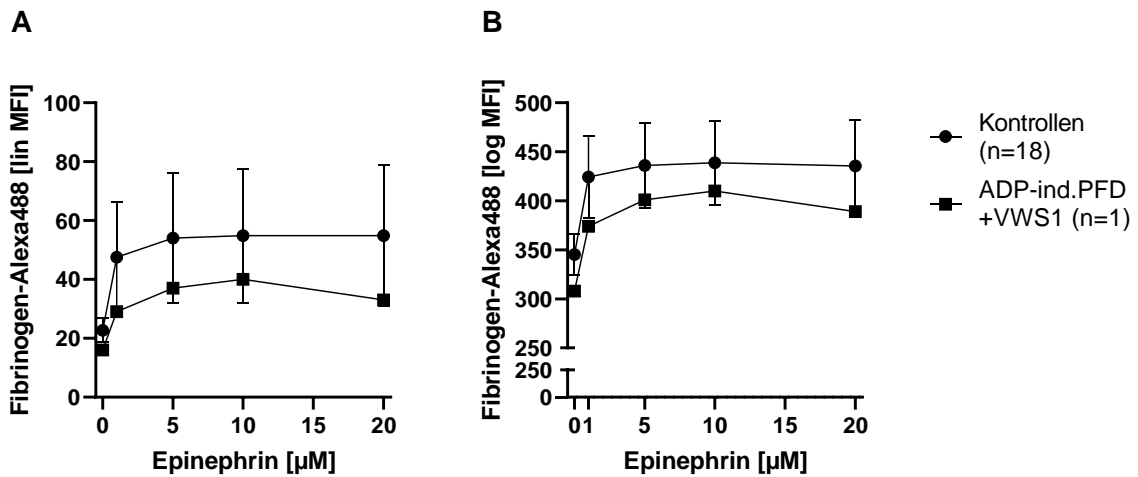


Abbildung 21: Agonistentitration der Epinephrin-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0, 1, 5, 10 und 20 μM Epinephrin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

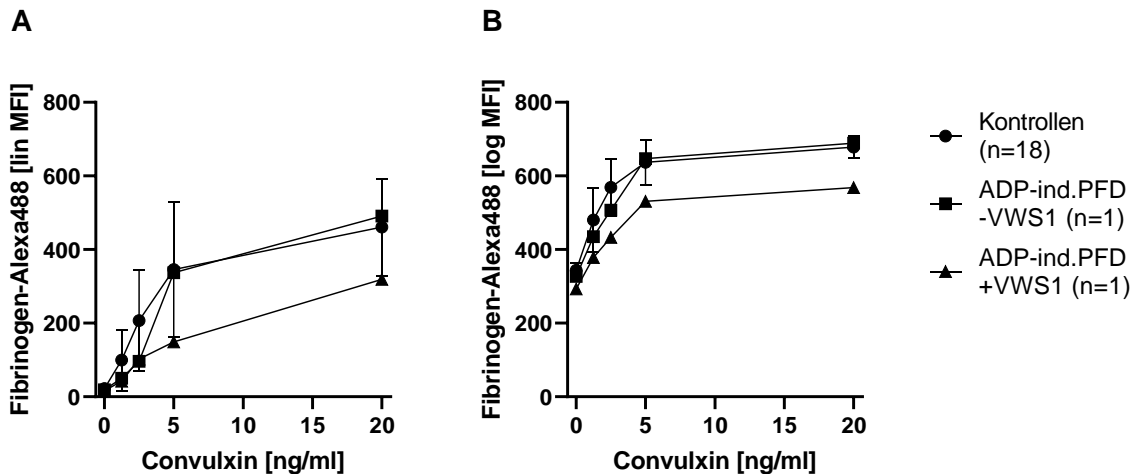


Abbildung 22: Agonistentitration der Convulxin-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0, 1, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

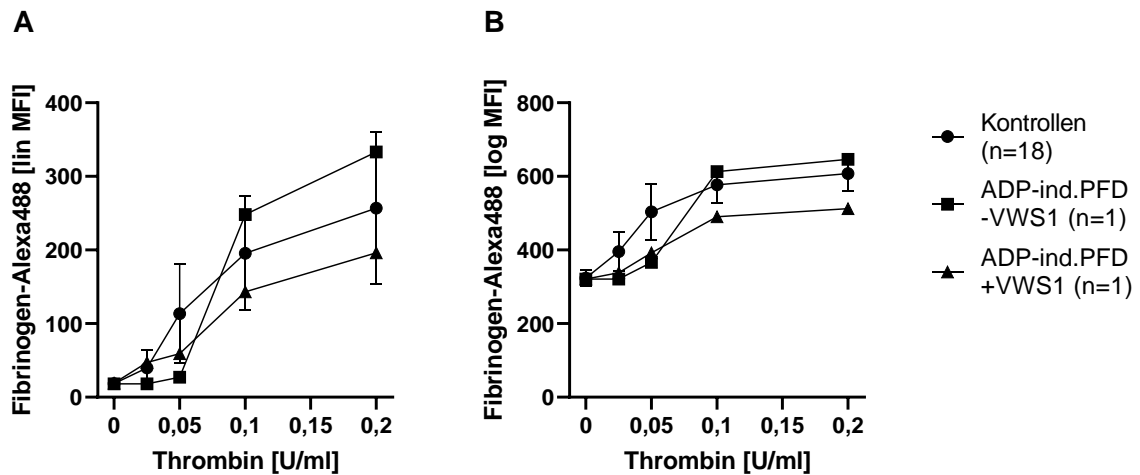


Abbildung 23: Agonistentitration der Thrombin-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

4.2.6.1.3 Convulxin- und Thrombin-induzierte Granulasekretion durch Induktion der CD62P-, CD63- und LAMP-1-Oberflächen-Expression

Abbildung 24 bis Abbildung 29 zeigen die Agonisten-induzierte Granulasekretion der α - und δ - Granula und der Lysosomen durch Induktion der CD62P-, CD63- und LAMP-1-Oberflächen-Expression durch Convulxin und Thrombin der Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Es stellte sich eine normwertige Sekretion bis auf eine Erniedrigung im Vergleich zu den Kontrollproband:innen in der Gruppe ADP-ind.PFD -VWS1 bei Induktion der CD63- (siehe Abbildung 27) und LAMP-1- (siehe Abbildung 29) Oberflächen-Expression nach Aktivierung mit Thrombin und in der Gruppe ADP-ind.PFD +VWS1 bei Induktion der CD63-Oberflächen-Expression nach Aktivierung mit Thrombin (siehe Abbildung 27) sowie bei Induktion der LAMP-1-Oberflächen-Expression nach Aktivierung mit Convulxin und Thrombin (siehe Abbildung 28 und Abbildung 29) dar.

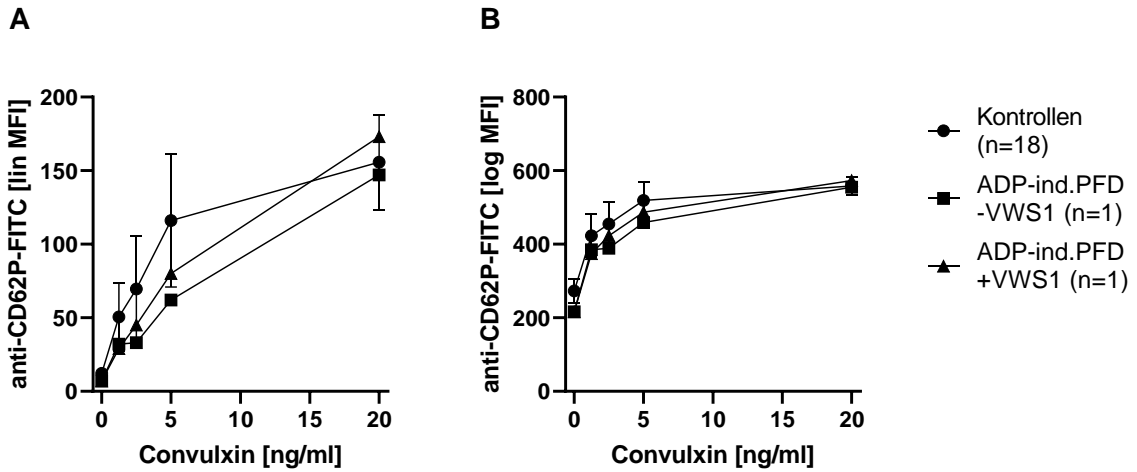


Abbildung 24: Agonistentitration der CD62P-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 1, 2, 5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

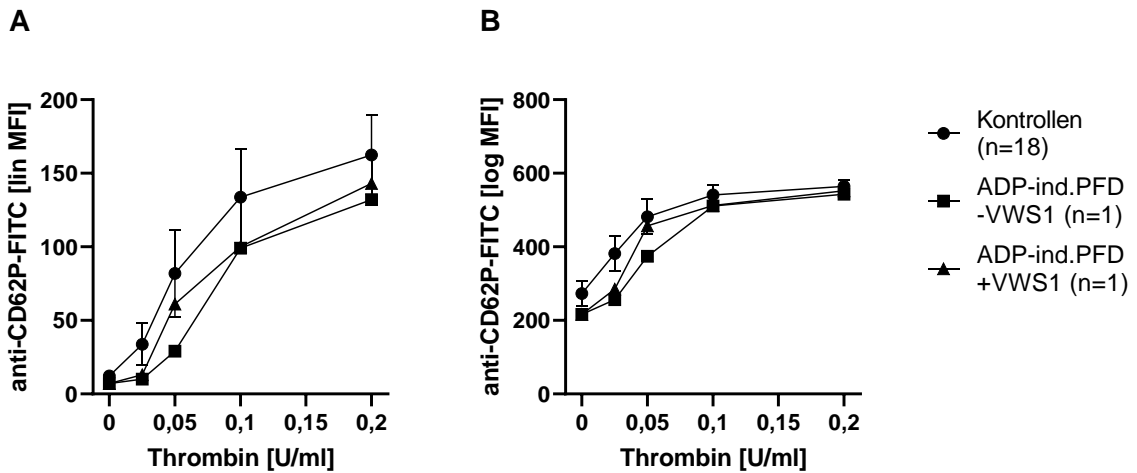


Abbildung 25: Agonistentitration der CD62P-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

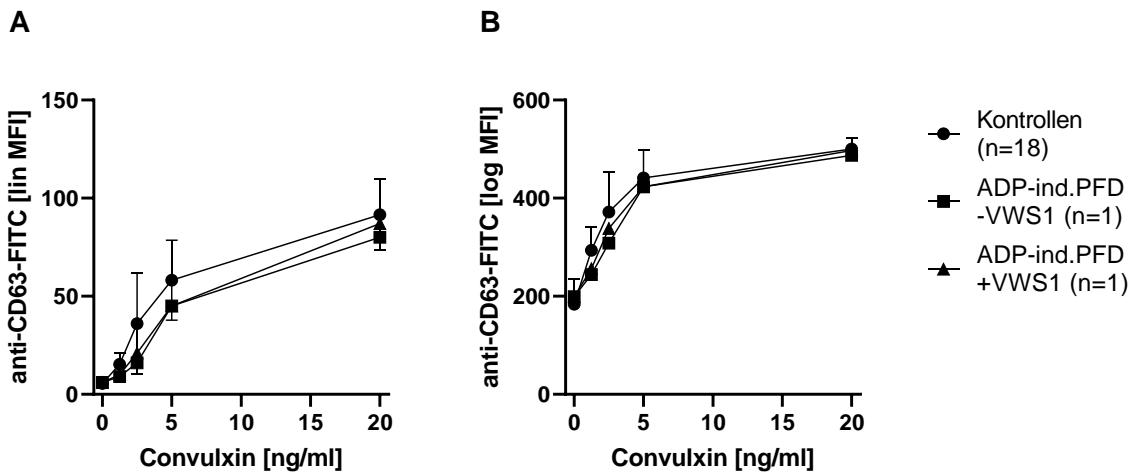


Abbildung 26: Agonistentitration der CD63-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

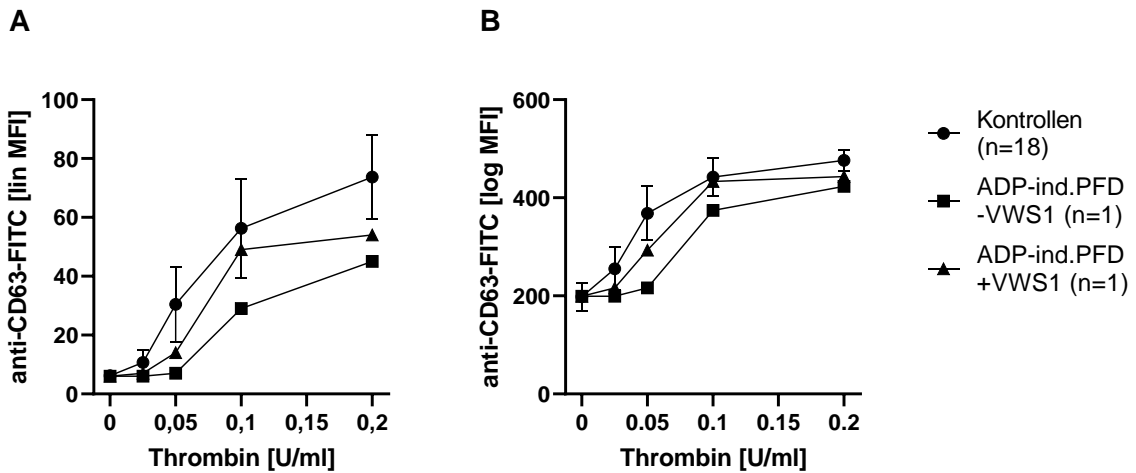


Abbildung 27: Agonistentitration der CD63-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

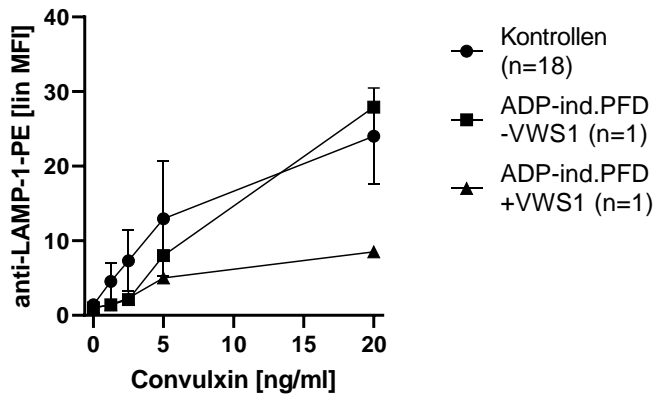


Abbildung 28: Agonistentitration der LAMP-1-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

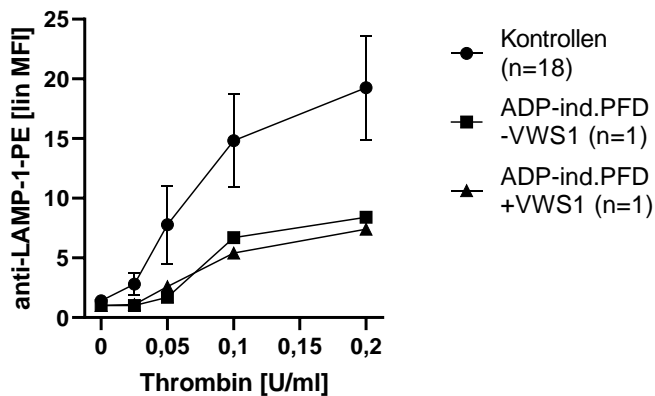


Abbildung 29: Agonistentitration der LAMP-1-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

4.2.6.2 Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung

Im Folgenden sind die Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung im Vergleich zu den Kontrollproband:innen dargestellt. Sie zeigten eine verminderte Fibrinogenbindung am Rezeptor GPIIb/IIIa nach Aktivierung der Thrombozyten mit Epinephrin, das *in vivo* Adrenalin entspricht. Betroffen waren zwei Patientinnen und ein Patient ohne vWS Typ 1, wobei der Patient eine „Gi-like“ PFD zeigte. Die Ergebnisse sind entsprechend Kapitel 4.2.6.1 *Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten*

Thrombozytenaktivierung bis auf die bei ihm ebenfalls betroffene ADP-induzierte Fibrinogenbindung hier mit aufgeführt. Die Gruppe der Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung mit vWS Typ 1 enthält in dieser Arbeit keine Personen. Bei zwei der drei hier dargestellten Patient:innen wurden die durchflusszytometrischen Untersuchungen wiederholt erhoben. Bei einer Patientin wurde weiterhin ein VASP-P-FACS-Assay durchgeführt, die Ergebnisse sind jedoch nicht Teil der Untersuchungen dieser Arbeit und daher hier nicht dargestellt.

4.2.6.2.1 Basale und Epinephrin-induzierte Fibrinogenbindung

Abbildung 30 verdeutlicht die tendenziell niedrige basale und die deutlich verminderte Epinephrin-induzierte Fibrinogenbindung nach Aktivierung mit 20 μ M Epinephrin, welche sich auch statistisch auffällig zeigte ($p=0,0015$ im Mann-Whitney-Test) (siehe Tabelle 45). Die vollständig durchgeführte Agonistentitration mit Epinephrin in aufsteigenden Konzentrationen (0, 1, 5, 10 und 20 μ M) ist in Abbildung 31 zu sehen. Dort wird ersichtlich, dass die Fibrinogenbindung durch Epinephrin bei allen drei Patient:innen im Vergleich zu den Kontrollproband:innen kaum induzierbar war.

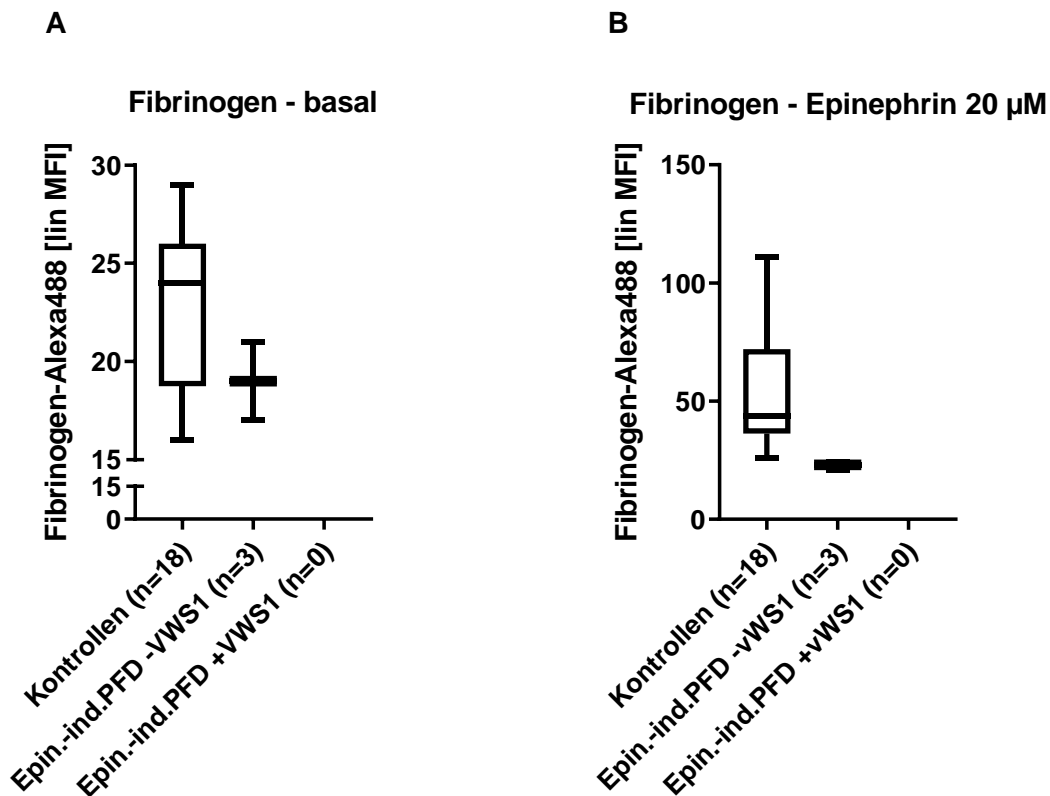


Abbildung 30: Basalwerte der Fibrinogenbindung von extern zugesetztem Fibrinogen (A) und Epinephrin-induzierte Fibrinogenbindung nach Zugabe von 20 μ M Epinephrin (B) bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe

Tabelle 45: p-Werte der Basalwerte der Fibrinogenbindung von extern zugesetztem Fibrinogen und nach Zugabe von 20 μM Epinephrin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig

Fibrinogen - basal	
	Epin.ind.PFD -VWS1 (n=3)
Kontrollen (n=18)	0,1441 Unpaired T-Test
Fibrinogen - Epinephrin 20 μM	
	Epin.ind.PFD -VWS1 (n=3)
Kontrollen (n=18)	0,0015* Mann-Whitney-Test

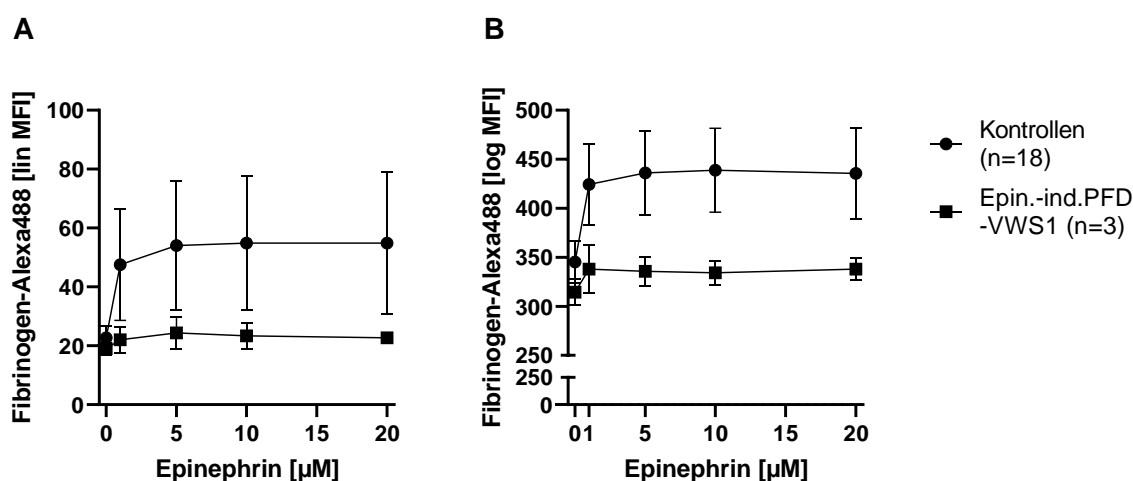


Abbildung 31: Agonistentitration der Epinephrin-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0, 1, 5, 10 und 20 μM Epinephrin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

4.2.6.2.2 ADP-, Convulxin- und Thrombin-induzierte Fibrinogenbindung

Abbildung 32 bis Abbildung 34 veranschaulichen eine normal induzierbare Fibrinogenbindung der Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung durch die Agonisten ADP, Convulxin und Thrombin. In der Abbildung 32 wurde, wie oben beschrieben, der Patient mit „Gi-like“ PFD ausgenommen; seine Darstellung der ADP-induzierten Fibrinogenbindung findet sich in Kapitel 4.2.6.1 *Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung*.

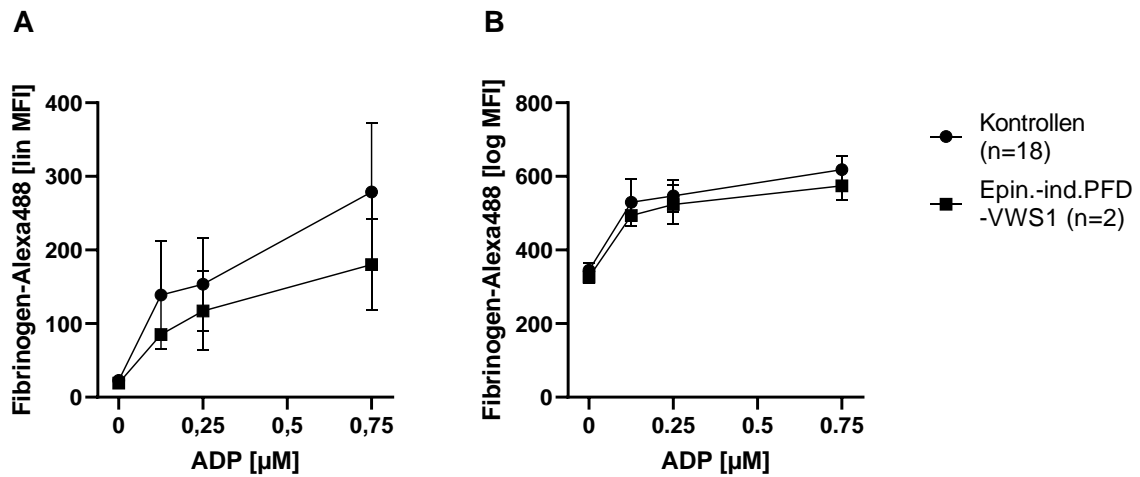


Abbildung 32: Agonistentitration der ADP-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0, 0,125, 0,25 und 0,75 μM ADP bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

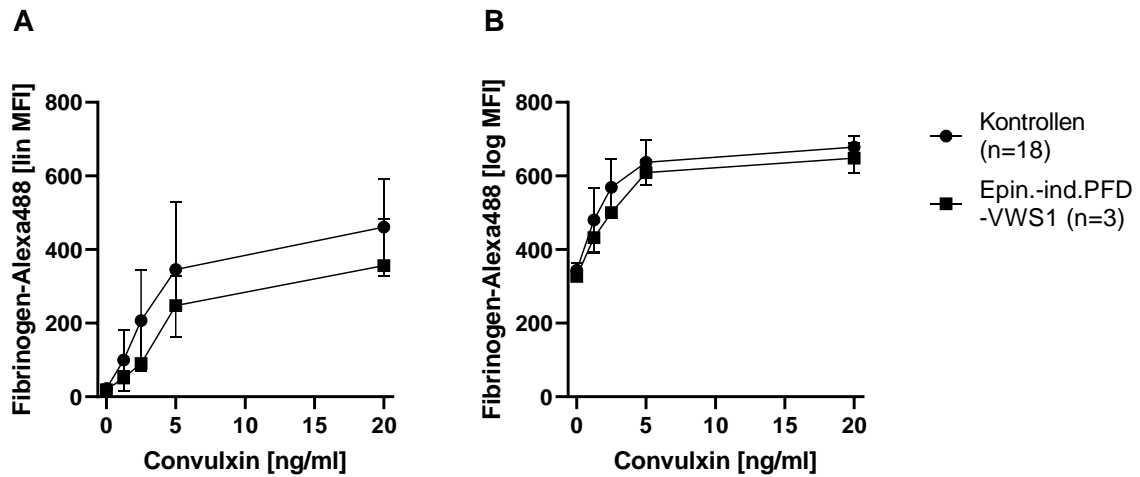


Abbildung 33: Agonistentitration der Convulxin-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

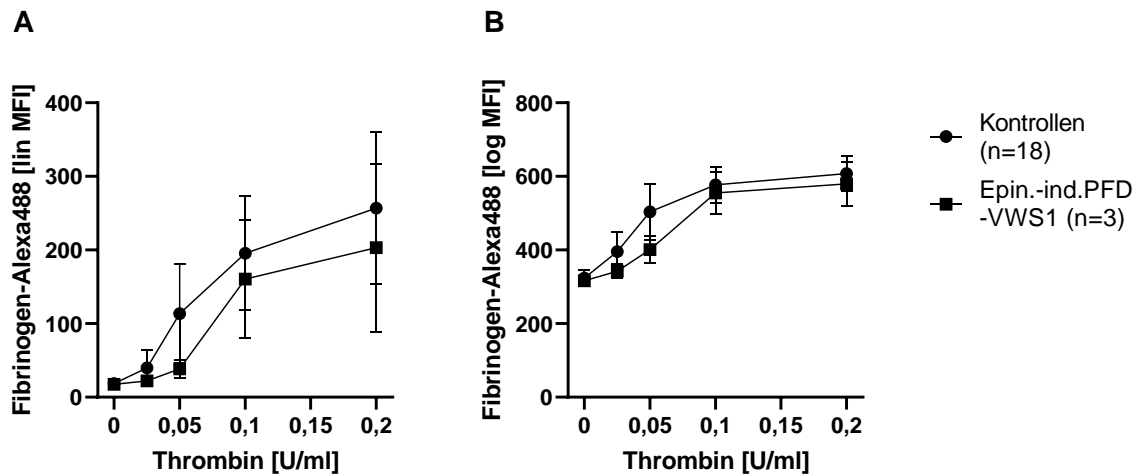


Abbildung 34: Agonistentitration der Thrombin-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

4.2.6.2.3 Convulxin- und Thrombin-induzierte Granulasekretion durch Induktion der CD62P-, CD63- und LAMP-1-Oberflächen-Expression

Abbildung 35 bis Abbildung 40 zeigen die überwiegend normale Induktion der CD62P-, CD63- und LAMP-1-Oberflächen-Expression und somit Granulasekretion durch Convulxin und Thrombin der Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Lediglich die CD63- (siehe Abbildung 38) und LAMP-1- (siehe Abbildung 40) Oberflächen-Expressionen bei Aktivierung mit Thrombin waren im Vergleich zu den Kontrollproband:innen etwas vermindert.

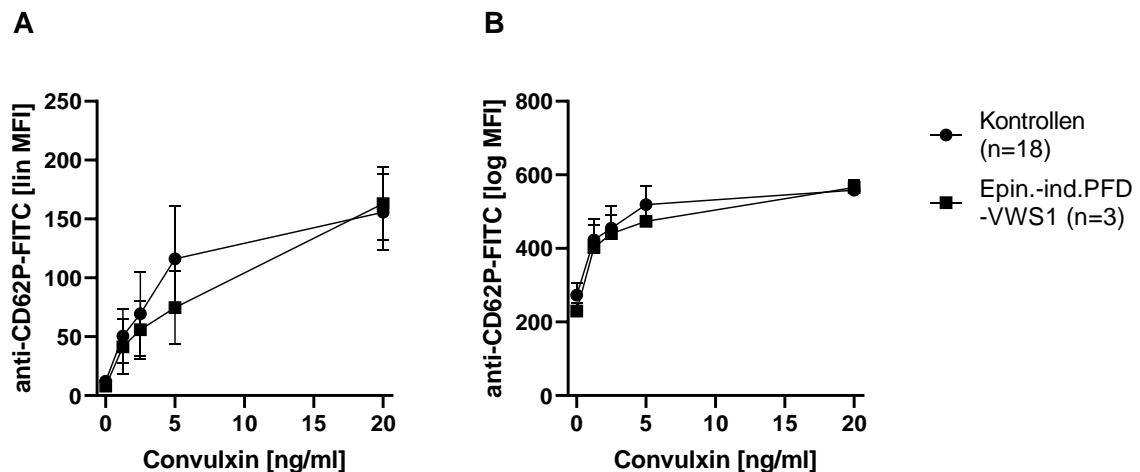


Abbildung 35: Agonistentitration der CD62P-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

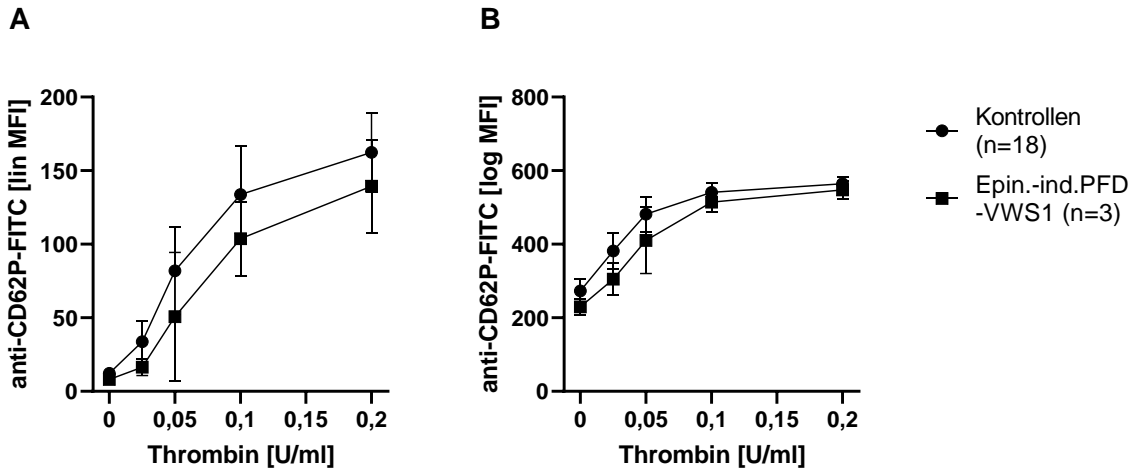


Abbildung 36: Agonistentitration der CD62P-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

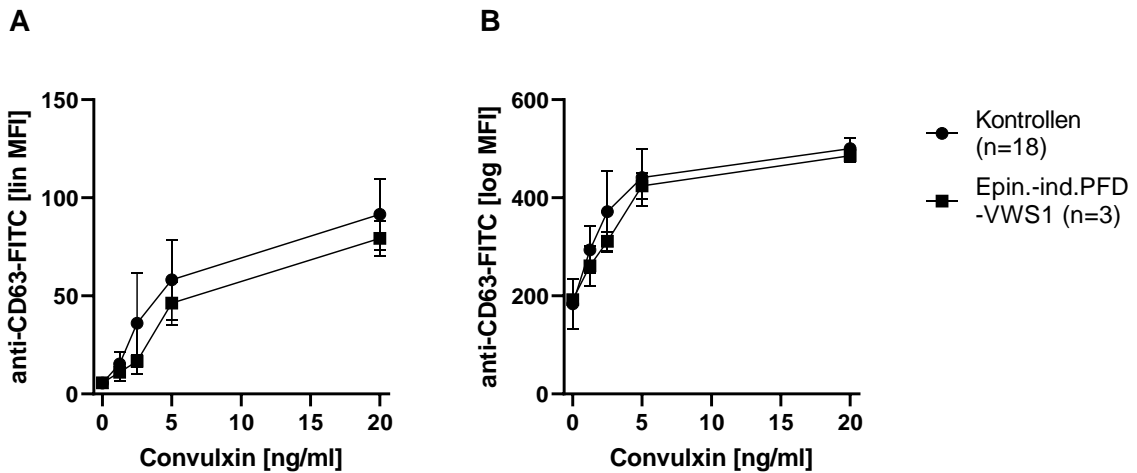


Abbildung 37: Agonistentitration der CD63-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

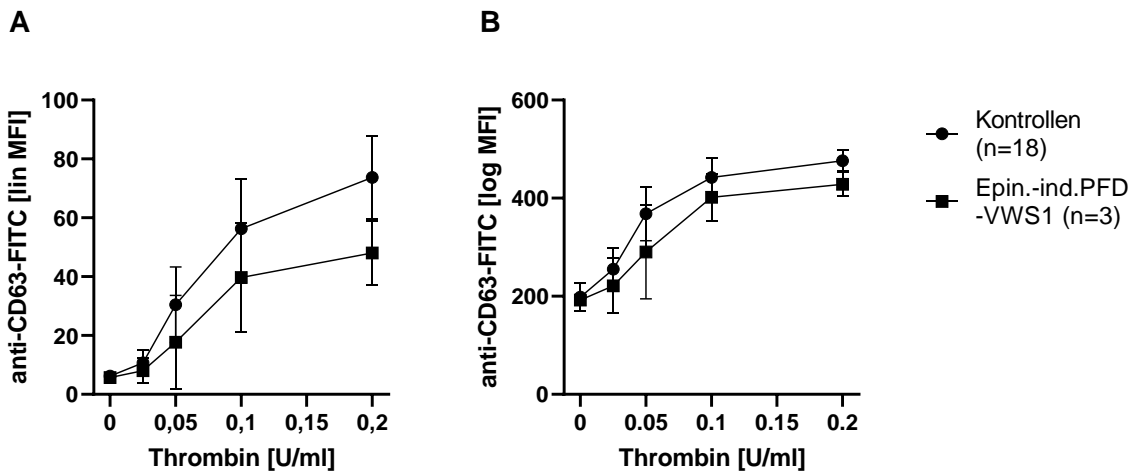


Abbildung 38: Agonistentitration der CD63-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

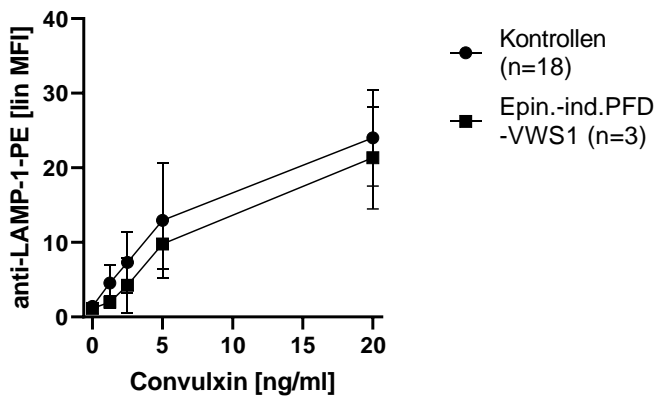


Abbildung 39: Agonistentitration der LAMP-1-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

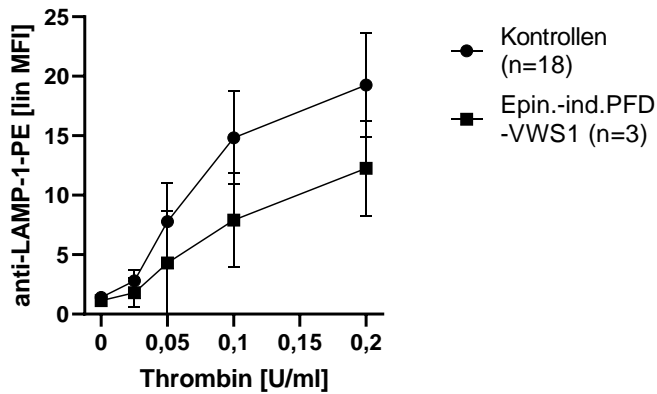


Abbildung 40: Agonistentitration der LAMP-1-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

4.2.6.3 Patient:innen mit δ -SPD

In diesem Kapitel erfolgt die Darstellung von Patient:innen mit bestätigter δ -SPD, die also an einem Mangel oder einer Sekretionsstörung der δ -Speichergranula leiden. Die ebenfalls dazugehörige Darstellung der Mepacrineaufnahme und -freisetzung in bzw. aus den δ -Granula findet sich in der konfirmatorischen Analyse in Kapitel 4.3.2.1 *Patient:innen mit δ -SPD*. Es wurden zwei Patient:innen ohne und drei Patient:innen mit vWS Typ 1 diagnostiziert. Eine statistische Analyse erfolgte ausschließlich bei den Patient:innen der Gruppe δ -SPD +VWS1; die Gruppe δ -SPD -VWS1 umfasste eine zu geringe Fallzahl. Bei vier der fünf Patient:innen wurde weiterhin ein Serotonin-ELISA zur Bestimmung des thrombozytären Serotonin-Gehalts der δ -Granula sowie eine Lumi-Aggregometrie durchgeführt; die Ergebnisse sind aber nicht Teil der Untersuchungen dieser Arbeit und daher nicht hier dargestellt. Bei der fünften Patientin sowie einer weiteren wurden die durchflusszytometrischen Untersuchungen wiederholt erhoben.

4.2.6.3.1 Convulxin- und Thrombin-induzierte Granulasekretion durch Induktion der CD63-Oberflächen-Expression

Die CD63-Oberflächen-Expression als Membranmarker für die δ -Granula und die Lysosomen zeigt in Abbildung 41 sowohl bei Patient:innen der Gruppe δ -SPD +VWS1 als auch bei Patient:innen der Gruppe δ -SPD -VWS1 eine im Vergleich zu den Kontrollproband:innen ähnlich ausgeprägte basale Expression. Nach Aktivierung der Thrombozyten in aufsteigenden

Konzentrationen mit Convulxin (0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml, siehe Abbildung 42) kam es zu einer insgesamt vermehrten Oberflächen-Expression von CD63, jedoch war diese Expression vermindert bei beiden Patient:innengruppen im Vergleich zu den Kontrollproband:innen ausgeprägt, deutlicher in der Gruppe δ -SPD +VWS1. Statistisch auffällig bei einer Convulxin-Konzentration von 20 ng/ml war die Erniedrigung in der Gruppe δ -SPD +VWS1 ($p=0,0106$ im unpaired T-Test) (siehe Abbildung 41 und Tabelle 46).

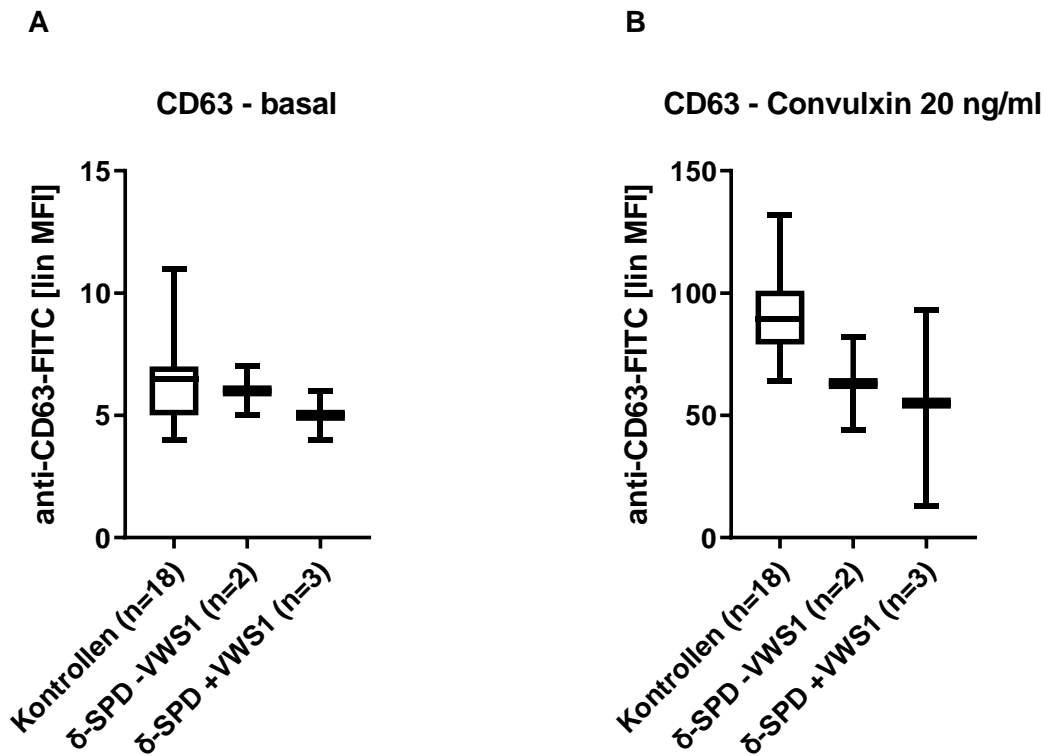


Abbildung 41: Basalwerte der CD63-Oberflächen-Expression (A) und nach Zugabe von 20 ng/ml Convulxin (B) bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe

Tabelle 46: p-Werte der Basalwerte der CD63-Oberflächen-Expression und nach Zugabe von 20 ng/ml Convulxin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig

CD63 - basal		
	δ -SPD -VWS1 (n=2)	δ -SPD +VWS1 (n=3)
Kontrollen (n=18)	n zu klein	0,1955 Mann-Whitney-Test
CD63 - Convulxin 20 ng/ml		
	δ -SPD -VWS1 (n=2)	δ -SPD +VWS1 (n=3)
Kontrollen (n=18)	n zu klein	0,0106* Unpaired T-Test

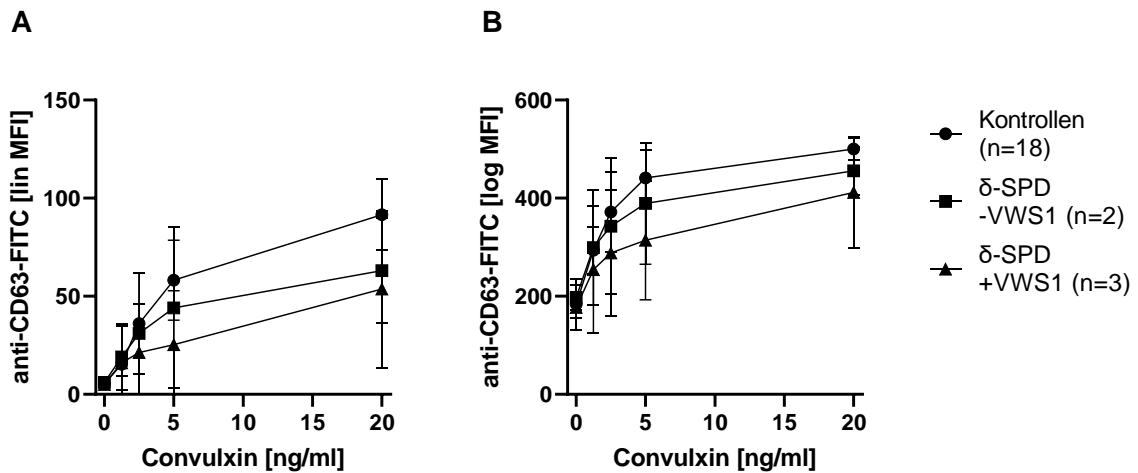


Abbildung 42: Agonistentitration der CD63-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 1, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

Auch nach Aktivierung der Thrombozyten mit Thrombin in aufsteigenden Konzentrationen (0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml, siehe Abbildung 44) war ebenfalls eine insgesamt vermehrte Expression festzustellen, vermindert ausgeprägt jedoch bei den Patient:innen im Vergleich zu den Kontrollproband:innen. Statistisch auffällig war diese bei einer Thrombin-Konzentration von 0,2 U/ml in der Gruppe δ -SPD +VWS1 ($p=0,0159$ im unpaired T-Test) (siehe Abbildung 43 und Tabelle 47).

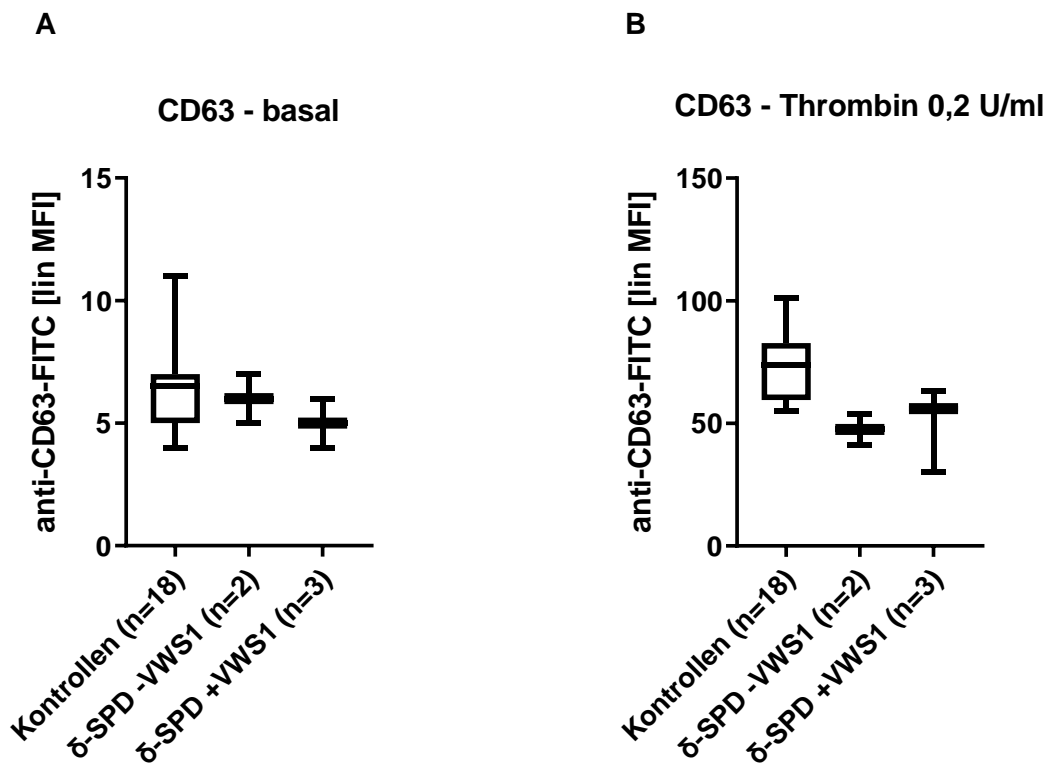


Abbildung 43: Basalwerte der CD63-Oberflächen-Expression (A) und nach Zugabe von 0,2 U/ml Thrombin (B) bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe

Tabelle 47: p-Werte der Basalwerte der CD63-Oberflächen-Expression und nach Zugabe von 0,2 U/ml Thrombin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). *statistisch auffällig

CD63 - basal		
	δ -SPD -VWS1 (n=2)	δ -SPD +VWS1 (n=3)
Kontrollen (n=18)	n zu klein	0,1955 Mann Whitney-Test
CD63 - Thrombin 0,2 U/ml		
	δ -SPD -VWS1 (n=2)	δ -SPD +VWS1 (n=3)
Kontrollen (n=18)	n zu klein	0,0159* Unpaired T-Test

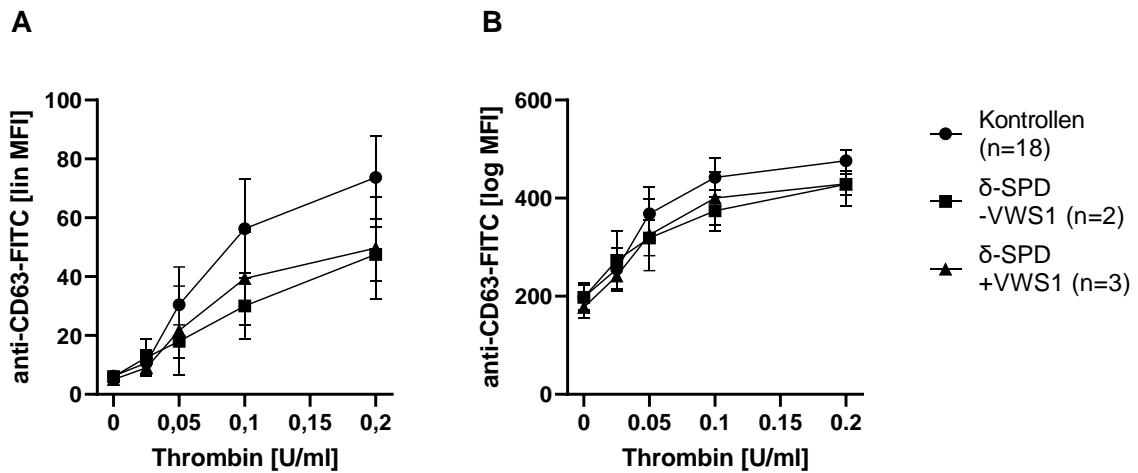


Abbildung 44: Agonistentitration der CD63-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

4.2.6.3.2 Convulxin- und Thrombin-induzierte Granulasekretion durch Induktion der CD62P- und LAMP-1-Oberflächen-Expression

Im Folgenden sind die Agonistentitrationen mit Convulxin und Thrombin zur Induktion der CD62P- und LAMP-1-Oberflächen-Expression der Patient:innen mit δ -SPD dargestellt, siehe Abbildung 45 bis Abbildung 48. Sie zeigen, dass eine Agonisten-induzierte Expression vorhanden war, diese jedoch zum Teil etwas vermindert im Vergleich zu den Kontrollproband:innen ausfiel: In der Gruppe δ -SPD -VWS1 bei der LAMP-1-Oberflächen-Expression (siehe Abbildung 47 und Abbildung 48) und in der Gruppe δ -SPD +VWS1 bei der CD62P- (siehe Abbildung 45 und Abbildung 46) und der LAMP-1-Oberflächen-Expression bei Aktivierung mit Convulxin (siehe Abbildung 47).

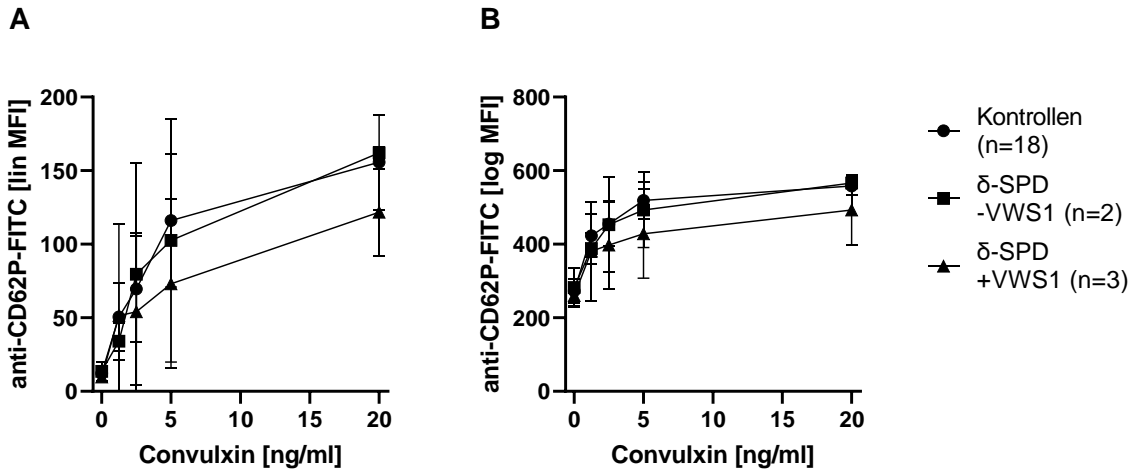


Abbildung 45: Agonistentitration der CD62P-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

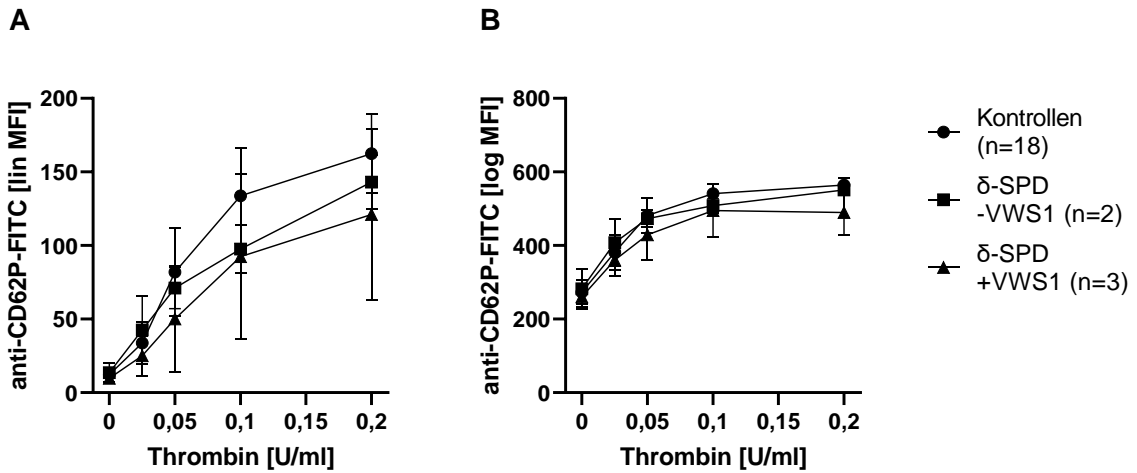


Abbildung 46: Agonistentitration der CD62P-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

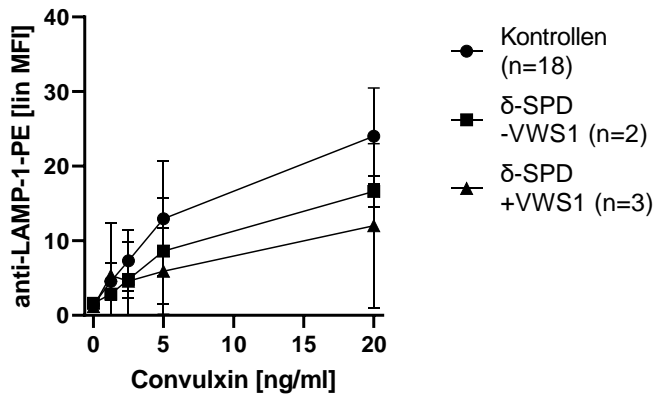


Abbildung 47: Agonistentitration der LAMP-1-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Liniendiagramm (linear) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

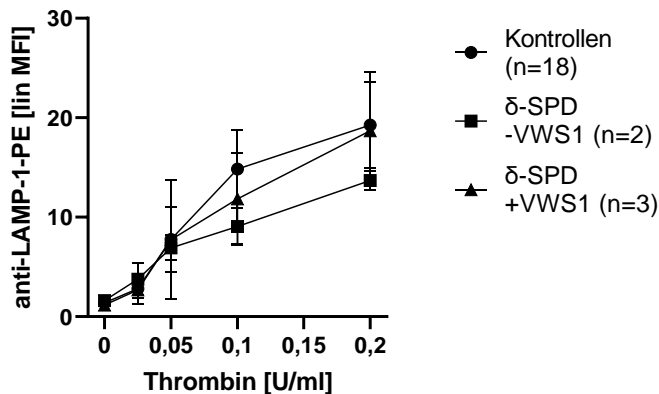


Abbildung 48: Agonistentitration der LAMP-1-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Liniendiagramm (linear) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

Im Folgenden ist beispielhaft bei Patient 6 mit δ -SPD, bei dem eine verminderte CD62P-Oberflächen-Expression bei Aktivierung mit Convulxin bzw. Thrombin in aufsteigenden Konzentrationen festgestellt wurde, zusätzlich die Aktivierung mit 0,375 μ M ADP dargestellt (siehe Abbildung 49 und Abbildung 50). Da für die α -Granula-Sekretion durch Convulxin bzw. Thrombin eine ADP-vermittelte Verstärkungsaktivierung notwendig ist, wurde somit getestet, ob bei diesem Patienten neben dem δ -SPD ein zusätzlicher α -SPD vorlag oder ob die fehlende α -Granula-Sekretion durch das verminderte bzw. fehlende ADP der δ -Granula verursacht wurde. Festzustellen war, dass bei gleichzeitiger Aktivierung mit ADP eine annähernd normale bzw. nur leicht verminderte CD62P-Oberflächen-Expression und damit Exozytose der α -Granula möglich war, somit also kein zusätzlicher α -SPD vorlag.

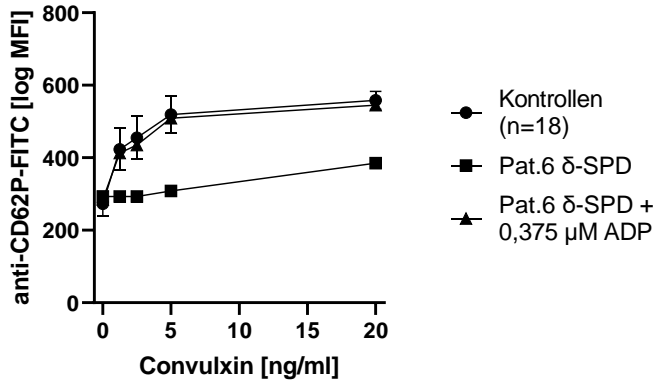


Abbildung 49: Agonistentitration der CD62P-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 1, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient 6 mit δ -SPD sowie +0,375 μ M ADP. Liniendiagramm (logarithmisch) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

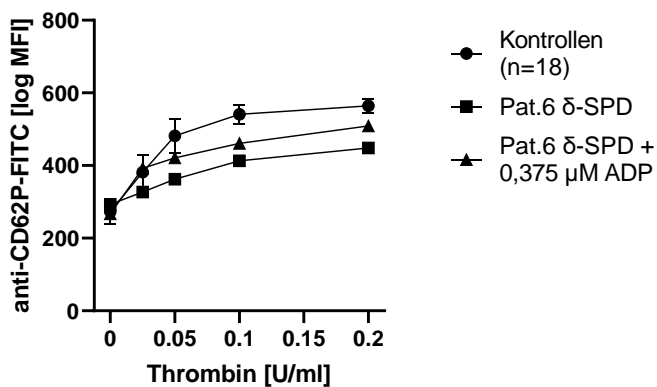


Abbildung 50: Agonistentitration der CD62P-Oberflächen-Expression nach Zugabe von 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient 6 mit δ -SPD sowie +0,375 μ M ADP. Liniendiagramm (logarithmisch) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

4.2.6.3.3 ADP-, Epinephrin-, Convulxin- und Thrombin-induzierte Fibrinogenbindung

Abbildung 51 bis Abbildung 54 veranschaulichen eine reguläre Agonisten-induzierte Fibrinogenbindung an den thrombozytären Rezeptor GPIIb/IIIa nach Aktivierung mit den Agonisten ADP, Epinephrin, Convulxin und Thrombin bei Patient:innen mit δ -SPD im Vergleich zu den Kontrollproband:innen.

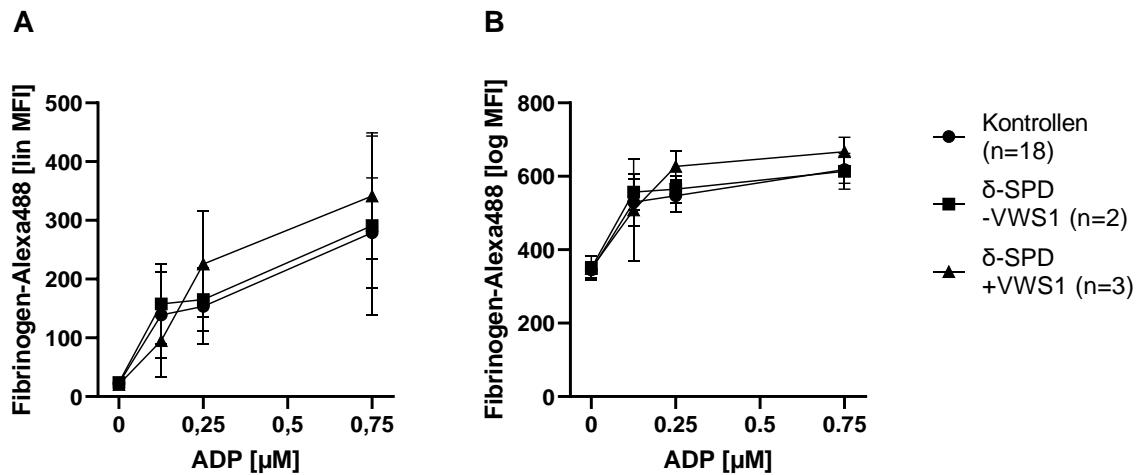


Abbildung 51: Agonistentitration der ADP-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0, 0,125, 0,25 und 0,75 μM ADP bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

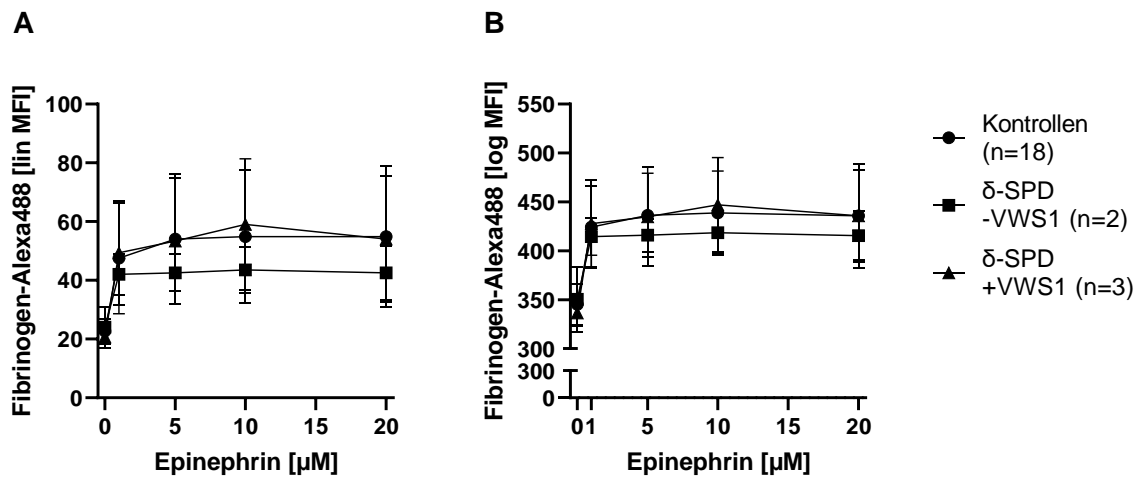


Abbildung 52: Agonistentitration der Epinephrin-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0, 1, 5, 10 und 20 μM Epinephrin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

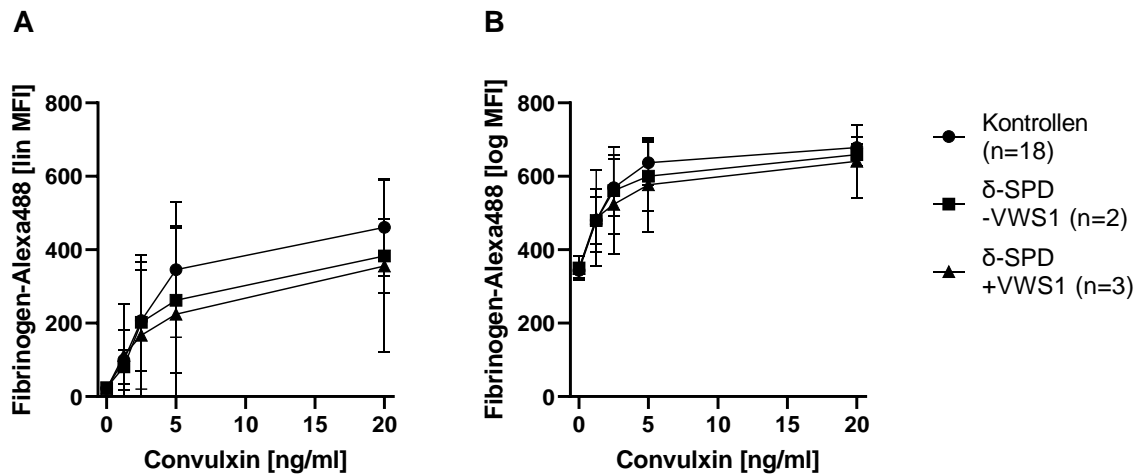


Abbildung 53: Agonistentitration der Convulxin-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

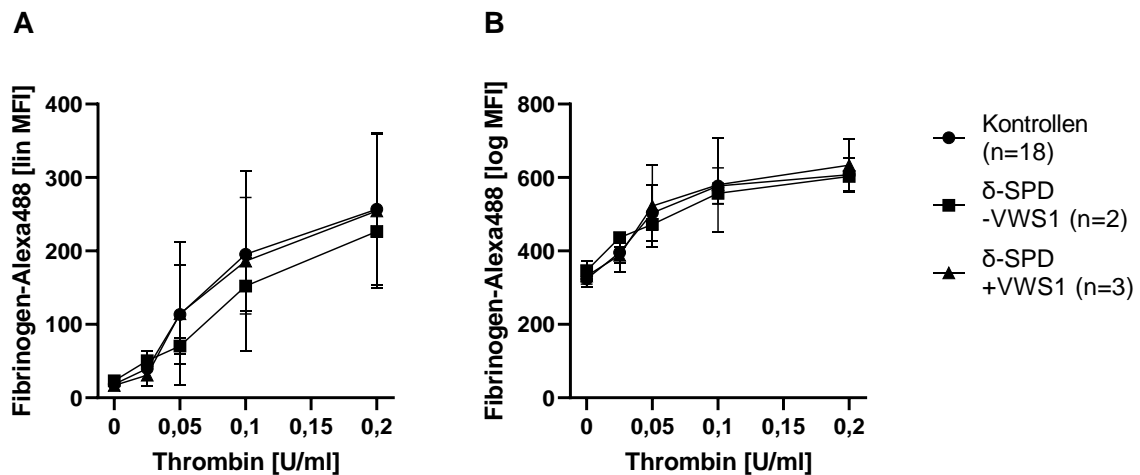


Abbildung 54: Agonistentitration der Thrombin-induzierten Fibrinogenbindung nach Zugabe von 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Liniendiagramm (linear (A) und logarithmisch (B)) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

4.3 Konfirmatorische Analyse

Zu Beginn der Studie wurde die Hauptfragestellung zur Identifizierung von Thrombozytopathien bei Patient:innen mit hämorrhagischer Diathese unklarer Genese und Patient:innen mit diagnostiziertem vWS Typ 1 mit durchflusszytometrischen Analysen von Thrombozytenfunktionsparametern formuliert. Da δ -SPD zu den häufigsten hereditären milden Thrombozytopathien gehören, wurde für die Beantwortung der Fragestellung der Mepacrine-

Assay zugrunde gelegt. Anhand etablierter Methoden der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Jurk des CTH der Universitätsmedizin Mainz wurde der Mittelwert des basalen Mepacrine-Fluoreszenzsignals (Mepacrine-Aufnahme) für gesunde Kontrollproband:innen bei 52,5 mit einer Standardabweichung ± 12 (relative Einheiten) und für Patient:innen mit nicht-syndromaler δ -SPD (quantitativ oder qualitativ) bei $< 40,4$ angenommen.

4.3.1 Durchflusszytometrische Erhebung der thrombozytären Mepacrineaufnahme in die δ -Granula *ex vivo* und der δ -Granulasekretion durch Mepacrinefreisetzung *in vitro* (Agonistentitration)

Die thrombozytäre Mepacrineaufnahme in die δ -Granula *ex vivo* (basale Mepacrineaufnahme) wurde erhoben, um zwischen einer quantitativen und einer qualitativen δ -SPD unterscheiden zu können. Möglich ist dies durch die hohe Affinität von Mepacrine zu Adeninnukleotiden wie ADP und ATP, weshalb es spezifisch in den δ -Granula akkumuliert und so den Gehalt widerspiegelt. Weiterhin wurde die thrombozytäre δ -Granulasekretion neben der Induktion der CD63-Oberflächen-Expression (siehe Kapitel 4.2.5 *Durchflusszytometrische Erhebung der thrombozytären Granula-sekretion in vitro durch Induktion der CD62P- (α -Granula), CD63- (δ -Granula und Lysosomen) und LAMP-1- (Lysosomen) Oberflächen-Expression (Agonistentitration)*) durch die Freisetzung von Mepacrine aus den δ -Granula gemessen; für die Aktivierung wurden die Agonisten Convulxin und Thrombin verwendet. Zunächst erfolgt in diesem Kapitel wie oben die Darstellung aller Patient:innen im Vergleich zu den Kontrollproband:innen, anschließend die vollständig durchgeführte Agonistentitration der Patient:innen mit bestätigten PFD im Vergleich zu den Kontrollproband:innen.

4.3.1.1 Basale Mepacrineaufnahme

Im Folgenden ist die thrombozytäre Mepacrineaufnahme in die δ -Granula ohne Zugabe von Agonisten gezeigt. Es stellte sich eine tendenziell verminderte Aufnahme bei Patient:innen der Gruppen PFD -VWS1 und PFD +VWS1 dar (siehe Abbildung 55), signifikant war dieser Unterschied jedoch nur bei Patient:innen der Gruppe PFD +VWS1 ($p=0,002$ im unpaired T-Test, siehe Tabelle 48).

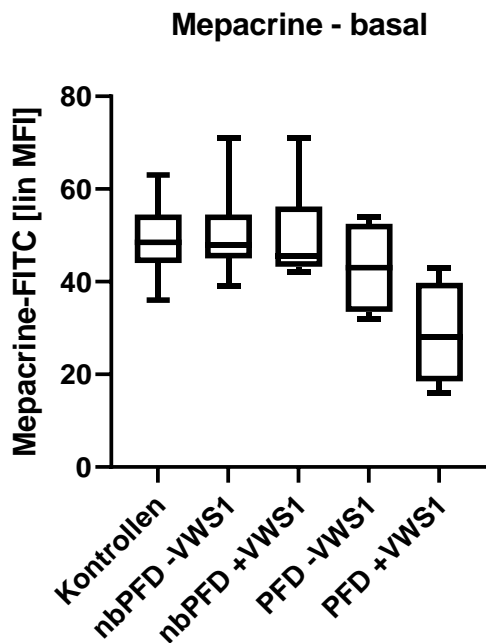


Abbildung 55: Basalwerte der Mepacrineaufnahme. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe

Tabelle 48: p-Werte der Basalwerte der Mepacrineaufnahme im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). **signifikant auffällig

Mepacrine - basal				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,6023 Unpaired T-Test	0,9388 Mann-Whitney- Test	0,1557 Unpaired T-Test	0,0002** Unpaired T-Test

4.3.1.2 Agonisten-induzierte Mepacrinefreisetzung

4.3.1.2.1 Convulxin-induzierte Mepacrinefreisetzung

Nach Aktivierung der Thrombozyten kam es zur Exozytose der δ -Granula und damit zur Freisetzung von Mepacrine, was die Abnahme des Mepacrine-Fluoreszenzsignals in Abbildung 56 verdeutlicht. Sie zeigt die Mepacrinefreisetzung nach Zugabe des Agonisten Convulxin in aufsteigenden Konzentrationen (1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml, hier dargestellt für die Konzentrationen 5 und 20 ng/ml). Im Vergleich zwischen den Patient:innen und den Kontrollproband:innen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (siehe Tabelle 49); tendenziell ließen sich jedoch bei Aktivierung mit 5 ng/ml Convulxin in der Gruppe PFD +VWS1 niedrigere Mepacrine-Fluoreszenzsignale feststellen.

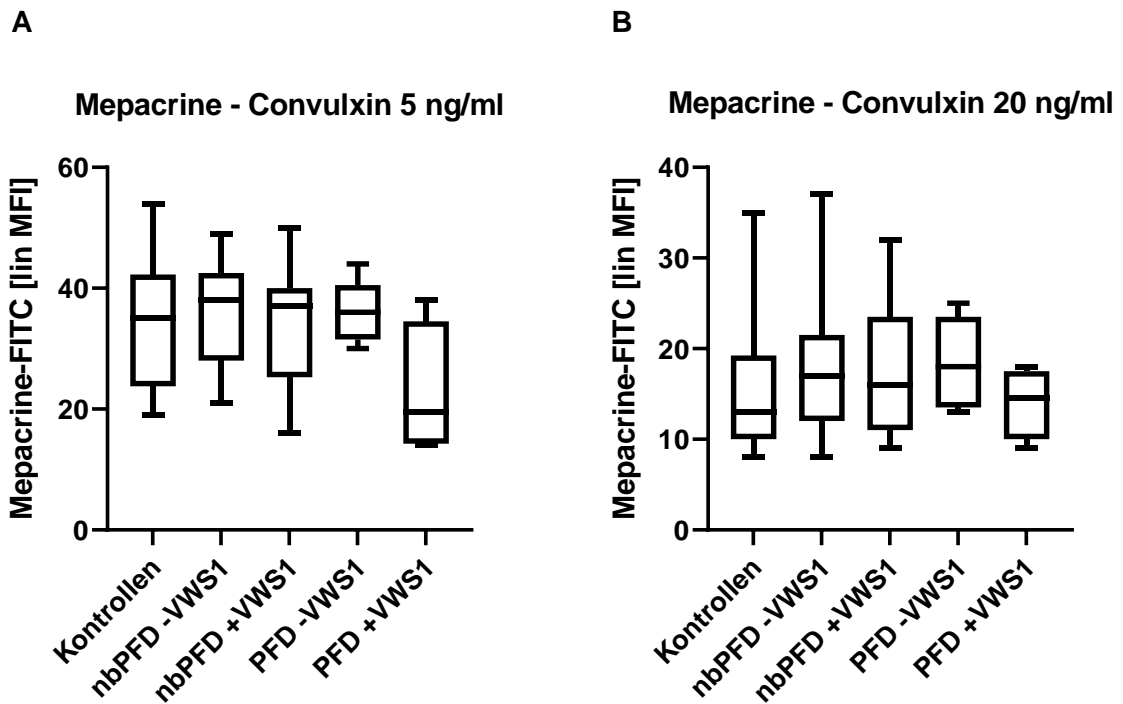


Abbildung 56: Mepacrinefreisetzung nach Zugabe von 5 (A) und 20 (B) ng/ml Convulxin. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe

Tabelle 49: p-Werte der Mepacrinefreisetzung nach Zugabe von 5 und 20 ng/ml Convulxin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). **signifikant auffällig

Mepacrine - Convulxin 5 ng/ml				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,4054 Unpaired T-Test	0,8381 Unpaired T-Test	0,6128 Unpaired T-Test	0,0722 Unpaired T-Test
Mepacrine - Convulxin 20 ng/ml				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,1212 Mann-Whitney- Test	0,3586 Mann-Whitney- Test	0,1431 Mann-Whitney- Test	0,9465 Mann-Whitney- Test

4.3.1.2.2 Thrombin-induzierte Mepacrinefreisetzung

Bei der Thrombin-induzierten Mepacrinefreisetzung nach Aktivierung in aufsteigenden Konzentrationen (0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml, hier dargestellt für die Konzentrationen 0,1 und 0,2 U/ml) zeigten sich ebenfalls niedrigere Fluoreszenzsignale bei Patient:innen der Gruppe PFD +VWS1. Signifikant war dieser Unterschied bei der Aktivierung mit 0,1 U/ml Thrombin ($p=0,0049$ im Mann-Whitney-Test), nicht mehr signifikant, aber tendenziell

vorhanden war er bei Aktivierung der Thrombozyten mit 0,2 U/ml Thrombin (siehe Abbildung 57 und Tabelle 50). Bei den Patient:innen der Gruppe nbPFD +VWS1 zeigten sich signifikant höhere Mepacrine-Fluoreszenzsignale bei Aktivierung mit 0,2 U/ml Thrombin im Vergleich zu den Kontrollproband:innen ($p=0,0035$ im unpaired T-Test).

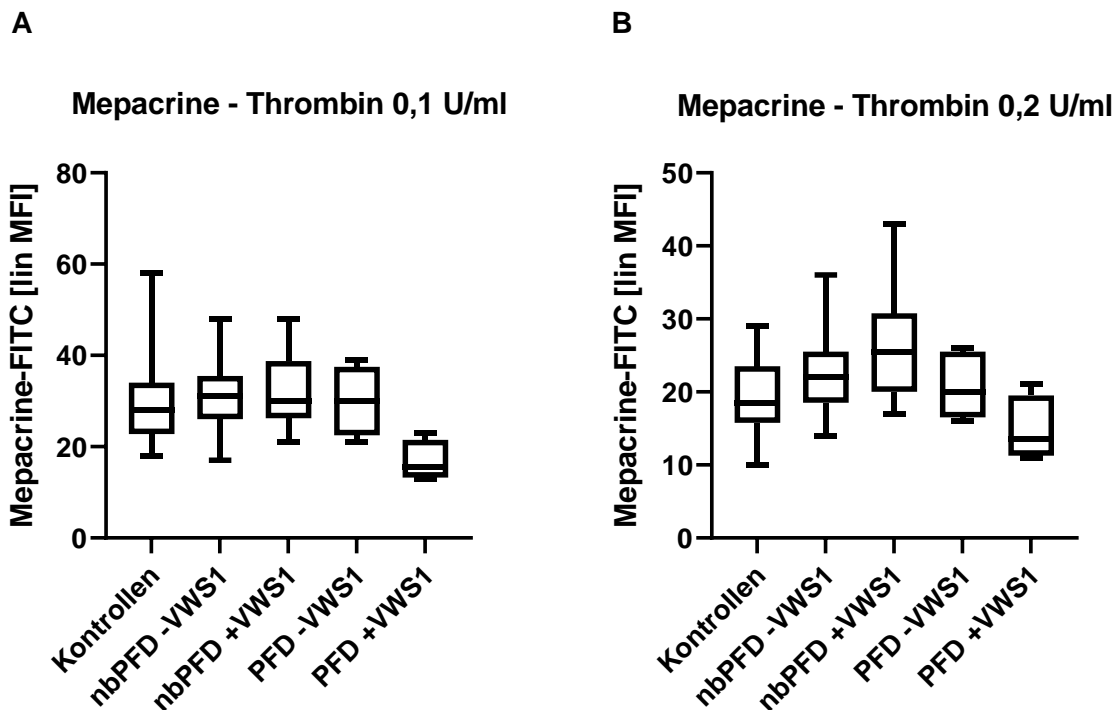


Abbildung 57: Mepacrinefreisetzung nach Zugabe von 0,1 (A) und 0,2 (B) U/ml Thrombin. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe

Tabelle 50: p -Werte der Mepacrinefreisetzung nach Zugabe von 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). **signifikant auffällig

Mepacrine - Thrombin 0,1 U/ml				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,2931 Mann-Whitney- Test	0,1612 Mann-Whitney- Test	0,6497 Mann-Whitney- Test	0,0049** Mann-Whitney- Test
Mepacrine - Thrombin 0,2 U/ml				
	nbPFD -VWS1 (n=29)	nbPFD +VWS1 (n=16)	PFD -VWS1 (n=5)	PFD +VWS1 (n=4)
Kontrollen (n=18)	0,1062 Unpaired T-Test	0,0035** Unpaired T-Test	0,5895 Unpaired T-Test	0,1164 Unpaired T-Test

4.3.2 Durchflusszytometrische Erhebungen der Patient:innen mit bestätigten PFD

Im Folgenden sind die durchflusszytometrischen Erhebungen der Mepacrineaufnahme und -freisetzung in bzw. aus den δ -Granula der Patient:innen dargestellt, bei denen eine PFD bestätigt wurde. Die Darstellung erfolgt getrennt nach der jeweiligen PFD im Vergleich zu den Kontrollproband:innen.

4.3.2.1 Patient:innen mit δ -SPD

4.3.2.1.1 Basale Mepacrineaufnahme in und Convulxin- und Thrombin-induzierte Mepacrinefreisetzung aus den δ -Granula

Abbildung 58 (A) veranschaulicht die deutlich verminderte basale Mepacrineaufnahme in die δ -Granula bei den untersuchten Patient:innen mit δ -SPD. Die zu Beginn der Studie anhand etablierter Methoden der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Jurk des CTH der Universitätsmedizin Mainz angenommenen Mittelwerte des Mepacrine-Fluoreszenzsignals für gesunde Kontrollproband:innen von 52,5 mit einer Standardabweichung ± 12 (relative Einheiten) zeigten sich in dieser Studie ähnlich; sie zeigte einen Mittelwert von 48,78 und eine Standardabweichung $\pm 5,728$. Auch die für Patient:innen mit nicht-syndromaler δ -SPD (quantitativ oder qualitativ) angenommenen Basalwerte von $<40,4$ wurden bei allen Patient:innen gemessen; in dieser Studie lag der Mittelwert in der Gruppe δ -SPD -VWS1 bei 33,50 mit einer Standardabweichung $\pm 2,12$ und in der Gruppe δ -SPD +VWS1 bei 24,00 mit einer Standardabweichung $\pm 7,21$. Die in der Gruppe δ -SPD +VWS1 deutliche Verminderung des Fluoreszenzsignals zeigte sich signifikant auffällig ($p < 0,0001$ im unpaired T-Test, siehe Tabelle 51). In der Gruppe δ -SPD -VWS1 waren aufgrund einer zu geringen Fallzahl keine statistischen Analysen möglich, jedoch lag tendenziell auch hier eine verminderte Mepacrineaufnahme vor.

Die geringe Convulxin-induzierte Mepacrinefreisetzung in aufsteigenden Konzentrationen (1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml) und die verminderte Abnahme des Mepacrine-Fluoreszenzsignals verdeutlicht Abbildung 59. Nach Aktivierung mit 20 ng/ml Convulxin zeigte sich nur noch ein geringer, nicht signifikanter Unterschied des Fluoreszenzsignals zwischen den Patient:innen mit δ -SPD und den Kontrollproband:innen (siehe Abbildung 58 (B) und Tabelle 51).

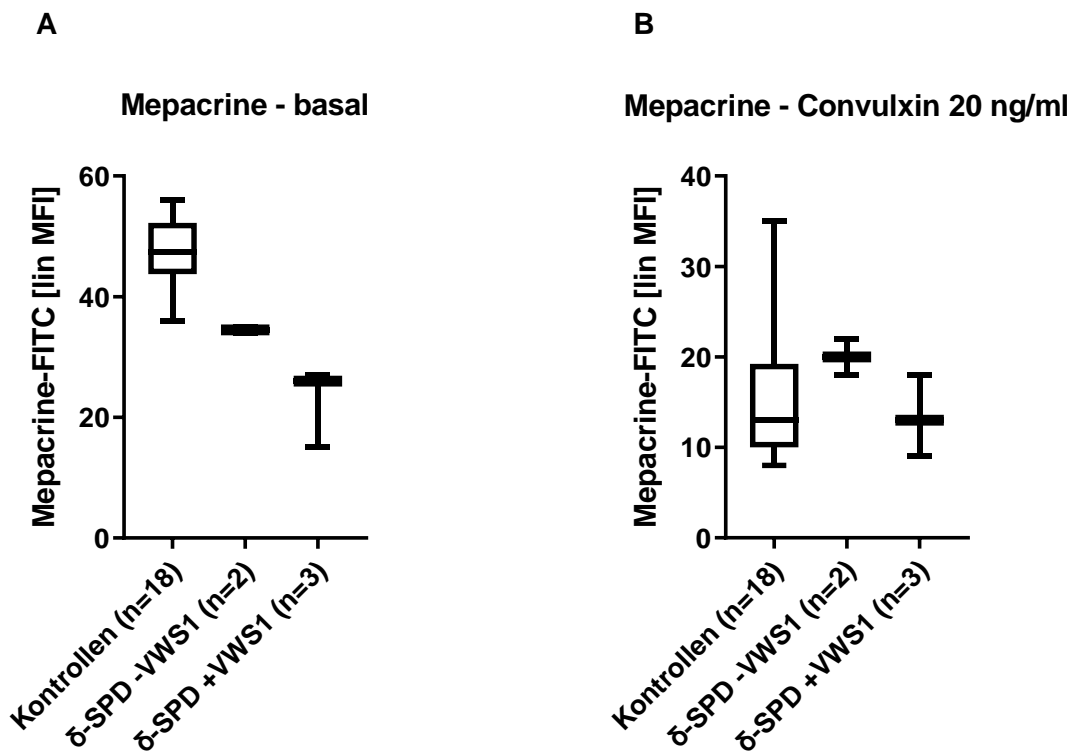


Abbildung 58: Basalwerte der Mepacrineaufnahme (A) und -freisetzung nach Zugabe von 20 ng/ml Convulxin (B) bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe

Tabelle 51: p-Werte der Basalwerte der Mepacrineaufnahme und -freisetzung nach Zugabe von 20 ng/ml Convulxin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). **signifikant auffällig

Mepacrine - basal		
	δ -SPD -VWS1 (n=2)	δ -SPD +VWS1 (n=3)
Kontrollen (n=18)	n zu klein	<0,0001** Unpaired T-Test
Mepacrine - Convulxin 20 ng/ml		
	δ -SPD -VWS1 (n=2)	δ -SPD +VWS1 (n=3)
Kontrollen (n=18)	n zu klein	0,7564 Mann-Whitney-Test

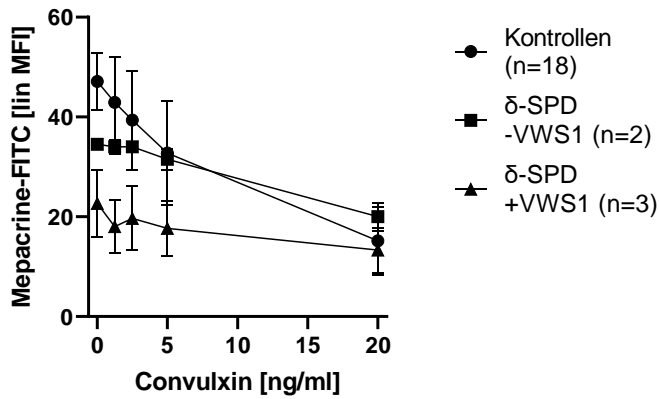


Abbildung 59: Agonistentitration der Mepacrineaufnahme und -freisetzung nach Zugabe von 0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Liniendiagramm (linear) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

Auch nach Aktivierung der Thrombozyten mit Thrombin in aufsteigenden Konzentrationen (0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml, siehe Abbildung 61) zeigte sich die deutliche Verminderung der Mepacrinefreisetzung aus den δ -Granula. Signifikant war dieser Unterschied bei einer Konzentration von 0,2 U/ml Thrombin in der Gruppe δ -SPD +VWS1 ($p=0,0433$ im unpaired T-Test, siehe Abbildung 60 und Tabelle 52). In der Gruppe δ -SPD -VWS1 war bei dieser Konzentration kaum noch ein Unterschied im Vergleich zu den Kontrollproband:innen nachweisbar.

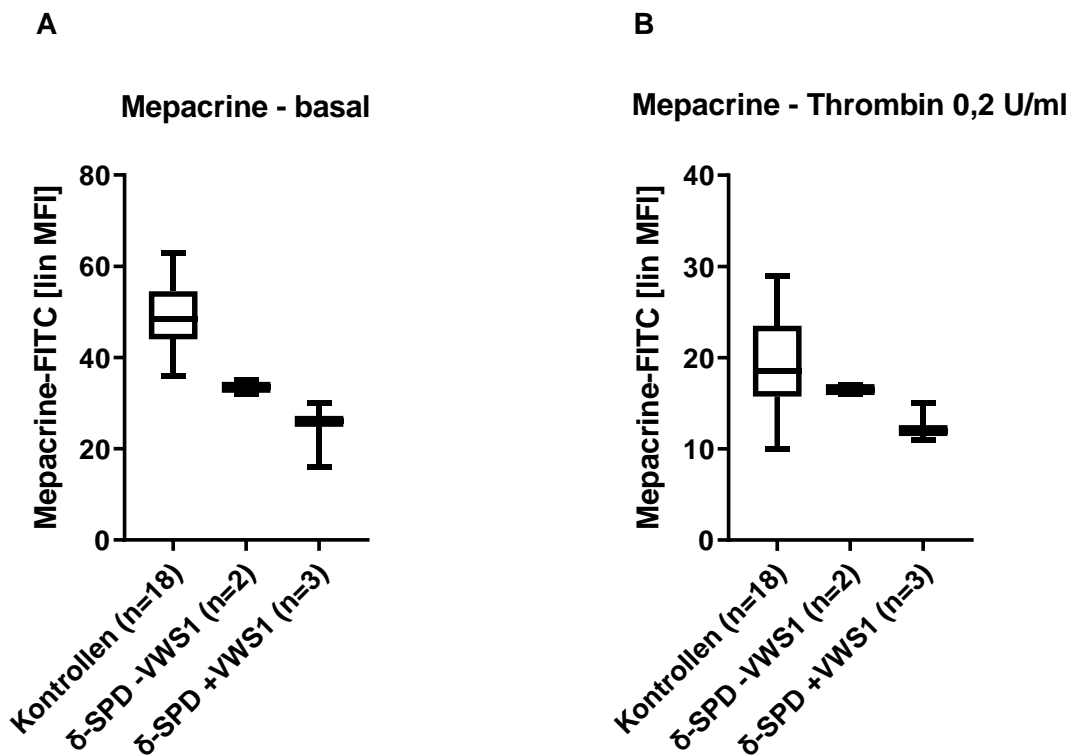


Abbildung 60: Basalwerte der Mepacrineaufnahme (A) und -freisetzung nach Zugabe von 0,2 U/ml Thrombin (B) bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Box-Plot-Darstellung mit Minimal- und Maximalwert je Gruppe

Tabelle 52: p-Werte der Basalwerte der Mepacrineaufnahme und -freisetzung nach Zugabe von 0,2 U/ml Thrombin im Vergleich zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Verwendung des unpaired T-Tests (Normalverteilung) oder Mann-Whitney-Tests (keine Normalverteilung). **signifikant auffällig

Mepacrine - basal		
	δ -SPD -VWS1 (n=2)	δ -SPD +VWS1 (n=3)
Kontrollen (n=18)	n zu klein	<0,0001** Unpaired T-Test
Mepacrine - Thrombin 0,2 U/ml		
	δ -SPD -VWS1 (n=2)	δ -SPD +VWS1 (n=3)
Kontrollen (n=18)	n zu klein	0,0433** Unpaired T-Test

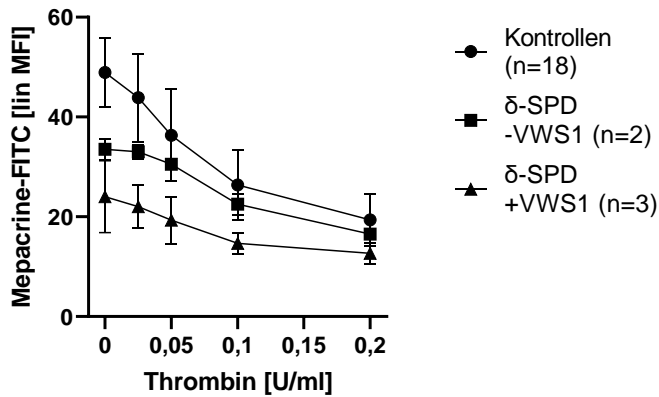


Abbildung 61: Agonistentitration der Mepacrineaufnahme und -freisetzung nach Zugabe von 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit δ -SPD. Liniendiagramm (linear) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

4.3.2.2 Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung

4.3.2.2.1 Basale Mepacrineaufnahme in und Convulxin- und Thrombin-induzierte Mepacrinefreisetzung aus den δ -Granula

In Abbildung 62 und Abbildung 63 sind die Agonistentitrationen der Mepacrineaufnahme und -freisetzung in bzw. aus den δ -Granula in aufsteigenden Konzentrationen von Convulxin (0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml) und Thrombin (0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml) der Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung dargestellt. Sie zeigen eine normal induzierbare Mepacrineaufnahme und -freisetzung im Vergleich zu den Kontrollproband:innen.

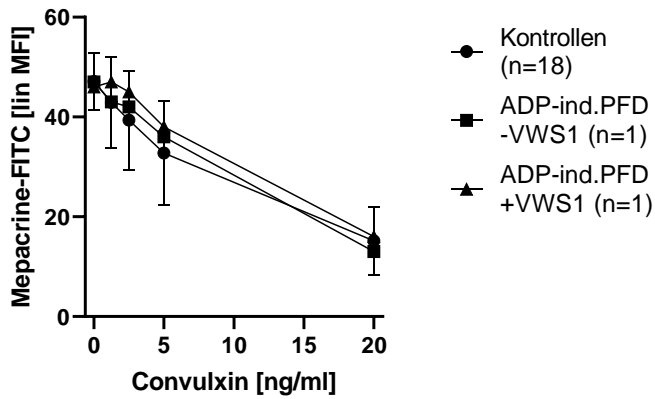


Abbildung 62: Agonistentitration der Mepacrineaufnahme und -freisetzung nach Zugabe von 0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

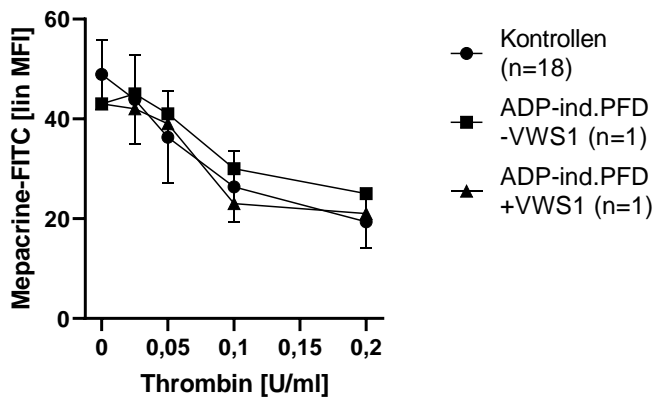


Abbildung 63: Agonistentitration der Mepacrineaufnahme und -freisetzung nach Zugabe von 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

4.3.2.3 Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung

4.3.2.3.1 Basale Mepacrineaufnahme in und Convulxin- und Thrombin-induzierte Mepacrinefreisetzung aus den δ -Granula

Abbildung 64 und Abbildung 65 zeigen die Agonistentitrationen der Mepacrineaufnahme und -freisetzung in bzw. aus den δ -Granula der Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung in aufsteigenden Konzentrationen von Convulxin (0,

1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml) und Thrombin (0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml). Es war eine normal induzierbare Mepacrineaufnahme und -freisetzung im Vergleich zu den Kontrollproband:innen festzustellen.

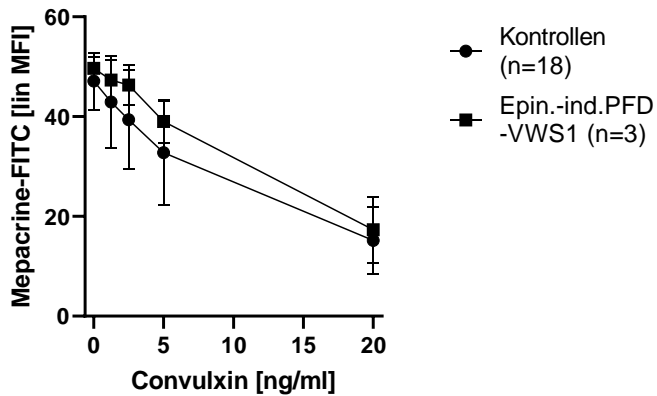


Abbildung 64: Agonistentitration der Mepacrineaufnahme und -freisetzung nach Zugabe von 0, 1,25, 2,5, 5 und 20 ng/ml Convulxin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

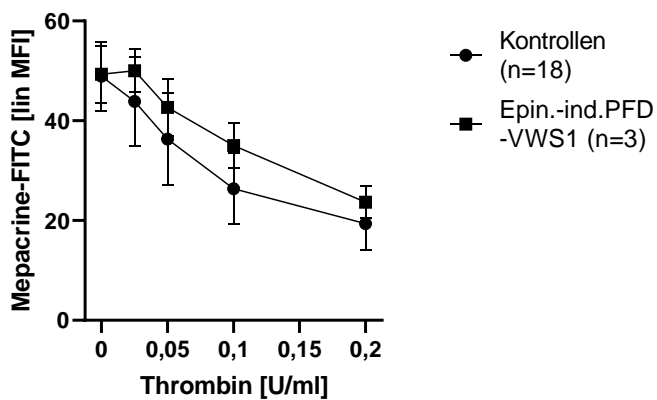


Abbildung 65: Agonistentitration der Mepacrineaufnahme und -freisetzung nach Zugabe von 0, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,2 U/ml Thrombin bei Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Liniendiagramm (linear) mit Mittelwert und Standardabweichung je Gruppe

5 Diskussion

Die zentrale Bedeutung der Thrombozyten in der Steuerung der primären Hämostase ist Gegenstand intensiver Untersuchungen (22, 24), und es sind verschiedene thrombozytäre Dysfunktionen beschrieben, die sich als hämorrhagische Diathesen unterschiedlicher Symptomausprägung präsentieren (4, 8, 9). Die in dieser Arbeit fokussierten hereditären, nicht-syndromalen Thrombozytopathien sind bisher weniger untersucht; sie stellen eine heterogene Gruppe seltener Erkrankungen bezüglich ihrer Häufigkeit, ihrem Schweregrad, ihrer Thrombozytendysfunktion, -konzentration und -volumen dar und gehen meist mit milden bis moderaten Blutungsneigungen einher. Jedoch können auch lebensbedrohliche Blutungen während Operationen oder Traumata auftreten (8, 10, 11), weshalb ihre Diagnostik essentiell für eine adäquate Therapie ist. Die Diagnostik stellt noch immer eine Herausforderung dar (12) und ist mittels spezialisierter Thrombozyten-Phänotypisierungen und Funktionstests (13, 14) nur in wenigen Zentren möglich.

Zur weiteren Herausstellung der klinischen Bedeutung der hereditären, nicht-syndromalen Thrombozytopathien wurden im Rahmen dieser Arbeit 54 Patient:innen der hämostaseologischen Ambulanz des CTH und der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz untersucht, die zur Abklärung einer vermehrten Blutungsneigung vorstellig waren, bei denen jedoch nach standardisierter Abklärung mittels anamnestischer sowie laboranalytischer Methoden inklusive der globalen Thrombozytenfunktionstests PFA-100 und LTA nach Born keine eindeutige Ursache der hämorrhagischen Diathese gefunden wurde. Auch eingeschlossen wurden Patient:innen mit vWS Typ 1, da in Untersuchungen wie beispielsweise von Lavin et al. (17) festgestellt wurde, dass dieses die anamnestische Blutungsneigung oft nicht ausreichend erklären kann. Im Rahmen dieser Arbeit konnte bei 9 der 54 untersuchten Patient:innen mit diagnostizierter „Blutungsneigung unklarer Genese“ oder mit „vWS Typ 1“ mit durchflusszytometrischen Methoden eine Thrombozytopathie bestätigt werden. Darunter fanden sich fünf Patient:innen mit einer δ -SPD, eine mit einer ADP- und zwei mit einer Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung sowie ein Patient mit einer „Gi-like“ Thrombozytopathie. Bei 4 der 9 Patient:innen lag gleichzeitig ein vWS Typ 1 und eine Thrombozytopathie vor. Verglichen wurden die Patient:innen mit 18 gesunden Kontrollproband:innen.

Das Besondere dieser Arbeit war der Einschluss von Patient:innen unabhängig von den Ergebnissen der durchgeführten globalen Thrombozytenfunktionstests PFA-100 Kollagen/ADP und Kollagen/Epinephrin und der LTA nach Born in PRP mit den Agonisten ADP, Epinephrin,

Arachidonsäure, Kollagen und Ristocetin und unabhängig vom Ergebnis des „bleeding score“ des Blutungseigenanamnese-Fragenbogens ISTH-BAT. Weiterhin besonders war die Betrachtung des gemeinsamen Vorliegens eines vWS Typ 1 und einer Thrombozytopathie. Neben der Auswertung der Ergebnisse des PFA-100 und der LTA nach Born sowie des ISTH-BAT „bleeding score“ wurde in dieser Arbeit die Anzahl der Rezeptor-ABS der Hauptglykoproteine auf der Thrombozytenoberfläche erhoben und die Bindungsfähigkeit des vWF an den Rezeptor GPIIb/IIIa durch Fibrinogenbindung und die Exozytose der α -Granula, δ -Granula und Lysosomen untersucht. Eine Beurteilung über Signifikanzen wurde ausschließlich mit Hilfe des Mepacrine-Assays durchgeführt (siehe Kapitel 4.3 *Konfirmatorische Analyse*).

Die Patient:innen dieser Arbeit (Einschluss ≥ 18 Jahre) mit diagnostizierter Thrombozytopathie waren über alle Altersgruppen verteilt (19-75 Jahre) und in beiden vorherrschenden Geschlechtern vorhanden, jedoch wurden in die Studie insgesamt deutlich mehr Frauen eingeschlossen (Verhältnis eingeschlossener Patient:innen insgesamt: Frauen:Männer: 87,04%:12,96%), und es wurden entsprechend auch mehr Patientinnen mit Thrombozytopathie diagnostiziert (Verhältnis der Patient:innen mit Thrombozytopathie: Frauen:Männer: 2:1). Ein Überwiegen des Anteils an Frauen wurde bereits in vergleichbaren Studien wie beispielsweise von Gebhart et al. (15) festgestellt. Eine mögliche Ursache hierfür ist mit den wiederkehrenden hämostaseologischen Herausforderungen von Menstruation und Geburten in der Literatur beschrieben (11, 162), nicht jedoch durch einen geschlechtsspezifischen thrombozytären Unterschied (15).

5.1 Unterschätzte Prävalenz von vermutlich hereditären, nicht-syndromalen Thrombozytopathien bei Patient:innen mit hämorrhagischer Diathese unklarer Genese oder mit vWS Typ 1

Die genaue Prävalenz von milden Thrombozytenfunktionsstörungen ist nicht bekannt, sie wird jedoch derzeit aufgrund der begrenzten und aufwändigen diagnostischen Möglichkeiten in der Literatur von Mezzano et al. (12), Gebhart et al. (15), Hayward (163) und weiteren unterschätzt, was auch diese Arbeit bestätigt. In Untersuchungen von Quiroga et al. (129) und Gebhart et al. (15) sind sie neben dem vWS als eine der häufigen Ursachen bei Patient:innen mit hämorrhagischer Diathese beschrieben; bei einem Großteil der Patient:innen dieser Studien blieb die Blutungsursache jedoch weiterhin unklar. Diese Studien sind nur bedingt mit der vorliegenden Arbeit zu vergleichen, da in oben genannten Studien auf verschiedenste

hämorrhagische Diathesen hin untersucht wurde, beispielsweise auch auf Erkrankungen wie dem vWS Typ 2 oder 3 oder Einzelfaktormängel. Diese wurden in der vorliegenden Arbeit im Vorhinein ausgeschlossen; man könnte diese Arbeit bezüglich der Prävalenzerhebung also als eine Fortführung oben genannter Untersuchungen mit denjenigen Patient:innen ansehen, bei denen eine „Blutung unbekannter Genese“ diagnostiziert wurde. Dies umfasste in den oben genannten Studien aber eine deutliche Mehrheit von knapp 60% (12, 129) bzw. 72,5% (15) der untersuchten Patient:innen.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde bei 9 von insgesamt 54 untersuchten Patient:innen mit „hämorrhagischer Diathese unklarer Genese“ oder mit „vWS Typ 1“ eine vermutlich hereditäre, nicht-syndromale Thrombozytopathie phänotypisch bestätigt, was einer Häufigkeit von 16,67% entspricht. Da jedoch nur in einem Zeitraum von drei Monaten (September bis November 2018) in der hämostaseologischen Ambulanz des CTH und der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz systematisch gescreent und auf den Ausschluss bereits diagnostizierter hämorrhagischer Diathesen geachtet wurde, wurden für die Prävalenzerhebung dieser Arbeit nur die Patient:innen berücksichtigt, die in diesen drei Monaten vorstellig waren. Dies umfasst 37 Patient:innen, von denen bei 5 Personen eine vermutlich hereditäre, nicht-syndromale Thrombozytopathie festgestellt wurde, was einer Prävalenz von 13,5% unter den Patient:innen mit hämorrhagischer Diathese unklarer Genese oder vWs Typ 1 (mit einem 95%-Konfidenzintervall von 5,9-28,0%) entspricht.

In den oben genannten Studien wurden zusätzlich zum Anteil an „Blutungen unklarer Genese“ Thrombozytopathien in 23,2% (129) bzw. 6,2% gesicherten plus 7,2% möglichen (15) Fällen diagnostiziert. Mezzano et al. (12) erhielten in einer vergleichbaren Arbeit ähnliche Ergebnisse; hier wurde bei 19,3% eine hereditäre Thrombozytopathie diagnostiziert; weiterhin wurde das gemeinsame Vorliegen einer Thrombozytopathie und eines vWS Typ 1 mit 3,2% erhoben. Zu diesen Ergebnissen kommen die in der vorliegenden Arbeit festgestellten 13,5% hinzu, was die Prävalenz dieser Erkrankungen weiter erhöht und die bisher unterschätzte Prävalenz unterstreicht. Da es sich in dieser Arbeit jedoch um eine kleine Studienpopulation handelt, sind Übertragungen auf die Gesamtpopulation vorsichtig zu bewerten und nachfolgende Untersuchungen in größerem Umfang wünschenswert.

5.2 Limitierung der Erfassung von vermutlich hereditären, nicht-syndromalen Thrombozytopathien durch die globalen Thrombozytenfunktionstests PFA-100 und LTA nach Born

Das standardisierte Vorgehen der hämostaseologischen Ambulanz des CTH und der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz bei Verdacht auf eine hämorrhagische Diathese umfasst neben den anamnestischen Erhebungen bezüglich stattgehabter Blutungsereignisse Laborscreenings inklusive des kleinen Blutbildes, den Parametern der Globalgerinnung, CRP, FVIII-Aktivität, PAI, FXIII und bei Auffälligkeiten der Globalgerinnung eine gezielte Bestimmung weiterer Parameter. Bei Verdacht auf ein vWS und/oder auf eine Thrombozytopathie werden die vWF-Parameter erhoben und/oder die globalen Thrombozytenfunktionstests PFA-100 Kollagen/ADP und Kollagen/Epinephrin und die LTA nach Born in PRP mit hohen Konzentrationen der Agonisten ADP, Epinephrin, Arachidonsäure, Kollagen und Ristocetin sowie niedrigen Konzentrationen des Agonisten Ristocetin durchgeführt. Dieses Vorgehen dient in der klinischen Routine dem Erkennen häufiger hämorrhagischer Diathesen, doch in einigen Fällen kommt es trotz Wiederholung der Untersuchungen zu keiner eindeutigen Ursachenfindung. Sind die Parameter der globalen Thrombozytenfunktionstests PFA-100 und/oder die LTA nach Born mindestens zweimal pathologisch verändert, besteht Hinweis auf eine Funktionsstörung der Thrombozyten. Mezzano et al. (12), Gresele et al. (14) und weitere haben bereits beschrieben, dass die standardisierten globalen Thrombozytenfunktionstests die milden bis moderaten Thrombozytopathien nicht zuverlässig detektieren, sodass bei anamnestischer Blutungsneigung auch bei Normwerten eine Thrombozytenfunktionsstörung nicht sicher ausgeschlossen werden kann. Daher wurden in diese Arbeit die Patient:innen unabhängig von den Ergebnissen der Thrombozytenfunktionstests PFA-100 und der LTA nach Born eingeschlossen. Weitere von Streif et al. in der aktuellen AWMF-Leitlinie zur Diagnose von Thrombozytenfunktionsstörungen (42) als nicht empfohlen aufgeführte Verfahren sind der Rumpel-Leed-Test, der petechiale Hauteinblutungen am Unterarm nach Aufblasen einer Blutdruckmanschette am Obererarm provoziert, der VerifyNow™, der die Bildung von Aggregaten durch Lichttransmission misst und der Impact-R™, welcher die Viskosität durch Thrombozytenadhäsion bestimmt. Die beiden Letzteren wurden für das „anti-platelet drug monitoring“ entwickelt und sind nicht für die Diagnose und Klassifizierung von hereditären Thrombozytopathien evaluiert (42). Weiterhin nicht empfohlen sind die Thrombelastographie, welche neben der Quick- und aPTT-Messung auch die Entstehung, Festigkeit und Auflösung eines Gerinnsels untersuchen kann, der Prothrombinverbrauchstest und der Thrombusretraktionstest (42).

Der PFA-100 ist eine Methode zur Bestimmung der „closure time“, also der Zeit bis zum Verschluss einer Membranöffnung durch Gerinnelbildung *in vitro* nach Aktivierung der Thrombozyten im Citrat-gepufferten antikoagulierten Vollblut (135). Wird die Membranöffnung nicht oder verspätet verschlossen, deutet dies auf eine Störung der primären Hämostase hin; jedoch ist keine Ableitung einer spezifischen Ursache möglich. Die Ergebnisse des PFA-100 sind, wie bereits mehrfach in der Literatur (52, 135, 164, 165) dargestellt wurde, für die Bewertung von Thrombozytopathien aufgrund der limitierten Sensitivität und vor allem Spezifität nur eingeschränkt verwendbar, da die „closure time“ primär nur bei schweren Defekten der Thrombozytenfunktion oder beim vWS verlängert ist. Auf der anderen Seite schließt auch ein Normalbefund das Vorliegen einer leichten bis moderaten Thrombozytopathie nicht aus (42, 166). Weiterhin ist beschrieben, dass die Verschlusszeiten des PFA-100 bei einem Hämatokrit >50% und einer Thrombozytenkonzentration >500 000/µl verkürzt und bei einem Ikterus, einer Anämie (Hämatokrit <35%) und einer Thrombozytopenie (<150 000/µl) verlängert sein können (42), was die Beurteilung der Ergebnisse zusätzlich erschwert. Auch diese Arbeit bestätigt die eingeschränkte Beurteilbarkeit des PFA-100 in der zuverlässigen Detektion von Thrombozytopathien: Es zeigten 60% der Patient:innen mit diagnostizierter Thrombozytopathie ohne vWS Typ 1 bei Stimulation der Thrombozyten mit dem Agonisten Kollagen/ADP normwertige und 0% gleich oder mehr als zweimal auffällige Ergebnisse; Patient:innen mit Thrombozytopathie und vWS Typ 1 zeigten zu 75% gleich oder mehr als zweimal auffällige Ergebnisse. Dabei war nicht zu unterscheiden, ob dies an der eingeschränkten Thrombozytenfunktion oder an der wie oben beschriebenen Verlängerung durch das Vorliegen des vWS lag. Bei Stimulation mit Kollagen/Epinephrin wurden in beiden Patient:innengruppen mit und ohne vWS Typ 1 überwiegend auffällige Ergebnisse festgestellt. Die Ergebnisse des PFA-100 der Patient:innen mit nicht-bestätigten Thrombozytopathien zeigten keinen richtungsweisenden Befund, die Ergebnisse waren sowohl normwertig als auch auffällig; häufig war der PFA-100 bei Patient:innen mit vWS Typ 1 gleich oder mehr als zweimal auffällig. Aufgrund einer zu niedrigen Thrombozytenkonzentration oder fehlerhafter Präanalytik konnte der PFA-100 nicht bei allen Patient:innen bestimmt werden, was einen weiteren Nachteil dieser Methode aufzeigt. Aufgrund all der genannten Einschränkungen und der Ergebnisse dieser Untersuchung unterstreicht diese Arbeit die Empfehlung aktueller anderer Arbeiten wie von Gresele et al. (10), Kaufmann et al. (167) und Jurk et al. (105), den PFA-100 nicht mehr für die spezifische Diagnostik von Thrombozytopathien zu verwenden. In der klinischen Routine wird er weiterhin als Screeningmethode zur Detektion von Störungen der primären Hämostase eingesetzt.

Die LTA beruht auf dem Prinzip der kontinuierlichen, photometrischen Messung der zunehmenden Lichttransmission bei der Bildung von Thrombozytenaggregaten nach Zugabe

von Agonisten im PPR und gilt aktuell als Goldstandard in der Thrombozytenfunktionsdiagnostik (42, 132). Die LTA nach Born in PRP, die in der Routinediagnostik, so auch im Zentrallabor der Universitätsmedizin Mainz, mit hohen Konzentrationen der Agonisten Arachidonsäure, ADP, Epinephrin, Kollagen und Ristocetin sowie niedrigen Konzentrationen von Ristocetin durchgeführt wird, zeigte jedoch ebenfalls, dass Thrombozytopathien nicht immer erkennbar waren. Beispielsweise wird in der LTA nach Born bei Vorliegen einer δ -SPD eine Beeinträchtigung der Antwort von ADP, Epinephrin und Kollagen erwartet, die jedoch nicht immer vorhanden bzw. sichtbar war: In dieser Arbeit zeigte eine Patientin mit δ -SPD auch bei Wiederholung keinerlei Auffälligkeiten in der LTA, bei anderen Patient:innen wurden diese nicht bei Aktivierung mit allen Agonisten festgestellt, wie beispielsweise nicht bei Aktivierung mit Kollagen. Die bei einer Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung erwarteten verminderten Antworten bei Aktivierung mit Epinephrin waren bei den Patient:innen dieser Arbeit vorhanden, nicht jedoch eine verminderte Antwort bei Aktivierung mit ADP bei einer Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung. Daher ist auch die LTA in der alleinigen Diagnostik von Thrombozytopathien limitiert (10, 52) und komplexere Analysen sind notwendig.

Wie zu erwarten, zeigten die übrigen Blutparameter, insbesondere die Werte der Globalgerinnung, der diagnostizierten Patient:innen mit Thrombozytopathien dieser Arbeit überwiegend normwertige Ergebnisse. Somit wurden andere Blutgerinnungsstörungen, wie z.B. plasmatische Gerinnungsstörungen, wie vorher definiert, ausgeschlossen. Die Patient:innen mit vWS Typ 1 wiesen niedrigere, jedoch noch normwertige vWF-Parameter auf. Thrombozytopathien können zum Teil mit Thrombozytopenien einhergehen, wie es auch in dieser Arbeit bei 3 der 9 Patient:innen festgestellt wurde. Nicht alle in der klinischen Routine eingesetzten Thrombozytenfunktionstests, wie der oben beschriebene PFA-100, sind für die Diagnostik von Patient:innen mit Thrombozytopenie plus -pathie geeignet (105).

Die in dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometrie für die Diagnostik von Thrombozytenfunktionsstörungen stellt hingegen eine geeignetere Methode dar, wie mehrfach in Studien gezeigt wurde, beispielsweise von van Asten et al. (168) oder Navred et al. (169). Die Durchflusszytometrie ermöglicht mit Hilfe der Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen die Analyse von Eigenschaften von Zellen auf Einzelzellebene und gibt Informationen über das Vorhandensein von Rezeptoren oder Aktivierungsmarkern auf der Thrombozytenoberfläche (152). Weiterhin kann *in vitro* die Reaktion der Thrombozyten auf bestimmte Agonisten bestimmt werden (13). Dies gilt auch für Patient:innen mit Thrombozytopenie (105, 170); bei einer sehr ausgeprägten Thrombozytenkonzentration von $<10 \times 10^9/\text{ml}$ kann sich aufgrund der verminderten freigesetzten Menge an thrombozytärem ADP aus den δ -Granula dennoch ein

Einfluss auf die Verstärkung der Thrombozyten-Aktivierung zeigen (171). Ein Nachteil in der Verwendung der Durchflusszytometrie ist die notwendige hohe Spezialisierung von Mitarbeiter:innen und Geräten (172).

5.2.1 Präanalytische und weitere Herausforderungen in der Diagnostik von Thrombozytopathien und vWS

Nicht nur die Laboranalysen selbst, auch die Präanalytik erschwert die Diagnostik von Thrombozytenfunktionsstörungen und vWS. Mögliche Fehlerquellen sind dabei folgende (81, 173, 174): Erfolgt bei der Blutabnahme ein zu langes Stauen des Arms, kann es zur Hämokonzentration und gegebenenfalls Gerinnungsaktivierung kommen. Bei Verwendung einer zu kleinen Nadel ist eine Gewebeverletzung sowie Hämolyse mit Gerinnungsaktivierung möglich. Auch die exakte Füllung der Citrat-Monovette ist von Bedeutung: Bei Unterfüllung kommt es zu Verdünnung und einer erhöhten Citrat-Konzentration, bei Überfüllung zu einer möglichen Gerinnungsbildung. Beim Transport unterhalb der Raumtemperatur ist ein Verlust von vWF und VIII sowie eine Thrombozyten- und FVII-Aktivierung möglich; hohe Temperaturen sowie eine zu lange Lagerung der Proben kann zum Verlust von Einzelfaktoren führen, betroffen sind hier insbesondere FV und FVIII. Bei fehlerhafter Zentrifugation ist eine Hämolyse möglich. Auch Grunderkrankungen der Patient:innen wie beispielsweise eine Lipidämie können die photometrischen Methoden beeinflussen. Ein hoher Hämatokrit kann zur Reduktion der Gerinnungsfaktoren führen.

Auch Messungenauigkeiten des Labors sind nicht auszuschließen, ebenso Änderungen bei neuen Chargen von Agonisten oder Aktivierungsmarkern. Weiterhin muss von interindividuellen Unterschieden zum Untersuchungszeitpunkt ausgegangen werden, die ein dynamisches Geschehen wie die Hämostase beeinflussen können. Zur Reduzierung von Fehlerquellen wird empfohlen, standardisierte Untersuchungsabläufe einzuführen (81), was in dieser Arbeit bestmöglich umgesetzt wurde.

5.3 Pathologische Erhöhung des ISTH-BAT „bleeding score“ bei Patient:innen mit vermutlich hereditären, nicht-syndromalen Thrombozytopathien mit und ohne vWS Typ 1

Der ISTH-BAT, ein aus 14 Symptomkategorien bestehender Fragebogen, dient der einheitlichen Erfassung der Blutungseigenanamnese der Patient:innen (122). Er wurde

zunächst von Rodeghiero et al. (130) für Patient:innen mit vWS validiert; später wurde seine Eignung auch als gutes diagnostisches Screeninginstrument für Thrombozytopathien von Adler et al. (146) und Gresele et al. (147) bestätigt. Nach Bewertung der einzelnen Kategorien wird ein gesamter „bleeding score“ gebildet, pathologische Werte gelten ab einem Punktwert von >3 für Männer und >5 für Frauen. Hervorzuheben ist besonders seine Differenzierungsfähigkeit zur Allgemeinbevölkerung (147), da auch dort häufig von mindestens einem Blutungssymptom berichtet wird (130). Als signifikant pathologisch gilt der Score, wenn die Blutungssymptome einen störenden Einfluss auf das Sozialleben oder Aktivitäten haben oder Medikamente benötigt werden (122). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Schwere der Blutungssymptome mit einem Risiko für zukünftige Blutungsereignisse korreliert (130, 175). In dieser Arbeit wurde der ISTH-BAT sowohl mit den Patient:innen als auch mit den Kontrollproband:innen durchgeführt. Der Einschluss der Patient:innen in die weiteren Untersuchungen erfolgte unabhängig vom Wert des ermittelten „bleeding score“.

Festgestellt werden konnte in dieser Arbeit, dass Patient:innen mit Thrombozytopathie - mit Ausnahme einer Patient:in mit einem grenzwertigen „bleeding score“ von 5 - einen pathologisch erhöhten ISTH-BAT „bleeding score“ im Vergleich zu den Kontrollproband:innen aufwiesen. Diese klare Differenzierungsfähigkeit zu gesunden Kontrollproband:innen, die auch bei der Validierung des ISTH/SSC BAT für hereditäre Thrombozytopathien von Gresele et al. (147) gezeigt wurde, war in dieser Arbeit ähnlich deutlich feststellbar: Der Mittelwert des „bleeding score“ lag bei den gesunden Kontrollproband:innen normwertig bei 1 (Median: 1, vergleiche Gresele et al.: Median: 0) und pathologisch erhöht bei Patient:innen mit Thrombozytopathie ohne vWS Typ 1 bei 8,80 (Median: 10, vergleiche Gresele et al.: Median: 9) und mit Thrombozytopathie und vWS Typ 1 sehr ähnlich bei 8,75 (Median: 7, nicht untersucht von Gresele et al.). Jedoch wurde auch bei Patient:innen, bei denen keine Thrombozytopathie diagnostiziert wurde, die dennoch aufgrund einer vermehrten Blutungsneigung in der hämostaseologischen Ambulanz vorstellig waren und die weiterhin die Diagnose „hämorrhagische Diathese unklarer Genese“ oder „vWS Typ 1“ haben, im Mittel ein pathologisch erhöhter „bleeding score“ festgestellt. Hier zeigen sich Abweichungen von den Ergebnissen von Gresele et al. (147): Die Patient:innen mit einem vWS Typ 1 ohne Thrombozytopathie zeigten in dieser Arbeit einen Mittelwert des „bleeding score“ von 11,63 (Median: 12,5), bei Gresele et al. lag dieser mit einem medianen „bleeding score“ von 5 deutlich niedriger. Auch die Patient:innen ohne phänotypisch bestätigte Thrombozytopathie und ohne vWS Typ 1 zeigten in dieser Arbeit einen Mittelwert von 8,35 (Median: 8), weshalb die Feststellung von Gresele et al., dass bei einem „bleeding score“ von >6 nach Ausschluss eines vWS Typ 1 mit großer Wahrscheinlichkeit eine Thrombozytopathie vorliegt, in dieser Arbeit nicht bestätigt wurde. Ein möglicher Grund dieser Abweichung könnte die Rekrutierung

der Patient:innen dieser Arbeit aus der hämostaseologischen Ambulanz mit akuten oder stattgehabten Blutungsereignissen sein, beispielsweise auch nach Operationen oder größeren Verletzungen, was eventuell zu einer Beeinflussung des Patient:innenkollektivs in Richtung einer stärkeren Symptomausprägung geführt hat. Eine weitere mögliche Erklärung könnte die Betrachtung einer vergleichsweise kleinen Studienpopulation in einer relativ kurzen Zeitspanne sein; weitere Untersuchungen in größerem Rahmen zur Evaluierung sind wünschenswert. Insgesamt zeigte auch die Arbeit von Gresele et al. eine mäßige Genauigkeit in der Differenzierungsfähigkeit des ISTH-BAT zwischen hereditären Thrombozytopathien und vWS Typ 1 (147).

Symptome der Patient:innen mit Thrombozytopathie waren vor allem Blutungen nach Operationen oder größeren Verletzungen, Menorrhagie und kutaner Hämorrhagie. Die Patient:innen mit vWS Typ 1 zeigten weiterhin vermehrt Blutungen nach Zahnextraktionen, die Patient:innen ohne vWS Typ 1 Epistaxis und Blutungen aus kleinen Wunden. Dies ist ähnlich den Ergebnissen von Gresele et al. (147), bei denen die Patient:innen mit hereditären Thrombozytopathien vor allem Epistaxis, kutane Hämorrhagien und Blutungen in der Mundhöhle und Patient:innen mit vWS Typ 1 vor allem kutane Hämorrhagien, Menorrhagie und Epistaxis zeigten. Zu unterscheiden ist dennoch das geringere Vorkommen von Blutungen nach Operationen oder größeren Verletzungen bei Gresele et al., was die höheren festgestellten „bleeding scores“ in der vorliegenden Arbeit (siehe oben) erklären könnte. Eindeutig anhand der klinischen Manifestation der Blutungssymptome von anderen Patient:innen mit Blutungen unbekannter Ursache zu unterscheiden waren die Patient:innen mit Thrombozytopathien und/oder vWS Typ 1 jedoch nicht, wie ebenso vergleichbare Untersuchungen von Gebhart et al. (15) festgestellt haben.

5.4 Verminderte vWF-Bindung an den thrombozytären Rezeptor GPIIb/IIIa *in vitro* bei Patient:innen mit vWS Typ 1 und Betrachtung des gemeinsamen Vorliegens einer Thrombozytopathie und eines vWS Typ 1

Eine Besonderheit dieser Arbeit war die Betrachtung des gemeinsamen Vorliegens eines vWS Typ 1 und einer Thrombozytopathie, was bei 4 Patient:innen festgestellt wurde. Insgesamt war bei 20 der 54 untersuchten Patient:innen ein vWS Typ 1 in domo oder extern diagnostiziert. Das vWS ist mit einer Prävalenz von 1% die häufigste hereditäre hämorrhagische Diathese im Bereich der primären Hämostase (16) und der Typ 1 der häufigste Typ des vWS (17, 81). Der

Typ 1 zeichnet sich durch eine quantitative, milde bis moderate Verminderung des vWF und des FVIII aus, wobei der vWF strukturell und funktionell normal ausgebildet ist (17). Er wird überwiegend in den "Weibel-Palade-Bodies" in den Endothelzellen gespeichert und nach Stimulation ins Blutplasma sezerniert; darüber hinaus sind etwa 10-15% des vWF in den α -Granula der Thrombozyten gespeichert (80, 176).

Die Funktionen des vWF und der Thrombozyten in der primären Hämostase sind eng verknüpft: über die Bindung an die thrombozytären Rezeptoren GPIb und GPIIb/IIIa trägt der vWF zur Thrombozytenadhäsion an subendotheliale Strukturen bei; ebenso ist er durch die darauffolgende Aktivierung an der Thrombozytenaggregation beteiligt (80, 110, 124). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die basale vWF-Bindung an das GPIb α bei Patient:innen mit und ohne vWS Typ 1 im Vergleich zu den Kontrollproband:innen statistisch auffällig niedriger war, stärker ausgeprägt bei Patient:innen mit vWS Typ 1. Bei den Patient:innen mit vWS Typ 1 lässt sich dies mit der bei dieser Erkrankung vorliegenden verminderten vWF-Konzentration erklären. Dass dies auch auf Patient:innen ohne vWS Typ 1 zutraf, war nicht zu erwarten. Eine mögliche Ursache liegt in der diagnostischen Herausforderung von milden Blutungsneigungen insgesamt und hier insbesondere des milden vWS Typ 1 (17, 120, 124, 128), sodass die Möglichkeit besteht, dass ein mildes vWS Typ 1 vielleicht häufiger bei den untersuchten Patient:innen vorlag als in der Routinediagnostik erfasst wurde. Das milde vWS Typ 1 ist eine Unterform des vWS Typ 1 und durch einen teilweise quantitativen Mangel charakterisiert (111, 112). Gründe für die schwierige Diagnostik sind die schwer abzugrenzenden Unterschiede zwischen „krank“ und „gesund“ (177) mit unterschiedlichen Definitionen von „cut-off“-Werten (125) bei unterschiedlicher Ausprägung von Blutungssymptomen, die oft, wie Sadler et al. feststellten (111, 177), keine Korrelation zwischen der vWF-Konzentration und der Schwere von Blutungen zeigten. Weiterhin kommt hinzu, dass der vWF und auch der FVIII Akute-Phase-Proteine sind, die erheblichen Schwankungen durch entzündliche Prozesse, aber auch Stress, physischer Aktivität, Schwangerschaft etc. unterliegen (80), weshalb bereits ihr Normbereich variabel ist. Eine möglicherweise falsch-niedrige Diagnostizierung des vWS Typ 1 in dieser Arbeit lässt sich jedoch anhand der vorliegenden Daten nicht sicher beurteilen und war nicht Ziel der Untersuchungen. Dagegen spricht, dass sich nach Aktivierung der Thrombozyten in aufsteigenden Konzentrationen mit Ristocetin keine statistischen Auffälligkeiten zwischen den Patient:innen ohne diagnostiziertes vWS Typ 1 und den Kontrollproband:innen mehr zeigten. Bei den Patient:innen mit diagnostiziertem vWS Typ 1 hingegen fand sich auch nach Aktivierung der Thrombozyten mit Ristocetin die statistisch auffällige Erniedrigung der vWF-Bindung an das GPIb α im Vergleich zu den Kontrollproband:innen. Dies entspricht den erwarteten Ergebnissen und lässt sich wiederum mit der bei einem vWS Typ 1 verminderten vWF-Konzentration erklären.

Interessanterweise wurde in dieser Arbeit weiterhin festgestellt, dass bei Patient:innen mit vWS Typ 1 und Thrombozytopathie nicht nur eine verminderte vWF-Bindung sowohl in basalem als auch in aktiviertem Zustand der Thrombozyten erhoben wurde, sondern dass bei diesen Patient:innen auch eine statistisch auffällig verminderte Expression des GPIIb/IIIa vorlag. Dies zeigte sich sonst in keiner der anderen Patient:innengruppen, auch nicht bei Patient:innen, bei denen ein vWS Typ 1 ohne Thrombozytopathie vorlag. Bei der Expression des GPIIb/IIIa war kein Unterschied feststellbar. Überlegungen dazu finden sich in Kapitel 5.5 *Verminderte Anzahl an Rezeptor-ABS der Hauptglykoproteine GPIIb/IIIa und GPIIb/IIIa auf der Thrombozytenoberfläche bei Patient:innen mit Thrombozytopathie und vWS Typ 1.*

Über das gemeinsame Vorliegen eines vWS Typ 1 und einer Thrombozytopathie ist bisher wenig bekannt. In dieser Arbeit wurde das gleichzeitige Vorhandensein beider Erkrankungen bei vier Patient:innen festgestellt, bei drei davon wurde ein vWS Typ 1 und eine δ -SPD und bei einer Patientin ein vWS Typ 1 und eine Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung diagnostiziert. Die Altersspanne dieser Patient:innen lag zwischen 20 und 50 Jahren mit einem Mittelwert von 31,5 Jahren, womit sie im Mittel etwas jünger waren als der Durchschnitt der anderen Patient:innen. Ursächlich war möglicherweise der in der Literatur beschriebene Anstieg der vWF-Konzentration mit dem Älter-werden (128), wobei diese Beobachtung bei den auch untersuchten Patient:innen mit vWS Typ 1 ohne Thrombozytopathie nicht festgestellt werden konnte. Ein Rückgang der Blutungssymptome bzw. des -risikos bei Anstieg des vWF-Spiegels mit zunehmendem Alter konnte bisher jedoch nicht gezeigt werden (114), weshalb die *ASH ISTH NHF WFH* (114) ein Überdenken der Diagnose empfehlen. Die Thrombozytenkonzentrationen der Patient:innen mit vWS Typ 1 und Thrombozytopathie waren normal oder etwas erniedrigt und der ISTH-BAT „bleeding score“ war pathologisch erhöht. Sadler et al. (123) und Laffan et al. (124) haben bei Patient:innen mit vWS Typ 1 überwiegend mukokutane Blutungssymptome festgestellt, was auch in dieser Arbeit vorlag: Es wurde vor allem von Blutungen nach Zahnextraktionen, Menorrhagie und kutanen Hämorrhagien, aber auch von Blutungen nach Operationen oder größeren Verletzungen berichtet (siehe Kapitel 5.3 *Pathologische Erhöhung des ISTH-BAT „bleeding score“ bei Patient:innen mit vermutlich hereditären, nicht-syndromalen Thrombozytopathien mit und ohne vWS Typ 1*). Bei den Patient:innen mit vWS Typ 1 und Thrombozytopathie zeigten sich ähnliche Ergebnisse, interessanterweise waren diese in der Regel oft etwas milder ausgeprägt als bei alleinigem Vorliegen eines vWS Typ 1. Die Mehrheit aller untersuchten Patient:innen mit vWS Typ 1 zeigte eine positive Familienanamnese, wie sie auch oft in der Literatur wie beispielsweise von Sadler et al. (123) beschrieben wurde. Dagegen war das Verhältnis zwischen positiver und negativer Familienanamnese bei den

Patient:innen dieser Arbeit mit einer Thrombozytopathie, unabhängig, ob mit oder ohne vWS Typ 1, etwa ausgewogen.

Die Therapie des vWS ist abhängig von verschiedenen Faktoren wie dem Typ und der Schwere der Erkrankung, aber auch vom Ansprechen auf vorherige Therapien oder der Invasivität eines geplanten Eingriffs (81). Bei dem in dieser Arbeit betrachteten Typ 1 ist die Gabe von Desmopressin, welches die Freisetzung des vWF aus den Endothelzellen fördert, zu erwägen oder bei ausgeprägter Symptomatik oder geplanter Operation ggf. auch die Gabe von vWF/FVIII-Konzentraten. Unterstützend können Tranexamsäure oder lokale Hämostyptika eingesetzt werden (80, 178). Bei vermindertem Ansprechen auf eine vWF/FVIII-Konzentrat-haltige Therapie besteht darüber hinaus die Möglichkeit, mit Thrombozytenkonzentraten zu therapieren. Angenommen wird dabei, dass der hämostatische Effekt durch Freisetzung des in den α -Granula gespeicherten vWF entsteht (80). Aufgrund der Untersuchungen dieser Arbeit, die zeigen, dass das gemeinsame Vorliegen eines vWS Typ 1 und einer Thrombozytopathie vorkommt, ist auch die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, dass der Effekt auch aufgrund des Ersatzes von möglicherweise bisher nicht diagnostizierten Thrombozytenfunktionsstörungen bei einigen dieser Patient:innen kommen könnte. Zur weiteren Evaluierung dessen sind jedoch gezielte Untersuchungen in größerem Rahmen notwendig.

5.5 Verminderte Anzahl an Rezeptor-ABS der Hauptglykoproteine GPIIb und GPVI auf der Thrombozytenoberfläche bei Patient:innen mit Thrombozytopathie und vWS Typ 1

Die integralen Glykoproteine der Lipiddoppelschicht, welche die Thrombozyten umgeben, dienen der Interaktion mit ihrer Umgebung. Die Hauptglykoproteine GPIIb/IIIa (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$), GPIIb α , GPIX (GPIb/V/IX), GPVI, GPIIa (Integrin β_1) und CD36, deren Anzahl an Rezeptor-ABS auf der Thrombozytenoberfläche in dieser Arbeit quantifiziert wurde, orientiert sich an den Erhebungen bzw. Zusammenstellungen von Burkhart et al. (153) und Nergiz-Ünal (154), siehe Tabelle 14. Es werden Adhäsions- sowie Signaltransduktionsrezeptoren unterschieden, wobei seit einigen Jahren deutlich wird, wie Nergiz-Ünal (154) darstellte, dass diese klare Unterscheidung nicht möglich ist, da einige der Rezeptoren beide Funktionen ausüben: Beispielsweise bindet der GPIIb/IIIa-Komplex (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$), welcher mit einer Anzahl an Rezeptor-ABS von ca. 80000-100000 pro Thrombozyt vorkommt (153, 154) die Liganden Fibrinogen und vWF, übermittelt jedoch ebenfalls in aktiviertem Zustand Signale über sog.

„outside-in“-Kaskaden (179, 180). Die Anzahl an Adhäsionsrezeptoren ist im Vergleich zu Rezeptoren, die über lösliche Agonisten stimuliert werden, gewöhnlich deutlich vermehrt exprimiert (154, 181).

In dieser Arbeit fanden sich überwiegend vergleichbare Werte an Rezeptor-ABS der Hauptglykoproteine auf der Thrombozytenoberfläche zwischen Patient:innen mit Thrombozytopathie und Kontrollproband:innen. Ausnahmen davon sind eine statistisch auffällig verminderte Expression des GPIIb/IIIa und des GPVI bei Patient:innen mit Thrombozytopathie und vWS Typ 1, wobei auch hier keine Reduktion um mehr als 50% festzustellen war, also nicht von einer klinisch relevanten Funktionsbeeinträchtigung auszugehen ist (8, 182). Bei Patient:innen mit Thrombozytopathie ohne vWS Typ 1 konnte bei keinem der Hauptglykoproteine eine statistische Auffälligkeit ihrer Anzahl im Vergleich zu den Kontrollproband:innen festgestellt werden. Jedoch exprimierten teilweise auch Patient:innen ohne bestätigte Thrombozytopathien und ohne vWS Typ 1 niedrigere Anzahlen an Rezeptor-ABS; diese Arbeit zeigt dies für das GPVI und CD36 (FA6.152)). Die Abweichungen sind möglicherweise mit regulären Schwankungen der Allgemeinbevölkerung und mit interindividuellen Unterschieden zum Untersuchungszeitpunkt zu erklären, die dynamische Geschehen wie die Hämostase herausfordern. Eine beidseitige Verminderung von GPIIb/IIIa und GPVI bei Patient:innen mit Thrombozytopathie und vWS Typ 1 ist durch ihren engen physischen sowie funktionalen Zusammenhang denkbar.

An das GPIIb/IIIa bindet insbesondere in arteriellen Gefäßen und unter hohem Scherstress der vWF (49). Dieser ist bei Vorliegen eines vWS Typ 1 mild bis moderat vermindert, sodass die in dieser Arbeit gezeigte verminderte Exprimierung des Rezeptors möglicherweise eine gegenseitige Beeinflussung des vWF und des GPIIb/IIIa darstellt. Ob dies tatsächlich ursächlich ist, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen. Eine verminderte Exprimierung des GPIIb/IIIa ist bereits unter bestimmten Umständen beschrieben; beispielsweise zeigten Leytin et al. (183), dass es zu einer Herunterregulierung von GPIIb/IIIa und zur Aktivierung der Thrombozyten unter hohem Scherstress kommt. Weiterhin sind quantitative sowie qualitative Störungen des GPIIb/IIIa beim Bernard-Soulier-Syndrom bekannt, bei dem verschiedene Defekte des GPIIb/IIIa (nicht-kovalente Bindung zwischen GPIIb, GPVI und GPIIb/IIIa) zu Thrombozytopenie, abnormaler Thrombozytengröße, vWF- und Kollagenbindung sowie Thrombusformation führen und dadurch mit vermehrter Blutungsneigung einhergehen (2, 184). Weiterhin sind andere genetische Mutationen des GPIIb/IIIa wie beispielsweise beim „Platelet-type-von-Willebrand-Syndrom“ beschrieben, die jedoch eher mit einer vermehrten als mit einer verminderten Funktion einhergehen (116, 117).

Das Transmembranprotein GPVI ist einer der wichtigsten Kollagenrezeptoren der Thrombozyten, es bindet Kollagen unter hohen Scherkräften nach wiederholtem Kontakt und Quervernetzung der vWF-Multimere am thrombozytärem GPIb; bei niedrigeren Scherkräften ist eine direkte Thrombozytenadhäsion und -aktivierung über GPVI an Kollagen möglich. GPVI ist gekoppelt mit ITAM der benachbarten FcR γ -Kette, welches über nachfolgende Signalkaskaden (185) die Thromboxan-A₂-Synthese, Granulasekretion, Integrin-Aktivierung und prokoagulatorische Aktivität induziert (186). Da jeder dieser Schritte entscheidend für eine normale Funktion der Thrombozyten ist, ist es, wie Matus et al. (187) zusammenfassten, „überraschend, dass sich die Schwere des GPVI-Defekts nicht in einem schwereren klinischen Phänotyp widerspiegelt. Dies unterstreicht die Existenz redundanter Aktivierungswege in Thrombozyten, die das Versagen eines einzelnen Weges kompensieren können“ (187). Beschrieben sind bisher einige erworbene, beispielsweise durch Autoantikörperbildung, sowie hereditäre Defekte des GPVI, die sich klinisch mit einer meist milden Blutungsneigung präsentieren (187-189).

In dieser Arbeit wurde weiterhin die Thrombozytenaktivierung über GPVI mit dem für diesen Rezeptor hochaffinen Agonisten Convulxin (159) getestet. Dabei war festzustellen, dass Patient:innen mit Thrombozytopathie mit und ohne vWS Typ 1 überwiegend keine statistisch auffällige Erniedrigung in der Aktivierung der Thrombozyten zeigten, diese Tendenz dennoch insbesondere bei Aktivierung der Thrombozyten mit niedrigen Convulxin-Konzentrationen teilweise vorhanden war. Ausgenommen davon sind die statistisch auffälligen Erniedrigungen der Patient:innen mit Thrombozytopathie und vWS Typ 1 nach Aktivierung der Thrombozyten bei der CD63- und teilweise LAMP-1-Oberflächen-Expression (siehe Kapitel 5.7 *Verminderung der Anzahl der δ -Granula bzw. der δ -Granula-Exozytose bei Patient:innen mit δ -SPD mit und ohne vWS Typ 1*), wobei dies eher auf die vorliegende δ -SPD und nicht auf die verminderte Anzahl an Rezeptor-ABS des GPVI zurückzuführen ist.

5.6 Verminderte Aktivierung des thrombozytären Rezeptors GPIIb/IIIa *in vitro* bei Patient:innen mit Störung der ADP- oder Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung bzw. mit „Gi-like“ Thrombozytopathie mit und ohne vWS Typ 1

Der thrombozytäre Rezeptor GPIIb/IIIa bindet, nachdem er nach Aktivierung der Thrombozyten eine aktivierende Konformationsänderung mittels „inside-out signaling“ erhalten hat, den vWF sowie lösliches Fibrinogen aus dem Plasma und ermöglicht

die Quervernetzung der Thrombozyten untereinander (25). Liegt ein Defekt des Rezeptors vor, kommt es zu Störungen der Thrombozytenaggregation, wie es beispielsweise bei Erkrankungen wie der Thrombasthenie Morbus Glanzmann-Naegeli vorliegt (4, 86). Bei dieser Erkrankung liegt eine quantitative oder qualitative Störung des Rezeptors vor; Defekte in den Genen *ITGA2B* und *ITGB3* sind bekannt (190). In dieser Arbeit wurde die GPIIb/IIIa-Aktivierung indirekt über die Fibrinogenbindung untersucht; weiterhin wurde die in Kapitel 5.5 *Verminderte Anzahl an Rezeptor-ABS der Hauptglykoproteine GPIIb und GPVI auf der Thrombozytenoberfläche bei Patient:innen mit Thrombozytopathie und vWS Typ 1* beschriebene Quantifizierung der Anzahl der Rezeptor-ABS des GPIIb/IIIa erhoben.

Wie oben beschrieben, zeigten sich in dieser Arbeit keine statistisch auffälligen Unterschiede in der Quantifizierung der Anzahl der Rezeptor-ABS des GPIIb/IIIa zwischen Patient:innen und Kontrollproband:innen. Dies betraf sowohl die Patient:innen mit und ohne vWS Typ 1 wie auch die Patient:innen mit und ohne Thrombozytopathie. Der basale Aktivierungszustand des GPIIb/IIIa war bei den Patient:innen insgesamt im Vergleich zu den Kontrollproband:innen nicht statistisch auffällig niedriger ausgeprägt. Auch nach Agonisten-induzierter Fibrinogenbindung mit den Agonisten ADP, Epinephrin, Convulxin oder Thrombin zeigten sich in dieser Arbeit insgesamt keine Auffälligkeiten, bis auf eine statistisch auffällige Verminderung bei den Patient:innen mit Thrombozytopathie ohne vWS Typ 1 bei Aktivierung mit der Höchstkonzentration von Epinephrin.

Betrachtet man dann aber die Patient:innen mit Thrombozytopathie getrennt nach den diagnostizierten Thrombozytopathien genauer, waren deutliche Unterschiede feststellbar. Diese waren allerdings in dieser Arbeit aufgrund einer kleinen Anzahl betroffener Patient:innen statistisch nicht immer auswertbar. Bei den Patient:innen mit einer Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung bzw. einer „Gi-like“ Thrombozytopathie mit und ohne vWS Typ 1 fielen niedrige basale Fibrinogenbindungen an das GPIIb/IIIa auf; tendenziell lag dies verstärkt bei gleichzeitigem Vorliegen eines vWS Typ 1 vor. ADP bindet *in vivo* an die Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₂ und spielt insbesondere beim Rückkopplungsmechanismus der auto- und parakrinen Verstärkung der Thrombozytenaktivierung eine wichtige Rolle; bei einer „Gi-like“ Thrombozytopathie kann zusätzlich die Aktivierung über den Rezeptor des Agonisten Adrenalin betroffen sein (87). Die Wichtigkeit der ADP-Rezeptoren verdeutlicht der erfolgreiche Einsatz von Inhibitoren des P2Y₁₂-Rezeptors wie Clopidogrel, Prasugrel oder Ticagrelor zur vor allem sekundären Prävention ischämischer Ereignisse ausgelöst durch Thrombozytenaggregate (26, 59, 70). Nach Aktivierung der Thrombozyten mit dem Agonisten ADP kam es bei diesen Patient:innen zu einer induzierbaren Fibrinogenbindung, Maximalwerte wurden jedoch nicht erreicht. Die hier durchgeführten durchflusszytometrischen

Untersuchungen lassen keinen Rückschluss darauf zu, an welcher Stelle der Signalkaskade der Defekt liegt; eine verminderte Fibrinogenbindung durch quantitative Verminderung des GPIIb/IIIa wurde, wie oben beschrieben, ausgeschlossen. Die Fibrinogenbindung durch andere Agonisten war bei den Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung bzw. „Gi-like“ Thrombozytopathie überwiegend normal induzierbar; ausgenommen hiervon war die Fibrinogenbindung bei dem Patienten mit „Gi-like“ Thrombozytopathie bei Aktivierung mit Epinephrin. Weiterhin zeigte sich bei gleichzeitigem Vorliegen eines vWS Typ 1 eine leicht erniedrigte Convulxin-induzierte Fibrinogenbindung, welches einer GPVI-vermittelten Aktivierung *in vivo* durch Kollagen entspricht. Eine ähnlich verminderte Antwort anderer Agonisten, insbesondere des Kollagens, bei dieser Erkrankung stellten auch Dawood et al. (87) in ihren Untersuchungen fest, vor allem bei Aktivierung mit niedrigen und mittleren Konzentrationen. Sie führten dies auf die Beeinträchtigung des Rückkopplungsmechanismus von ADP zurück. Zu beachten ist, dass Dawood et al. zwar ihre Diagnostik mit Hilfe der LTA durchführten, die den in Kapitel 5.2 *Limitierung der Erfassung von vermutlich hereditären, nicht-syndromalen Thrombozytopathien durch die globalen Thrombozytenfunktionstests PFA-100 und LTA nach Born* genannten Einschränkungen unterliegt, dennoch konnten sie ihre Ergebnisse direkt in der Lumi-Aggregometrie vergleichen.

Bei Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung bzw. mit „Gi-like“ Thrombozytopathie ohne vWS Typ 1 (die Gruppe der Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung mit vWS Typ 1 enthielt in dieser Arbeit keine Personen) war ebenfalls eine niedrige basale, jedoch nicht statistisch auffällig erniedrigte Fibrinogenbindung an das GPIIb/IIIa feststellbar. Epinephrin entspricht *in vivo* Adrenalin und wirkt über α_2 -adrenergen Rezeptoren (65). Nach Aktivierung der Thrombozyten mit Epinephrin war eine andere Reaktionskinetik als oben beschrieben zu beobachten: Nach einem minimalen Anstieg der Fibrinogenbindung ließen sich nach Aktivierung mit höheren Konzentrationen Epinephrin nicht nur keine Maximalwerte erreichen, sondern die Fibrinogenbindung war nicht weiter induzierbar. Dies deutet darauf hin, dass es sich hierbei sowohl um einen Rezeptordefekt als auch um eine Störung in der Signalkaskade handeln könnte; auch hier lassen die durchgeführten durchflusszytometrischen Untersuchungen keinen eindeutigen Rückschluss auf die genaue Lokalisation des Defekts zu. Die Fibrinogenbindung durch andere Agonisten war bei diesen Patient:innen normal induzierbar; ausgenommen ist entsprechend oben die ADP-induzierte Fibrinogenbindung bei dem Patienten mit „Gi-like“ Thrombozytopathie.

Fasst man die Patient:innen mit Störung der ADP- oder Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung bzw. mit „Gi-like“ Thrombozytopathie dieser Arbeit zusammen, stellen sie ähnlich den Ergebnissen der Untersuchungen von Dawood et al. (87) gemeinsam mit den δ -SPD den Großteil der Thrombozytopathien dar. Weiterhin häufig stellten Dawood et al. Defekte des Thromboxan A₂-Signalwegs fest, auf die hin in dieser Arbeit nicht untersucht wurde. Die δ -SPD werden im folgenden Kapitel 5.7 *Verminderung der Anzahl der δ -Granula bzw. der δ -Granula-Exozytose bei Patient:innen mit δ -SPD mit und ohne vWS Typ 1* näher thematisiert werden.

5.7 Verminderung der Anzahl der δ -Granula bzw. der δ -Granula-Exozytose bei Patient:innen mit δ -SPD mit und ohne vWS Typ 1

δ -SPD sind seltene Erkrankungen, bei denen es zu einem Mangel der thrombozytären δ -Granula und/oder deren Inhaltsstoffen kommt (quantitativer Defekt) oder bei denen aufgrund einer Störung der Thrombozytenaktivierung oder Signaltransduktion eine gestörte Freisetzung des Granulainhalts vorliegt (qualitativer Defekt) (43, 94). Die Granulainhaltsstoffe wie Serotonin, ADP, ATP, Ca²⁺-Ionen und Pyrophosphat (91) dienen während der Thrombozytenaktivierung als sekundär verstärkende Agonisten (insbesondere Serotonin und ADP) oder sind Teil der Gerinnungskaskade (insbesondere Ca²⁺-Ionen) (136). Bei einem Mangel kommt es zu meist milden bis moderaten Blutungsneigungen, jedoch können auch lebensbedrohliche Komplikationen während Operationen oder Traumata auftreten (35, 136). Syndromale Formen von Defekten der δ -Granula sind beispielsweise das Hermansky-Pudlak-Syndrom und das Chediak-Higashi-Syndrom (190).

In dieser Arbeit wurde das Vorliegen von vermutlich hereditären, nicht-syndromalen δ -SPD mit Hilfe des Membran-Markers CD63 sowie dem Mepacrine-Assay durchflusszytometrisch untersucht. CD63 ist Bestandteil der Membran der δ -Granula und der Lysosomen und gelangt nach Aktivierung der Thrombozyten auf die äußere Thrombozytenoberfläche; er dient somit dem Nachweis der Exozytose dieser beiden (41, 48). Zu beachten ist, wie Dupuis et al. (136) herausstellten, dass bei verminderter Expression nach Aktivierung der Thrombozyten nicht zwischen einem Sekretionsdefekt und einem Mangel der Granula unterschieden werden kann und dass CD63 aufgrund seines Vorkommens auf Lysosomen nicht spezifisch für den Nachweis von δ -SPD ist. Der Mepacrine-Assay hat sich als sinnvolle und kostengünstige Methode zur Diagnostik von δ -SPD erwiesen (155), sollte jedoch aufgrund seiner moderaten Sensibilität und Spezifität ebenfalls nicht alleinig in der Diagnostik eingesetzt werden, wie

Dupuis et al. (136) zusammenfassten. Mepacrine akkumuliert aufgrund seiner hohen Affinität zu Adeninnukleotiden wie ADP in den δ -Granula und lässt so bei Erfassung seiner Aufnahme und anschließenden Freisetzung nach Aktivierung der Thrombozyten auf das Vorliegen von δ -SPD untersuchen (42, 43). In Kliniken werden δ -SPD weiterhin mit Blutaustich, LTA, Lumi-Aggregometrie, Next-Generation-Sequencing und Gen-Analysen (191) diagnostiziert. Dabei sind jedoch nur einige Gene bekannt (95, 136), die mit nicht-syndromalen Thrombozytendefekten assoziiert sind. Zudem ist der Nachweis von isolierten δ -SPD mit einem Blutaustich nicht möglich (35), was die Diagnostik weiterhin erschwert. In der LTA wird bei einer δ -SPD eine Beeinträchtigung der Antwort von ADP und Epinephrin sowie von Kollagen auf moderate Konzentrationen erwartet, die jedoch nicht immer vorhanden bzw. sichtbar ist (10), wie auch die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen (siehe Kapitel 5.2 *Limitierung der Erfassung von vermutlich hereditären, nicht-syndromalen Thrombozytopathien durch die globalen Thrombozytenfunktionstests PFA-100 und LTA nach Born*). Daher wurde für die Diagnostik dieser Arbeit eine Kombination der CD63-Oberflächen-Expression und des Mepacrine-Assays durchgeführt. Zur eindeutigen Diagnostik eines Mangels an δ -Granula dient außerdem die Elektronenmikroskopie „whole mount“, mit der die δ -Granula spezifisch identifiziert und quantifiziert werden können (136, 137). Diese wurde jedoch in dieser Arbeit nicht angewandt, was eine Einschränkung dieser Arbeit darstellt. Dennoch konnten mit der Kombination aus CD63-Oberflächen-Expression und Mepacrine-Assay bei fünf Patient:innen eine vermutlich hereditäre, nicht-syndromale δ -SPD festgestellt werden, bei drei der Patient:innen war zusätzlich ein vWS Typ 1 diagnostiziert.

Betrachtet man die basale Oberflächen-Expression von CD63 ohne Zugabe von Agonisten bei den untersuchten Patient:innen dieser Arbeit im Vergleich zu den Kontrollproband:innen, zeigen sich erwartungsgemäß keine statistisch auffälligen Unterschiede. Grund dafür ist die Lokalisierung von CD63 in der Granulamembran der δ -Granula und Lysosomen, welches erst nach Aktivierung der Thrombozyten und Granulasekretion durch Membranfusion auf die äußere Thrombozytenmembran gelangt (41) und dort über spezifische Antikörper nachweisbar wird. Nach Aktivierung der Thrombozyten mit Convulxin oder Thrombin in aufsteigenden Konzentrationen zeigte sich bei den Patient:innen und Kontrollproband:innen durch die deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität die vermehrte Oberflächen-Expression von CD63. Bei den Patient:innen mit δ -SPD stellte sich jedoch eine weniger starke Zunahme der CD63-Oberflächen-Expression dar, statistisch auffällig bei Aktivierung mit den jeweiligen Höchstkonzentrationen von Convulxin (20 ng/ml) und Thrombin (0,2 U/ml) bei den Patient:innen mit zusätzlichem vWS Typ 1. Auch bei niedrigeren Konzentrationen war eine weniger starke Zunahme der CD63-Expression vorhanden, jedoch nicht statistisch auffällig. Diese verminderte, aber vorhandene Zunahme der CD63-Oberflächen-Expression deutet

darauf hin, dass es sich bei den vorliegenden δ -SPD eher um einen Mangel der thrombozytären δ -Granula und/oder deren Inhaltsstoffen als um eine Störung der Thrombozytenaktivierung oder Signaltransduktion handelte, also eher ein quantitativer als ein qualitativer Defekt vorlag. Zur genaueren Betrachtung von qualitativen Defekten sind weitere Untersuchungen wie ein Serotonin-ELISA zur Bestimmung des thrombozytären Serotonin-Gehalts oder massenspektrometrische Untersuchungen notwendig. Ein Serotonin-ELISA wurde bei vier der fünf Patient:innen durchgeführt; die Ergebnisse unterstützten die Hinweise auf eine quantitative δ -SPD, sind jedoch nicht Teil der Untersuchungen dieser Arbeit gewesen und werden daher in diesem Rahmen nicht weiter diskutiert.

Betrachtet man die basale Aufnahme des fluoreszierenden Mepacrines in die δ -Granula, fällt ein deutlicher Unterschied zwischen den Patient:innen mit δ -SPD und den Kontrollproband:innen auf: Die Aufnahme des Mepacrines in die δ -Granula der Patient:innen war auffällig vermindert. Auch dies spricht wie oben dafür, dass es sich eher um einen Mangel der δ -Granula und/oder deren Inhaltsstoffen handelte, also um einen quantitativen Defekt. Diese Verminderung war bei Patient:innen mit δ -SPD und vWS Typ 1 signifikant nachzuweisen; bei Patient:innen ohne vWS Typ 1 war aufgrund einer zu geringen Fallzahl keine Beurteilung der Signifikanz möglich. Tendenziell war diese verminderte Aufnahme jedoch ebenfalls nachweisbar, aber weniger stark ausgeprägt. Der Mittelwert des Mepacrine-Fluoreszenzsignals lag mit 48,78 und einer Standardabweichung $\pm 5,728$ bei den Kontrollproband:innen ähnlich vergleichbaren Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Jurk des CTH der Universitätsmedizin Mainz (Mittelwert 52,5 mit Standardabweichung ± 12), die angenommenen Basalwerte von Patient:innen mit $< 40,4$ sogar deutlich niedriger: Bei den Patient:innen mit δ -SPD ohne vWS Typ 1 lag der Mittelwert bei 33,50 mit einer Standardabweichung $\pm 2,12$ und bei den Patient:innen mit δ -SPD und vWS Typ 1 bei 24,00 mit einer Standardabweichung $\pm 7,21$. Nach Aktivierung der Thrombozyten mit aufsteigenden Konzentrationen von Convulxin oder Thrombin ließ sich bei den Kontrollproband:innen die erwartete Freisetzung der Inhaltsstoffe der Granula durch Abnahme der Fluoreszenzintensität von Mepacrine beobachten. Bei den Patient:innen mit δ -SPD war hingegen nur eine geringe Abnahme der Mepacrine-Floureszenzintensität feststellbar, was die geringe Freisetzung der δ -Granula widerspiegelt. Bei Aktivierung der Thrombozyten mit den Höchstkonzentrationen von Convulxin (20 ng/ml) oder Thrombin (0,2 U/ml) ließ sich kaum noch ein Unterschied zwischen den Patient:innen mit δ -SPD und den Kontrollproband:innen feststellen, da die Freisetzung von Mepacrine durch die Kontrollproband:innen auf etwa den Ausgangszustand der Mepacrine-Aufnahme der Patient:innen mit δ -SPD gesunken war. Deutlicher war der Unterschied wieder bei Patient:innen mit δ -SPD und vWS Typ 1 ausgeprägt.

In Zusammenschau beider Untersuchungen mit verminderter Aufnahme und Freisetzung von Mepacrine und verminderter, aber steigender CD63-Oberflächen-Expression ist bei den untersuchten Patient:innen also von einer quantitativen δ -SPD auszugehen, die sich ausgeprägter bei Patient:innen mit zusätzlichem vWS Typ 1 darstellte. Die Kombination der beiden Tests wurde auch von Cai et al. (43) untersucht und empfohlen; die Vorteile beschrieben sie in der raschen Identifikation von Erkrankungen wie der δ -SPD, der Verwendung nur geringer Blutmengen und dem möglichen Einsatz auch bei Thrombozytopenien im Gegensatz zur sonst empfohlenen Lumi-Aggregometrie.

5.8 Vergleichbare oder tendenziell leicht verminderte α -Granula-Exozytose bei Patient:innen mit Thrombozytopathie mit und ohne vWS Typ 1

Mit Hilfe des Membran-Markers CD62P (P-Selektin), der als Adhäsionsmolekül die Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten vermittelt (157) und der in der Membran der α -Granula nachweisbar ist, ist eine mögliche α -SPD unterstützend diagnostizierbar. Zur eindeutigen Diagnostik quantitativer α -SPD wird die Transmissionselektronenmikroskopie empfohlen (192-194), die in dieser Arbeit jedoch keine Anwendung fand. Entsprechend der δ -SPD kann es sich um einen Mangel der Granula und/oder deren Inhaltsstoffen oder um eine gestörte Freisetzung des Granulainhalts handeln. Als ursächlich sind bereits einige Genmutationen wie beispielsweise in *NBEAL-2* (für den Vesikeltransport) (92), *GFI1B* oder *GATA1* (Transkriptionsfaktorgene) (93) beschrieben. α -Granula enthalten eine Vielzahl an Proteinen, darunter Adhäsionsproteine wie Fibrinogen, vWF und TSP-1, Gerinnungsfaktoren wie FV und FVIII, Plasmaproteine, mitogene Wachstumsfaktoren, Proteaseinhibitoren etc. (38). Damit enthalten sie gleichzeitig Proteine zur Förderung und Inhibition der Hämostase und leisten einen entscheidenden regulatorischen Beitrag; Störungen können in einer vermehrten Blutungsneigung resultieren (35). Weiterhin spielen α -Granula eine wichtige Rolle bei entzündlichen Prozessen, Wundheilung, Angiogenese und Arterioskleroseentstehung (35, 38), auf die jedoch in dieser Arbeit nicht näher eingegangen wird. Bei der Diagnostik von α -SPD mit Hilfe von CD62P ist zu beachten, dass ein „Shedding“ von der Thrombozytenoberfläche während der Thrombozytenaktivierung möglich ist (195, 196).

In dieser Arbeit wurde bei keiner der Patient:innen eine α -SPD festgestellt. Verwunderlich ist dies nicht, da auch in der Literatur ein seltenes Vorkommen dieser Erkrankung beschrieben

wird: Beispielsweise berichteten Gresele et al. (14) in nur 3,7% der untersuchten Thrombozytopathien von einer α -SPD. Nichtsdestotrotz zeigte sich bei einigen Patient:innen dieser Arbeit eine Erniedrigungen in der CD62P-Oberflächen-Expression im Vergleich zu den Kontrollproband:innen, dies betraf statistisch auffällig in basalem Zustand sowie nach Aktivierung mit Thrombin Patient:innen ohne diagnostizierte Thrombozytopathie mit und ohne vWS Typ 1. Bei Patient:innen mit Thrombozytopathie mit und ohne vWS Typ 1 ist die CD62P-Oberflächen-Expression vergleichbar oder tendenziell leicht vermindert, jedoch nicht statistisch auffällig. Dass sich diese verminderte CD62P-Oberflächen-Expression aber *in vivo* nicht als eine α -SPD präsentieren muss, wurde beispielhaft an einem Patienten mit δ -SPD und vWS Typ 1 (Patient 6) dargestellt: Bei diesem Patienten wurde zunächst eine verminderte CD62P-Oberflächen-Expression bei Aktivierung der Thrombozyten in aufsteigenden Konzentrationen mit Convulxin bzw. Thrombin festgestellt, woraufhin zusätzlich die Aktivierung mit 0,375 μ M ADP erfolgte. Diese zeigte, dass eine normale Exozytose der α -Granula durch Convulxin bzw. Thrombin mit der notwendigen ADP-vermittelten Verstärkungsaktivierung möglich war; der zunächst angenommene α -Granula-Defekt also eher durch die verminderte ADP-Freisetzung aus den δ -Granula bei vorliegender δ -SPD als durch einen tatsächlichen Defekt der α -Granula hervorgerufen wurde. Dieses Beispiel unterstreicht auch die Bedeutung der Einordnung von laboranalytischen Messwerten bei der Bewertung der klinischen Relevanz.

Auch die noch seltener vorkommende $\alpha\delta$ -SPD (14), bei der es sowohl zu einer Verminderung der α - als auch der δ -Granula kommt und bei der White et al. (96) eine Verbindung zum offenen kanalikulären System annehmen, an welches der Granulainhalt ohne vorherige Aktivierung der Thrombozyten abgegeben wird, wurde in dieser Arbeit nicht festgestellt. Kombinierte $\alpha\delta$ -SPD wurden weiterhin im Zusammenhang mit hereditären Störungen bestimmter Transkriptionsfaktoren beobachtet, wie beispielsweise Ferreira et al. (197) bei einer Mutation in *GFI1B* und Jurk et al. (195) bei einer Familie mit neuer *GATA1*-Variante beschrieben.

5.9 Teilweise verminderte lysosomale Exozytose bei Patient:innen mit Thrombozytopathie mit und ohne vWS Typ 1

Die lysosomale Exozytose wurde in dieser Arbeit anhand des Membran-Markers LAMP-1, dessen physiologische Funktion bisher unbekannt ist (46), untersucht. Weiterhin findet sich in der lysosomalen Membran der auch in der Membran der δ -Granula lokalisierte Marker CD63 (48), weshalb in der Regel die gleichen Tendenzen von LAMP-1 und CD63 zu erwarten sind.

Lysosomen enthalten saure Glykohydrolasen, Kathepsine und Heparinasen, die am Abbau der extrazellulären Matrix und der zellulären Migration beteiligt sind (35).

In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass bereits die basale LAMP-1-Oberflächen-Expression im Vergleich zu den Kontrollproband:innen sowohl bei den Patient:innen ohne Thrombozytopathie und ohne vWS Typ 1 als auch bei Patient:innen mit Thrombozytopathie und vWS Typ 1 statistisch auffällig erniedrigt waren. Eine Ursache dafür ist unklar, da LAMP-1 nach bisherigen Untersuchungen wie von Febbraio et al. (46) erst nach Aktivierung der Thrombozyten auf die äußere Membran transloziert wird. Bei der basalen CD63-Oberflächen-Expression waren, wie zu erwarten, keine Unterschiede nachweisbar. Nach Aktivierung mit aufsteigenden Konzentrationen von Convulxin war sowohl bei den Patient:innen ohne Thrombozytopathie mit und ohne vWS Typ 1 als auch bei den Patient:innen mit Thrombozytopathie und vWS Typ 1 eine vermehrte, aber im Vergleich zu den Kontrollproband:innen statistisch auffällig verminderte Expression sowohl von LAMP-1 sowie in ähnlicher Weise von CD63 festzustellen. Diese zeigte sich teilweise früher bei niedrigen Konzentrationen von Convulxin in der CD63-Oberflächen-Expression, was durch eine Überlagerung von Erkrankungen der δ -Granula wie der δ -SPD zu erklären ist. Nach Aktivierung mit Thrombin zeigte sich ein ähnliches Bild, hier waren neben den Patient:innen ohne Thrombozytopathie mit und ohne vWS Typ 1 auch Patient:innen mit Thrombozytopathie ohne vWS Typ 1 betroffen.

Die genaue Funktion von LAMP-1 ist, wie oben erwähnt, noch unklar, Febbraio et al. (46) beschrieben Eigenschaften eines adhäsiven Moleküls und diskutierten den Beitrag zur Bildung prothrombotischer Oberflächen. Welche Rolle es im Rahmen lysosomaler Störungen und hämorrhagischer Diathesen spielt, wird zukünftig Gegenstand weiterer Untersuchungen bleiben. Auch der vermehrte Einsatz neuer genomischer Techniken wie das „whole exome sequencing“ in der Diagnostik genetischer Ursachen hereditärer Thrombozytopathien (198, 199), die in dieser Arbeit keine Anwendung fanden, wird zukünftig einen entscheidenden Beitrag leisten.

6 Zusammenfassung

In dieser Dissertation wurden Patient:innen der hämostaseologischen Ambulanz des CTH und der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz mit hämorrhagischer Diathese unklarer Genese und mit vWS Typ 1 mit durchflusszytometrischen Methoden auf vermutlich hereditäre, nicht-syndromale Thrombozytopathien hin phänotypisch untersucht, bei denen nach standardisierter Abklärung mittels anamnestischer sowie laboranalytischer Methoden inklusive der globalen Thrombozytenfunktionstests PFA-100 und LTA nach Born in PRP keine eindeutige Ursache ihrer vermehrten Blutungsneigung gefunden wurde. Ziel der Untersuchungen war es, zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie der Erkrankungen sowie ihrer Diagnostik und Bedeutung im klinischen Alltag beizutragen. Bei 9 von 54 untersuchten Patient:innen konnte im Vergleich zu 18 gesunden Kontrollproband:innen eine vermutlich hereditäre, nicht-syndromale Thrombozytopathie bestätigt werden, bei 4 dieser 9 Patient:innen wurde das gemeinsame Vorliegen einer Thrombozytopathie und eines vWS Typ 1 festgestellt. Diagnostizierte Thrombozytopathien dieser Arbeit waren fünf Patient:innen mit einer δ -SPD, eine mit einer Störung der ADP- und zwei mit einer Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung sowie ein Patient mit einer „Gi-like“ Thrombozytopathie. Neben der Erhebung und Auswertung des ISTH-BAT „bleeding score“ sowie des PFA-100 und der LTA nach Born in PRP wurde die Anzahl der Rezeptor-Antigenbindungsstellen (ABS) der Hauptglykoproteine auf der Thrombozytenoberfläche, die Bindungsfähigkeit des vWF an den Rezeptor GPIIb α , die Aktivität des GPIIb/IIIa durch Fibrinogenbindung und die Exozytose der α -Granula, δ -Granula und Lysosomen untersucht.

Diese Arbeit unterstützt die bereits in vergleichbaren Studien festgestellte, unterschätzte Prävalenz von milden Thrombozytenfunktionsstörungen bei Patient:innen mit hämorrhagischer Diathese unklarer Genese; sie lag nach Ausschluss anderer Ursachen hämorrhagischer Diathesen mit Ausnahme des vWS Typ 1 in einem Zeitraum von 3 Monaten bei 13,5%. Weiterhin bestätigt diese Arbeit, dass die standardisierten globalen Thrombozytenfunktionstests PFA-100 Kollagen/ADP und Kollagen/Epinephrin sowie die LTA nach Born in PRP mit hohen Konzentrationen der Agonisten ADP, Epinephrin, Arachidonsäure, Kollagen und Ristocetin die milden Thrombozytopathien nicht zuverlässig detektieren, sodass bei anamnestischer Blutungsneigung auch bei Normwerten eine Thrombozytopathie nicht sicher ausgeschlossen werden kann. Die LTA sollte daher nicht alleinig in der Diagnostik und der PFA-100 nicht mehr für die spezifische Diagnostik von milden bis moderaten, hereditären, nicht-syndromalen Thrombozytopathien verwendet werden.

Der ISTH-BAT zeigte in dieser Arbeit eine überwiegend deutliche Differenzierungsfähigkeit zwischen Kontrollproband:innen und Patient:innen mit Thrombozytopathie sowohl mit als auch ohne vWS Typ 1; die Mittelwerte des „bleeding score“ lagen jeweils bei etwa 9, bei den Kontrollproband:innen bei 1. Eine klare Differenzierungsfähigkeit zwischen Thrombozytopathien und vWS Typ 1 des ISTH-BAT war jedoch nicht festzustellen; eine eindeutige Unterscheidung anhand der klinischen Manifestation der Blutungssymptome war nicht möglich. Im Vergleich zu anderen Untersuchungen wiesen die Patient:innen dieser Arbeit häufiger Blutungen nach Operationen oder größeren Verletzungen auf.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sowohl die basale als auch die Ristocetin-induzierte vWF-Bindung an das GPIIb α bei Patient:innen mit vWS Typ 1 im Vergleich zu den Kontrollproband:innen statistisch auffällig niedriger war; die basale vWF-Bindung war zudem bei Patient:innen ohne vWS Typ 1 erniedrigt. Weiterhin wurde festgestellt, dass bei gleichzeitigem Vorliegen eines vWS Typ 1 und einer Thrombozytopathie eine statistisch auffällig verminderte Expression der Rezeptor-ABS der Hauptglykoproteine GPIIb α , an welches der vWF bindet, und dem Kollagenrezeptor GPVI vorlag.

Die GPIIb/IIIa-Aktivierung wurde in dieser Arbeit indirekt über die Fibrinogenbindung untersucht. Bei Patient:innen mit Störung der ADP- oder Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung sowie mit „Gi-like“ Thrombozytopathie fielen tendenziell niedrige basale Fibrinogenbindungen an das GPIIb/IIIa auf. Nach Aktivierung mit ADP zeigte sich bei den Patient:innen mit Störung der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung sowie mit „Gi-like“ Thrombozytopathie eine induzierbare Fibrinogenbindung, Maximalwerte wurden jedoch nicht erreicht. Bei Patient:innen mit Störung der Epinephrin-vermittelten Thrombozytenaktivierung sowie mit „Gi-like“ Thrombozytopathie hingegen war nach Aktivierung mit Epinephrin nach einem minimalen Anstieg der Fibrinogenbindung keine weitere Induktion feststellbar, weshalb es sich um einen Rezeptordefekt oder um eine Störung in der Signalkaskade handeln könnte und nicht wie oben eher um eine Störung in der Signalkaskade.

Weiterhin wurde die δ -Granula-Exozytose der Patient:innen mit Hilfe der Kombination aus der Erfassung der Oberflächen-Expression des Membranmarkers CD63 und des Mepacrine-Assays untersucht. Bei Patient:innen mit δ -SPD zeigte sich nach Aktivierung mit den Agonisten Convulxin und Thrombin in aufsteigenden Konzentrationen eine vermehrte, jedoch im Vergleich zu den Kontrollproband:innen verminderte CD63-Oberflächen-Expression. Die verminderte Mepacrine-Aufnahme in und -freisetzung aus den δ -Granula deutet auf das Vorliegen von quantitativen δ -SPD der Patient:innen hin. Ein Defekt der α -Granula wurde in

dieser Arbeit bei keiner der Patient:innen festgestellt; beispielhaft konnte an einem Patienten mit δ -SPD gezeigt werden, dass ein laboranalytisch zunächst angenommener Defekt der α -Granula bei zusätzlicher Gabe von ADP, welches bei Vorliegen einer δ -SPD vermindert aus den δ -Granula freigesetzt werden kann, nicht mehr nachweisbar war. Eine isolierte lysosomale Störung der Thrombozyten konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden, dennoch zeigten sich teilweise Erniedrigungen in der LAMP-1-Oberflächen-Expression, die jedoch auch mit der Überlagerung von Erkrankungen der δ -Granula zu erklären wären.

Zusammen mit vergleichbaren Untersuchungen und Folgestudien mit größeren Patient:innenzahlen tragen die Ergebnisse dieser Arbeit zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie hereditärer, nicht-syndromaler Thrombozytopathien sowie ihrer Diagnostik und Bedeutung im klinischen Alltag bei. Diese Arbeit bestätigt die Wichtigkeit und den Bedarf an einheitlichen, standardisierten und internationalen Leitlinien in der Diagnostik von hereditären Thrombozytopathien, wie sie auch Gresele et al. fordern (14). Die differenzierten Analysen der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der komplexen Funktionen und Dysfunktionen der Thrombozyten im Rahmen hämorrhagischer Diathesen sind die Grundlage dafür, zukünftig adäquate Therapiemöglichkeiten für betroffene Patient:innen entwickeln zu können.

7 Literaturverzeichnis

1. Heremans J, Freson K. High-throughput sequencing for diagnosing platelet disorders: lessons learned from exploring the causes of bleeding disorders. *Int J Lab Hematol.* 2018;40 Suppl 1:89-96.
2. Cattaneo M. Inherited platelet-based bleeding disorders. *J Thromb Haemost.* 2003;1(7):1628-36.
3. Nurden AT, Nurden P. Congenital platelet disorders and understanding of platelet function. *Br J Haematol.* 2014;165(2):165-78.
4. Jurk K, Kehrel B. Inherited and acquired disorders of platelet function. *Transfus Med Hemother.* 2007;34:6-19.
5. George JN, Shattil SJ. The clinical importance of acquired abnormalities of platelet function. *N Engl J Med.* 1991;324(1):27-39.
6. Golebiewska EM, Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev.* 2015;29(3):153-62.
7. Nurden AT, Nurden P. Inherited disorders of platelet function: selected updates. *J Thromb Haemost.* 2015;13 Suppl 1:S2-9.
8. Sandrock-Lang K, Wentzell R, Santoso S, Zieger B. Inherited platelet disorders. *Hamostaseologie.* 2016;36(3):178-86.
9. Gresele P, Falcinelli E, Bury L. Laboratory diagnosis of clinically relevant platelet function disorders. *Int J Lab Hematol.* 2018;40 Suppl 1:34-45.
10. Gresele P. Diagnosis of inherited platelet function disorders: guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2015;13(2):314-22.
11. Podda G, Femia EA, Pugliano M, Cattaneo M. Congenital defects of platelet function. *Platelets.* 2012;23(7):552-63.
12. Mezzano D, Quiroga T. Diagnostic challenges of inherited mild bleeding disorders: a bait for poorly explored clinical and basic research. *J Thromb Haemost.* 2019;17(2):257-70.
13. Jurk K. Analysis of platelet function and dysfunction. *Hamostaseologie.* 2015;35(1):60-72.
14. Gresele P, Harrison P, Bury L, Falcinelli E, Gachet C, Hayward CP, et al. Diagnosis of suspected inherited platelet function disorders: results of a worldwide survey. *J Thromb Haemost.* 2014;12(9):1562-9.
15. Gebhart J, Hofer S, Panzer S, Quehenberger P, Sunder-Plassmann R, Hoermann G, et al. High proportion of patients with bleeding of unknown cause in persons with a mild-to-moderate bleeding tendency: Results from the Vienna Bleeding Biobank (VIBB). *Haemophilia.* 2018;24(3):405-13.
16. Rodeghiero F, Castaman G, Dini E. Epidemiological investigation of the prevalence of von Willebrand's disease. *Blood.* 1987;69(2):454-9.
17. Lavin M, Aguila S, Schneppenheim S, Dalton N, Jones KL, O'Sullivan JM, et al. Novel insights into the clinical phenotype and pathophysiology underlying low VWF levels. *Blood.* 2017;130(21):2344-53.
18. Schindler E. Pschyrembel Online: Hämostase: Schäffer, A.; 2014 [updated 04.2016; cited 08.2019. Available from: <https://www.pschyrembel.de/haemostase/K09BT/doc/>.
19. Versteeg HH, Heemskerk JW, Levi M, Reitsma PH. New fundamentals in hemostasis. *Physiol Rev.* 2013;93(1):327-58.
20. Spannagl M, Harenberg J. Hämostaseologie. In: *Innere Medizin - Duale Reihe.* 4. ed. Stuttgart: Thieme; 2018. p. 1291-324.
21. Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make the perfect clot? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(1):41-8.
22. Jurk K, Kehrel BE. Platelets and the new comprehension of haemostasis. *Hamostaseologie.* 2005;25(1):39-49.

23. Brewer DB. Max Schultze (1865), G. Bizzozero (1882) and the discovery of the platelet. *Br J Haematol.* 2006;133(3):251-8.
24. de Gaetano G. Historical overview of the role of platelets in hemostasis and thrombosis. *Haematologica.* 2001;86(4):349-56.
25. Jurk K, Kehrel BE. Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost.* 2005;31(4):381-92.
26. Jurk K, Kehrel BE. Pathophysiology and biochemistry of platelets. *Internist (Berl).* 2010;51(9):1086, 8-92, 94.
27. Kaushansky K. The molecular mechanisms that control thrombopoiesis. *J Clin Invest.* 2005;115(12):3339-47.
28. Bluteau D, Lordier L, Di Stefano A, Chang Y, Raslova H, Debili N, et al. Regulation of megakaryocyte maturation and platelet formation. *J Thromb Haemost.* 2009;7 Suppl 1:227-34.
29. Matzdorff A, Duckert M, Fritze D. Hämatologie. In: *Innere Medizin- Duale Reihe.* 4. ed. Stuttgart: Thieme; 2018. p. 1151-287.
30. Page CP. The involvement of platelets in non-thrombotic processes. *Trends Pharmacol Sci.* 1988;9(2):66-71.
31. Rowley JW, Weyrich AS. Ribosomes in platelets protect the messenger. *Blood.* 2017;129(17):2343-5.
32. Hallbach J. Hämatologie und Blutgruppenserologie, Blutgerinnung und Fibrinolyse. In: Hallbach J, editor. *Klinische Chemie und Hämatologie.* 3. ed. Stuttgart: Thieme; 2011. p. 398-483.
33. Scharf RE, Nawroth PP. Normales hämatopoetisches System: Thrombozytäres System, Plasmatisches Gerinnungssystem und Fibrinolyse. In: Ostendorf PC, Seeber S, editors. *Hämatologie, Onkologie.* München: Urban & Schwarzenberg; 1997. p. 49-74.
34. Holmsen H, Weiss HJ. Secretory storage pools in platelets. *Annu Rev Med.* 1979;30:119-34.
35. Jurk K. Platelet granules - secretory and secretive. *Hamostaseologie.* 2017;37(3):208-10.
36. Chen Y, Yuan Y, Li W. Sorting machineries: how platelet-dense granules differ from alpha-granules. *Biosci Rep.* 2018;38(5).
37. McNicol A, Israels SJ. Platelet dense granules: structure, function and implications for haemostasis. *Thromb Res.* 1999;95(1):1-18.
38. Harrison P, Cramer EM. Platelet alpha-granules. *Blood Rev.* 1993;7(1):52-62.
39. White JG. The dense bodies of human platelets. Origin of serotonin storage particles from platelet granules. *Am J Pathol.* 1968;53(5):791-808.
40. Youssefian T, Masse JM, Rendu F, Guichard J, Cramer EM. Platelet and megakaryocyte dense granules contain glycoproteins Ib and IIb-IIIa. *Blood.* 1997;89(11):4047-57.
41. Israels SJ, Gerrard JM, Jacques YV, McNicol A, Cham B, Nishibori M, et al. Platelet dense granule membranes contain both granulophysin and P-selectin (GMP-140). *Blood.* 1992;80(1):143-52.
42. Streif W, Knöfler R. Diagnose von Thrombozytenfunktionsstörungen-Thrombozytopathien. Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH e.V): AMWF online. Das Portal der wissenschaftlichen Medizin; 2012 [updated 2018; cited 08.2019. Leitlinie-Thrombozytopathien; Version 2.1, AWMF-Registrier Nr. 086-003, Klasse: S2K:[Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/086-003l_S2k_Diagnostik_Thrombozytenfunktionsstoerungen_Thrombozytopathien_2018-09.pdf].
43. Cai H, Mullier F, Frotscher B, Briquel ME, Toussaint M, Massin F, et al. Usefulness of Flow Cytometric Mepacrine Uptake/Release Combined with CD63 Assay in Diagnosis of Patients with Suspected Platelet Dense Granule Disorder. *Semin Thromb Hemost.* 2016;42(3):282-91.

44. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*. 2001;12(5):261-73.
45. King SM, Reed GL. Development of platelet secretory granules. *Semin Cell Dev Biol*. 2002;13(4):293-302.
46. Febbraio M, Silverstein RL. Identification and characterization of LAMP-1 as an activation-dependent platelet surface glycoprotein. *J Biol Chem*. 1990;265(30):18531-7.
47. Silverstein RL, Febbraio M. Identification of lysosome-associated membrane protein-2 as an activation-dependent platelet surface glycoprotein. *Blood*. 1992;80(6):1470-5.
48. Metzelaar MJ, Nieuwenhuis HK. Identity of Pltgp40 and lysosomal integral membrane protein-CD63. *Blood*. 1991;78(2):534-5.
49. Ruggeri ZM. The role of von Willebrand factor in thrombus formation. *Thromb Res*. 2007;120 Suppl 1:S5-9.
50. Jurk K, Clemetson KJ, de Groot PG, Brodde MF, Steiner M, Savion N, et al. Thrombospondin-1 mediates platelet adhesion at high shear via glycoprotein Ib (GPIb): an alternative/backup mechanism to von Willebrand factor. *Faseb j*. 2003;17(11):1490-2.
51. Kehrel B, Wierwille S, Clemetson KJ, Anders O, Steiner M, Knight CG, et al. Glycoprotein VI is a major collagen receptor for platelet activation: it recognizes the platelet-activating quaternary structure of collagen, whereas CD36, glycoprotein IIb/IIIa, and von Willebrand factor do not. *Blood*. 1998;91(2):491-9.
52. Swieringa F, Kuijpers MJ, Heemskerk JW, van der Meijden PE. Targeting platelet receptor function in thrombus formation: the risk of bleeding. *Blood Rev*. 2014;28(1):9-21.
53. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res*. 2006;99(12):1293-304.
54. Deutzmann R. Zelluläre Kommunikation: Mechanismen der Signaltransduktion. In: Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R, editors. *Biochemie- Duale Reihe*. 4. ed. Stuttgart: Thieme; 2016. p. 560-81.
55. Clemetson KJ, Clemetson JM. Platelet receptor signalling. *Hematol J*. 2004;5 Suppl 3:S159-63.
56. Jackson SP, Nesbitt WS, Kulkarni S. Signaling events underlying thrombus formation. *J Thromb Haemost*. 2003;1(7):1602-12.
57. Netzker R. Zellzyklus und molekulare Genetik: Nukleotide. In: Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R, editors. *Biochemie- Duale Reihe*. 4. ed. Stuttgart: Thieme; 2016. p. 419-35.
58. Jin J, Kunapuli SP. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(14):8070-4.
59. Cattaneo M. The platelet P2Y12 receptor for adenosine diphosphate: congenital and drug-induced defects. *Blood*. 2011;117(7):2102-12.
60. Murugappa S, Kunapuli SP. The role of ADP receptors in platelet function. *Front Biosci*. 2006;11:1977-86.
61. Dorsam RT, Kunapuli SP. Central role of the P2Y12 receptor in platelet activation. *J Clin Invest*. 2004;113(3):340-5.
62. Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Islam N, Alyonycheva TN, Safier LB, et al. The endothelial cell ecto-ADPase responsible for inhibition of platelet function is CD39. *J Clin Invest*. 1997;99(6):1351-60.
63. Deutzmann R. Zelluläre Kommunikation: Hormone. In: Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R, editors. *Biochemie- Duale Reihe*. 4. ed. Stuttgart: Thieme; 2016. p. 582-648.
64. Siess W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev*. 1989;69(1):58-178.
65. Rao AK, Willis J, Kowalska MA, Wachtfogel YT, Colman RW. Differential requirements for platelet aggregation and inhibition of adenylate cyclase by epinephrine. Studies of a familial platelet alpha 2-adrenergic receptor defect. *Blood*. 1988;71(2):494-501.

66. Saeed SA, Rasheed H, Fecto FA, Achakzai MI, Ali R, Connor JD, et al. Signaling mechanisms mediated by G-protein coupled receptors in human platelets. *Acta Pharmacol Sin.* 2004;25(7):887-92.
67. Walther DJ, Peter JU, Winter S, Holtje M, Paulmann N, Grohmann M, et al. Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. *Cell.* 2003;115(7):851-62.
68. Posma JJ, Posthuma JJ, Spronk HM. Coagulation and non-coagulation effects of thrombin. *J Thromb Haemost.* 2016;14(10):1908-16.
69. Licari LG, Kovacic JP. Thrombin physiology and pathophysiology. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio).* 2009;19(1):11-22.
70. Karow T, Lang-Roth R. Gerinnungsaktive Substanzen. In: Karow T, Lang-Roth R, editors. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* 25. ed. Pulheim: Karow, T.; 2016. p. 148-86.
71. Tallima H, El Ridi R. Arachidonic acid: Physiological roles and potential health benefits - A review. *J Adv Res.* 2018;11:33-41.
72. Herold G. Hämatologie: Häorrhagische Diathesen. In: Herold G, editor. *Innere Medizin.* Köln: Herold, G.; 2018. p. 134-50.
73. Gawaz MP, Loftus JC, Bajt ML, Frojmovic MM, Plow EF, Ginsberg MH. Ligand bridging mediates integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIb-IIIa) dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions. *J Clin Invest.* 1991;88(4):1128-34.
74. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science.* 1964;145(3638):1310-2.
75. Macfarlane RG. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature.* 1964;202:498-9.
76. Hoffman M, Monroe DM, 3rd. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost.* 2001;85(6):958-65.
77. Rassow J. Infektionen, Verletzungen und Vergiftungen: Blutstillung und Blutgerinnung. In: Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R, editors. *Biochemie- Duale Reihe.* 4. ed. Stuttgart: Thieme; 2016. p. 721-37.
78. Jurk K, Kehrel BE. The role of platelets in haemostasis, thrombosis, immune defense and inflammation. *Dtsch Med Wochenschr.* 2008;133(21):1130-5.
79. Alberio L, Dale GL. Review article: platelet-collagen interactions: membrane receptors and intracellular signalling pathways. *Eur J Clin Invest.* 1999;29(12):1066-76.
80. Neumeister P. Das von Willebrand-Syndrom. In: Tschulik H, editor. *Gerinnung im klinischen Alltag.* 7. ed. Graz: Interdisziplinäre Gerinnungsgruppe Steiermark; 2016. p. 375-92.
81. von Auer C. Von Willebrand-Syndrom. In: Lindhoff-Last E, Kemkes-Mattes B, Oldenburg J, Tiede A, editors. *Hämostase Update 2018 - Handbuch Hämophilie/Hämostaseologie.* Wiesbaden: med publico GmbH; 2018.
82. Heinz J, Geisen U. Häorrhagische Diathesen. In: Berger DP, Engelhardt R, Mertelsmann R, editors. *Das Rote Buch - Hämatologie und Internistische Onkologie.* 5. ed. Heidelberg: ecomed Medizin; 2014. p. 582-605.
83. Nawroth PP, Ostendorf PC, Riess H, Hiller E, Scharf RE, Aumiller J. Erkrankungen des thrombozytären und des plasmatischen Hämostasesystems. In: Ostendorf PC, Seeber S, editors. *Hämatologie, Onkologie.* München: Urban & Schwarzenberg; 1997. p. 359-431.
84. Konkle BA. Acquired disorders of platelet function. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011;2011:391-6.
85. Toro C, Nicoli ER, Malicdan MC, Adams DR, Introne WJ. Chediak-Higashi Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, et al., editors. *GeneReviews((R)).* Seattle (WA): University of Washington, Seattle University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.; 1993.
86. Nurden AT, Freson K, Seligsohn U. Inherited platelet disorders. *Haemophilia.* 2012;18 Suppl 4:154-60.

87. Dawood BB, Lowe GC, Lordkipanidze M, Bem D, Daly ME, Makris M, et al. Evaluation of participants with suspected heritable platelet function disorders including recommendation and validation of a streamlined agonist panel. *Blood*. 2012;120(25):5041-9.
88. Lecchi A, Razzari C, Paoletta S, Dupuis A, Nakamura L, Ohlmann P, et al. Identification of a new dysfunctional platelet P2Y12 receptor variant associated with bleeding diathesis. *Blood*. 2015;125(6):1006-13.
89. Patel YM, Patel K, Rahman S, Smith MP, Spooner G, Sumathipala R, et al. Evidence for a role for Galphai1 in mediating weak agonist-induced platelet aggregation in human platelets: reduced Galphai1 expression and defective Gi signaling in the platelets of a patient with a chronic bleeding disorder. *Blood*. 2003;101(12):4828-35.
90. Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1636(2-3):119-28.
91. Heijnen H, van der Sluijs P. Platelet secretory behaviour: as diverse as the granules ... or not? *J Thromb Haemost*. 2015;13(12):2141-51.
92. Gunay-Aygun M, Falik-Zaccai TC, Vilboux T, Zivony-Elboun Y, Gumruk F, Cetin M, et al. NBEAL2 is mutated in gray platelet syndrome and is required for biogenesis of platelet alpha-granules. *Nat Genet*. 2011;43(8):732-4.
93. Daly ME. Transcription factor defects causing platelet disorders. *Blood Rev*. 2017;31(1):1-10.
94. Masliah-Planchon J, Darnige L, Bellucci S. Molecular determinants of platelet delta storage pool deficiencies: an update. *Br J Haematol*. 2013;160(1):5-11.
95. Stockley J, Morgan NV, Bem D, Lowe GC, Lordkipanidze M, Dawood B, et al. Enrichment of FLI1 and RUNX1 mutations in families with excessive bleeding and platelet dense granule secretion defects. *Blood*. 2013;122(25):4090-3.
96. White JG, Keel S, Reyes M, Burris SM. Alpha-delta platelet storage pool deficiency in three generations. *Platelets*. 2007;18(1):1-10.
97. Gabbeta J, Yang X, Kowalska MA, Sun L, Dhanasekaran N, Rao AK. Platelet signal transduction defect with Galpha subunit dysfunction and diminished Galphaq in a patient with abnormal platelet responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(16):8750-5.
98. Shiraga M, Miyata S, Kato H, Kashiwagi H, Honda S, Kurata Y, et al. Impaired platelet function in a patient with P2Y12 deficiency caused by a mutation in the translation initiation codon. *J Thromb Haemost*. 2005;3(10):2315-23.
99. Nisar S, Daly ME, Federici AB, Artoni A, Mumford AD, Watson SP, et al. An intact PDZ motif is essential for correct P2Y12 purinoceptor traffic in human platelets. *Blood*. 2011;118(20):5641-51.
100. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR. Platelets and thrombin generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(9):1381-9.
101. Nagata S, Suzuki J, Segawa K, Fujii T. Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. *Cell Death Differ*. 2016;23(6):952-61.
102. Wolfs JL, Comfurius P, Rasmussen JT, Keuren JF, Lindhout T, Zwaal RF, et al. Activated scramblase and inhibited aminophospholipid translocase cause phosphatidylserine exposure in a distinct platelet fraction. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62(13):1514-25.
103. Fixter K, Rabbolini DJ, Valecha B, Morel-Kopp MC, Gabrielli S, Chen Q, et al. Mean platelet diameter measurements to classify inherited thrombocytopenias. *Int J Lab Hematol*. 2018;40(2):187-95.
104. Bauer F. Thrombozyten, Thrombozytopenie. In: Tschulik H, editor. *Gerinnung im klinischen Alltag*. 7. ed. Graz: Interdisziplinäre Gerinnungsgruppe Steiermark; 2016. p. 47-102.
105. Jurk K, Shiravand Y. Platelet Phenotyping and Function Testing in Thrombocytopenia. *J Clin Med*. 2021;10(5).

106. Bury L, Falcinelli E, Gresele P. Learning the Ropes of Platelet Count Regulation: Inherited Thrombocytopenias. *J Clin Med.* 2021;10(3).
107. Noris P, Pecci A. Hereditary thrombocytopenias: a growing list of disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2017;2017(1):385-99.
108. Neumeister P. Hämophilie A und B, Seltene plasmatische Gerinnungsstörungen. In: Tschulik H, editor. *Gerinnung im klinischen Alltag.* 7. ed. Graz: Interdisziplinäre Gerinnungsgruppe Steiermark; 2016. p. 393-429.
109. Kolev K, Longstaff C. Bleeding related to disturbed fibrinolysis. *Br J Haematol.* 2016;175(1):12-23.
110. Lillicrap D. von Willebrand disease: advances in pathogenetic understanding, diagnosis, and therapy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2013;2013:254-60.
111. Sadler JE. Low von Willebrand factor: sometimes a risk factor and sometimes a disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2009:106-12.
112. Sadler B, Minard CG, Haller G, Gurnett CA, O'Brien SH, Wheeler A, et al. Whole-exome analysis of adolescents with low VWF and heavy menstrual bleeding identifies novel genetic associations. *Blood Adv.* 2022;6(2):420-8.
113. Haberichter SL, Balistreri M, Christopherson P, Morateck P, Gavazova S, Bellissimo DB, et al. Assay of the von Willebrand factor (VWF) propeptide to identify patients with type 1 von Willebrand disease with decreased VWF survival. *Blood.* 2006;108(10):3344-51.
114. James PD, Connell NT, Ameer B, Di Paola J, Eikenboom J, Giraud N, et al. ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood Adv.* 2021;5(1):280-300.
115. Connell NT, Flood VH, Brignardello-Petersen R, Abdul-Kadir R, Arapshian A, Couper S, et al. ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the management of von Willebrand disease. *Blood Adv.* 2021;5(1):301-25.
116. Russell SD, Roth GJ. Pseudo-von Willebrand disease: a mutation in the platelet glycoprotein Ib alpha gene associated with a hyperactive surface receptor. *Blood.* 1993;81(7):1787-91.
117. Othman M, Kaur H, Emsley J. Platelet-type von Willebrand disease: new insights into the molecular pathophysiology of a unique platelet defect. *Semin Thromb Hemost.* 2013;39(6):663-73.
118. Prüller F. Labordiagnostik. In: Tschulik H, editor. *Gerinnung im klinischen Alltag.* 7. ed. Graz: Interdisziplinäre Gerinnungsgruppe Steiermark; 2016. p. 1-45.
119. Neumeiser B, Gerhardt A, Beneke H. Hämostaseologie. In: Neumeister B, Böhm BO, editors. *Klinikleitfaden Labordiagnostik.* 6. ed. München: Elsevier; 2018. p. 473-522.
120. Boender J, Kruip MJ, Leebeek FW. A diagnostic approach to mild bleeding disorders. *J Thromb Haemost.* 2016;14(8):1507-16.
121. Rydz N, James PD. The evolution and value of bleeding assessment tools. *J Thromb Haemost.* 2012;10(11):2223-9.
122. Rodeghiero F, Tosetto A, Abshire T, Arnold DM, Collier B, James P, et al. ISTH/SSC bleeding assessment tool: a standardized questionnaire and a proposal for a new bleeding score for inherited bleeding disorders. *J Thromb Haemost.* 2010;8(9):2063-5.
123. Sadler JE, Rodeghiero F. Provisional criteria for the diagnosis of VWD type 1. *J Thromb Haemost.* 2005;3(4):775-7.
124. Laffan M, Brown SA, Collins PW, Cumming AM, Hill FG, Keeling D, et al. The diagnosis of von Willebrand disease: a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia.* 2004;10(3):199-217.
125. Quiroga T, Goycoolea M, Belmont S, Panes O, Aranda E, Zuniga P, et al. Quantitative impact of using different criteria for the laboratory diagnosis of type 1 von Willebrand disease. *J Thromb Haemost.* 2014;12(8):1238-43.
126. Favaloro EJ. Commentary on the ASH ISTH NHF WFH 2021 guidelines on the diagnosis of VWD: reflections based on recent contemporary test data. *Blood Adv.* 2022;6(2):416-9.

127. Kalot MA, Husainat N, Abughanimeh O, Diab O, El Alayli A, Tayiem S, et al. Laboratory assays of VWF activity and use of desmopressin trials in the diagnosis of VWD: a systematic review and meta-analysis. *Blood Adv.* 2022;6(12):3735-45.
128. Quiroga T, Mezzano D. Is my patient a bleeder? A diagnostic framework for mild bleeding disorders. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2012;2012:466-74.
129. Quiroga T, Goycoolea M, Panes O, Aranda E, Martinez C, Belmont S, et al. High prevalence of bleeders of unknown cause among patients with inherited mucocutaneous bleeding. A prospective study of 280 patients and 299 controls. *Haematologica.* 2007;92(3):357-65.
130. Rodeghiero F, Castaman G, Tosetto A, Battle J, Baudo F, Cappelletti A, et al. The discriminant power of bleeding history for the diagnosis of type 1 von Willebrand disease: an international, multicenter study. *J Thromb Haemost.* 2005;3(12):2619-26.
131. Mani H, Wolf Z, Lindhoff-Last E. [Progress in diagnostic evaluation of platelet function disorders]. *Hamostaseologie.* 2010;30(4):217-29.
132. Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, Hayward CP, Kenny D, Nugent D, et al. Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost.* 2013.
133. Greinacher A, Pecci A, Kunishima S, Althaus K, Nurden P, Balduino CL, et al. Diagnosis of inherited platelet disorders on a blood smear: a tool to facilitate worldwide diagnosis of platelet disorders. *J Thromb Haemost.* 2017;15(7):1511-21.
134. Sivapalaratnam S, Collins J, Gomez K. Diagnosis of inherited bleeding disorders in the genomic era. *Br J Haematol.* 2017;179(3):363-76.
135. Favaloro EJ. Clinical utility of closure times using the platelet function analyzer-100/200. *Am J Hematol.* 2017;92(4):398-404.
136. Dupuis A, Bordet JC, Eckly A, Gachet C. Platelet δ -Storage Pool Disease: An Update. *J Clin Med.* 2020;9(8).
137. Brunet JG, Iyer JK, Badin MS, Graf L, Moffat KA, Timleck M, et al. Electron microscopy examination of platelet whole mount preparations to quantitate platelet dense granule numbers: Implications for diagnosing suspected platelet function disorders due to dense granule deficiency. *Int J Lab Hematol.* 2018;40(4):400-7.
138. Kölblinger C. Medikamente. In: Tschulik H, editor. *Gerinnung im klinischen Alltag.* 7. ed. Graz: Interdisziplinäre Gerinnungsgruppe Steiermark; 2016. p. 431-97.
139. Karow T, Lang-Roth R. Blutprodukte. In: Karow T, Lang-Roth R, editors. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* 25. ed. Pulheim: Karow, T.; 2016. p. 549-58.
140. Streif W, Eberl W, Knöfler R. Leitlinie Thrombozytopathien Therapie. Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH e.V): AMWF online. Das Portal der wissenschaftlichen Medizin; 2012 [updated 04.2014; cited 08.2019. AWMF-Register Nr. 086-004, Klasse 2SK:[Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/086-004I_S2k_Thrombozytopathien_Therapie_2014.pdf.
141. Grosser T, Weber A-A. Pharmakologie der Hämostase. In: Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K, editors. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* 12. ed. München: Elsevier; 2017. p. 465-88.
142. Denis CV, Susen S, Lenting PJ. von Willebrand disease: what does the future hold? *Blood.* 2021;137(17):2299-306.
143. Tosetto A, Castaman G, Plug I, Rodeghiero F, Eikenboom J. Prospective evaluation of the clinical utility of quantitative bleeding severity assessment in patients referred for hemostatic evaluation. *J Thromb Haemost.* 2011;9(6):1143-8.
144. Elbatarny M, Mollah S, Grabell J, Bae S, Deforest M, Tuttle A, et al. Normal range of bleeding scores for the ISTH-BAT: adult and pediatric data from the merging project. *Haemophilia.* 2014;20(6):831-5.

145. Bowman M, Mundell G, Grabell J, Hopman WM, Rapson D, Lillicrap D, et al. Generation and validation of the Condensed MCMDM-1/VWD Bleeding Questionnaire for von Willebrand disease. *J Thromb Haemost.* 2008;6(12):2062-6.
146. Adler M, Kaufmann J, Alberio L, Nagler M. Diagnostic utility of the ISTH bleeding assessment tool in patients with suspected platelet function disorders. *J Thromb Haemost.* 2019;17(7):1104-12.
147. Gresele P, Orsini S, Noris P, Falcinelli E, Alessi MC, Bury L, et al. Validation of the ISTH/SSC bleeding assessment tool for inherited platelet disorders: A communication from the Platelet Physiology SSC. *J Thromb Haemost.* 2020;18(3):732-9.
148. Gresele P, Falcinelli E, Bury L, Pecci A, Alessi MC, Borhany M, et al. The ISTH bleeding assessment tool as predictor of bleeding events in inherited platelet disorders: Communication from the ISTH SSC Subcommittee on Platelet Physiology. *J Thromb Haemost.* 2021;19(5):1364-71.
149. <Leitlinie AWMF
Diagnostik_Thrombozytenfunktionsstoerungen_Thrombozytopathien_2018-09.pdf>.
150. Germanovich K, Femia EA, Cheng CY, Dovlatova N, Cattaneo M. Effects of pH and concentration of sodium citrate anticoagulant on platelet aggregation measured by light transmission aggregometry induced by adenosine diphosphate. *Platelets.* 2018;29(1):21-6.
151. Sysmex Deutschland GmbH. Muster-Standardarbeitsanweisung für den Sysmex Hämatologieanalysator KX-21N Norderstedt [cited 27.08.2019. 1.: [Available from: https://www.sysmex.de/fileadmin/media/f101/Muster-Standardarbeitsanweisung/SOP_KX-21N.pdf].
152. Bio-Rad Laboratories, Inc. Flow Cytometry Basics Guide [cited 27.08.2019. Bulletin 6636 Ver B: [Available from: http://www.rki-i.com/cell_reg2003/flowcytometry.pdf].
153. Burkhardt JM, Vaudel M, Gambaryan S, Radau S, Walter U, Martens L, et al. The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood.* 2012;120(15):e73-82.
154. Nergiz-Ünal R. Platelets in atherothrombosis - Roles of CD36 and P2Y₁₂ receptors. Maastricht: Universiteit Maastricht; 2011.
155. Gordon N, Thom J, Cole C, Baker R. Rapid detection of hereditary and acquired platelet storage pool deficiency by flow cytometry. *Br J Haematol.* 1995;89(1):117-23.
156. Andres O, Henning K, Strauss G, Pflug A, Manukjan G, Schulze H. Diagnosis of platelet function disorders: A standardized, rational, and modular flow cytometric approach. *Platelets.* 2018;29(4):347-56.
157. Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM, et al. Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature.* 1992;359(6398):848-51.
158. Polgar J, Clemetson JM, Kehrel BE, Wiedemann M, Magnenat EM, Wells TN, et al. Platelet activation and signal transduction by convulxin, a C-type lectin from *Crotalus durissus terrificus* (tropical rattlesnake) venom via the p62/GPVI collagen receptor. *J Biol Chem.* 1997;272(21):13576-83.
159. Batuwangala T, Leduc M, Gibbins JM, Bon C, Jones EY. Structure of the snake-venom toxin convulxin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 2004;60(Pt 1):46-53.
160. Coller BS, Gralnick HR. Studies on the mechanism of ristocetin-induced platelet agglutination. Effects of structural modification of ristocetin and vancomycin. *J Clin Invest.* 1977;60(2):302-12.
161. Laudano AP, Doolittle RF. Synthetic peptide derivatives that bind to fibrinogen and prevent the polymerization of fibrin monomers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978;75(7):3085-9.
162. Gresele P, Falcinelli E, Bury L. Inherited platelet disorders in women. *Thromb Res.* 2019;181 Suppl 1:S54-s9.
163. Hayward CP. Diagnostic evaluation of platelet function disorders. *Blood Rev.* 2011;25(4):169-73.

164. Hayward CP, Harrison P, Cattaneo M, Ortel TL, Rao AK. Platelet function analyzer (PFA)-100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. *J Thromb Haemost.* 2006;4(2):312-9.
165. Moenen F, Vries MJA, Nelemans PJ, van Rooy KJM, Vranken J, Verhezen PWM, et al. Screening for platelet function disorders with Multiplate and platelet function analyzer. *Platelets.* 2019;30(1):81-7.
166. Quiroga T, Goycoolea M, Munoz B, Morales M, Aranda E, Panes O, et al. Template bleeding time and PFA-100 have low sensitivity to screen patients with hereditary mucocutaneous hemorrhages: comparative study in 148 patients. *J Thromb Haemost.* 2004;2(6):892-8.
167. Kaufmann J, Adler M, Alberio L, Nagler M. Utility of the Platelet Function Analyzer in Patients with Suspected Platelet Function Disorders: Diagnostic Accuracy Study. *TH Open.* 2020;4(4):e427-e36.
168. van Asten I, Schutgens REG, Baaij M, Zandstra J, Roest M, Pasterkamp G, et al. Validation of flow cytometric analysis of platelet function in patients with a suspected platelet function defect. *J Thromb Haemost.* 2018;16(4):689-98.
169. Navred K, Martin M, Ekdahl L, Zetterberg E, Andersson NG, Strandberg K, et al. A simplified flow cytometric method for detection of inherited platelet disorders-A comparison to the gold standard light transmission aggregometry. *PLoS One.* 2019;14(1):e0211130.
170. B EK, M FB. State of the art in platelet function testing. *Transfus Med Hemother.* 2013;40(2):73-86.
171. Boknäs N, Macwan AS, Södergren AL, Ramström S. Platelet function testing at low platelet counts: When can you trust your analysis? *Res Pract Thromb Haemost.* 2019;3(2):285-90.
172. Paniccia R, Priora R, Liotta AA, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag.* 2015;11:133-48.
173. Favaloro EJ, Lippi G. Preanalytical issues that may cause misdiagnosis in haemophilia and von Willebrand disease. *Haemophilia.* 2018;24(2):198-210.
174. Adcock Funk DM, Lippi G, Favaloro EJ. Quality standards for sample processing, transportation, and storage in hemostasis testing. *Semin Thromb Hemost.* 2012;38(6):576-85.
175. Tosetto A, Rodeghiero F, Castaman G, Goodeve A, Federici AB, Batlle J, et al. A quantitative analysis of bleeding symptoms in type 1 von Willebrand disease: results from a multicenter European study (MCMDM-1 VWD). *J Thromb Haemost.* 2006;4(4):766-73.
176. Kanaji S, Fahs SA, Shi Q, Haberichter SL, Montgomery RR. Contribution of platelet vs. endothelial VWF to platelet adhesion and hemostasis. *J Thromb Haemost.* 2012;10(8):1646-52.
177. Sadler JE. Slippery criteria for von Willebrand disease type 1. *J Thromb Haemost.* 2004;2(10):1720-3.
178. Sharma R, Flood VH. Advances in the diagnosis and treatment of Von Willebrand disease. *Blood.* 2017;130(22):2386-91.
179. Cosemans JM, Iserbyt BF, Deckmyn H, Heemskerk JW. Multiple ways to switch platelet integrins on and off. *J Thromb Haemost.* 2008;6(8):1253-61.
180. Shattil SJ, Newman PJ. Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets. *Blood.* 2004;104(6):1606-15.
181. Ruggeri ZM, Mendolicchio GL. Adhesion mechanisms in platelet function. *Circ Res.* 2007;100(12):1673-85.
182. Grainger JD, Thachil J, Will AM. How we treat the platelet glycoprotein defects; Glanzmann thrombasthenia and Bernard Soulier syndrome in children and adults. *Br J Haematol.* 2018;182(5):621-32.
183. Leytin V, Allen DJ, Mykhaylov S, Mis L, Lyubimov EV, Garvey B, et al. Pathologic high shear stress induces apoptosis events in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;320(2):303-10.

184. Andrews RK, Berndt MC. Bernard-Soulier syndrome: an update. *Semin Thromb Hemost.* 2013;39(6):656-62.
185. Makhoul S, Kumm E, Zhang P, Walter U, Jurk K. The Serine/Threonine Protein Phosphatase 2A (PP2A) Regulates Syk Activity in Human Platelets. *Int J Mol Sci.* 2020;21(23).
186. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(12):2341-9.
187. Matus V, Valenzuela G, Sáez CG, Hidalgo P, Lagos M, Aranda E, et al. An adenine insertion in exon 6 of human GP6 generates a truncated protein associated with a bleeding disorder in four Chilean families. *J Thromb Haemost.* 2013;11(9):1751-9.
188. Boylan B, Chen H, Rathore V, Paddock C, Salacz M, Friedman KD, et al. Anti-GPVI-associated ITP: an acquired platelet disorder caused by autoantibody-mediated clearance of the GPVI/FcRgamma-chain complex from the human platelet surface. *Blood.* 2004;104(5):1350-5.
189. Arthur JF, Dunkley S, Andrews RK. Platelet glycoprotein VI-related clinical defects. *Br J Haematol.* 2007;139(3):363-72.
190. Nurden P, Nurden AT. Congenital disorders associated with platelet dysfunctions. *Thromb Haemost.* 2008;99(2):253-63.
191. Simeoni I, Stephens JC, Hu F, Deevi SV, Megy K, Bariana TK, et al. A high-throughput sequencing test for diagnosing inherited bleeding, thrombotic, and platelet disorders. *Blood.* 2016;127(23):2791-803.
192. Mumford AD, Frelinger AL, 3rd, Gachet C, Gresele P, Noris P, Harrison P, et al. A review of platelet secretion assays for the diagnosis of inherited platelet secretion disorders. *Thromb Haemost.* 2015;114(1):14-25.
193. Neumüller J, Meisslitzler-Ruppitsch C, Ellinger A, Pavelka M, Jungbauer C, Renz R, et al. Monitoring of platelet activation in platelet concentrates using transmission electron microscopy. *Transfus Med Hemother.* 2013;40(2):101-7.
194. Yoshimoto Y, Hasebe T, Takahashi K, Amari M, Nagashima S, Kamijo A, et al. Ultrastructural characterization of surface-induced platelet activation on artificial materials by transmission electron microscopy. *Microsc Res Tech.* 2013;76(4):342-9.
195. Jurk K, Adenauer A, Sollfrank S, Groß K, Häuser F, Czwalińska A, et al. Novel GATA1 Variant Causing a Bleeding Phenotype Associated with Combined Platelet α - δ -Storage Pool Deficiency and Mild Dyserythropoiesis Modified by a SLC4A1 Variant. *Cells.* 2022;11(19).
196. Jurk K, Jahn UR, Van Aken H, Schriek C, Droste DW, Ritter MA, et al. Platelets in patients with acute ischemic stroke are exhausted and refractory to thrombin, due to cleavage of the seven-transmembrane thrombin receptor (PAR-1). *Thromb Haemost.* 2004;91(2):334-44.
197. Ferreira CR, Chen D, Abraham SM, Adams DR, Simon KL, Malicdan MC, et al. Combined alpha-delta platelet storage pool deficiency is associated with mutations in GFI1B. *Mol Genet Metab.* 2017;120(3):288-94.
198. Maclachlan A, Watson SP, Morgan NV. Inherited platelet disorders: Insight from platelet genomics using next-generation sequencing. *Platelets.* 2017;28(1):14-9.
199. Lentaigne C, Freson K, Laffan MA, Turro E, Ouwehand WH. Inherited platelet disorders: toward DNA-based diagnosis. *Blood.* 2016;127(23):2814-23.